

科学研究費助成事業（学術研究助成基金助成金）研究成果報告書

平成25年6月10日現在

機関番号：72602
研究種目：若手研究（B）
研究期間：2011～2012
課題番号：23701066
研究課題名（和文） 生体内でのRas発がんに対する転写因子Bach1の機能解析
研究課題名（英文） Functional analysis of transcription factor Bach1 for oncogenic Ras in vivo
研究代表者 坂原 瑞穂（SAKAHARA MIZUHO） 公益財団法人がん研究会・がん研究所細胞生物部・研究員 研究者番号：00572314

研究成果の概要（和文）：

皮膚扁平上皮がん（SCC）発症モデルマウスとして選択した K5-Hras トランスジェニック（Tg）マウスでは、*patched* 遺伝子の多型が SCC 発症に影響を与える（C57BL/6 系統：抵抗性、FVB 系統：感受性が強い）。本研究により、遺伝的背景が C57BL/6 系統の K5-Hras Tg マウスにおいて、*patched* 遺伝子近傍のみを FVB/FVB 系統にすることで、より早期に SCC の発症を誘導できることが示唆された。なお、本研究に用いたモデル系では、Bach1 の欠損による腫瘍の発生頻度・発生部位等に明らかな違いは認められなかった。

研究成果の概要（英文）：

The incidence of skin squamous cell carcinoma (SCC) induced by activation of oncogenic Ras is affected by polymorphism of *patched* (*ptch*) gene in mice (C57BL/6 strain: resistance, FVB strain: high susceptibility).

In this study, we obtained K5-Hras transgenic mice of C57BL/6 background which carry *ptch* allele of FVB strain (K5-Hras Tg; *ptch*^{FVB/FVB}).

Our results suggest that the SCC formation is promoted K5-Hras Tg; *ptch*^{FVB/FVB} mice as compared with the K5-Hras Tg; *ptch*^{B6/FVB} mice.

However, the tumor latency in the model system of these mice was not affected by loss of Bach1.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
交付決定額	3,400,000	1,020,000	4,420,000

研究分野：総合領域

科研費の分科・細目：腫瘍学・腫瘍生物学

キーワード：Ras 発がん、Bach1、皮膚扁平上皮がん、膵臓がん、マウス

1. 研究開始当初の背景

発がんの分子機構として、遺伝子変異の蓄積等を伴う多段階発がんモデルが提唱されており、*ras* 遺伝子は、ヒトの腫瘍において最も高頻度に活性化変異が検出される。そのため、がん原遺伝子 *ras* は、発がんの分子機構の解明や抗がん剤開発の分子標的など、多くの研究の対象となっている。その中でも、*ras* 遺伝子の活性化変異を伴う皮膚扁平上皮がん (squamous cell carcinoma: SCC) や膵臓がん (pancreatic ductal adenocarcinoma: PDAC) のモデルマウスの系は、ほぼ確立されている。

近年、抑制性の転写因子 *Bach1* が、細胞老化や Ras 発がんに関与する可能性が示唆された (Dohi Y, Noda T, Igarashi K *et al.*, *Nature Structural & Molecular Biology*, 2008)。

Bach1 ノックアウトマウス由来線維芽細胞を用いた解析の結果、*Bach1* はがん抑制因子 p53 によって発現誘導される標的遺伝子が形成するクロマチン上の発現調節領域に結合し、p53 の働きを阻害することで p53 依存性細胞老化を抑制することが示された。また、マウス線維芽細胞に *Bach1* を発現させると、活性型 Ras 誘導性細胞老化が阻害される。

細胞老化は、遺伝子変異を蓄積した細胞が増殖するのを防ぐ働きがあることから、発がん抑制に機能すると考えられる。

これらのことから、*Bach1* が発がんの調節に関与している可能性が示唆される。

皮膚発がんモデルマウスのうち、本研究で選択した K5-Hras トランスジェニック (Tg) マウスは、ケラチン 5 遺伝子のプロモーター下流に活性化変異を有するヒト H-*ras*^{G12V} 遺伝子が連結しており、表皮基底細胞特異的に活性化 H-Ras が発現し、SCC の自然発生が誘導される。

この K5-Hras Tg マウスは、遺伝的背景が C57BL/6 (B6) 系統の場合、SCC の発生に抵抗性を示す。一方、FVB/N (FVB) 系統マウスは感受性が強く、生後 3 週間以内に約 30% のマウスが carcinoma を発症する。この SCC の感受性の違いは、マウス第 13 番染色体上の *patched* (*ptch*) 遺伝子のカルボキシ末端の多型によることが示された (Wakabayashi Y *et al.*, *Nature*, 2007)。しかし、FVB 系統由来

の内在性 *ptch* 遺伝子 (*ptch*^{FVB}) を持つ B6 系統 K5-Hras Tg マウスにおける SCC 発生に対する感受性については、明らかとなっていない。

がんの発生・進展には、がん細胞自身の遺伝子異常等の蓄積のみならず、線維芽細胞などの間質を含むがん細胞を取り巻く微小環境も影響していると考えられている。つまり、*Bach1* の機能についても、組織特異性が十分に考えられる。

そこで、本研究では、皮膚扁平上皮がん発症モデルマウスを用いた *Bach1* の機能解析と並行して、膵臓がん発症モデルマウスと *bach1* 遺伝子欠損マウスを交配することにより、発がん母地の違いを考慮した上で、がん細胞の増殖・浸潤と細胞老化における *Bach1* の関与について検討する。

2. 研究の目的

本研究の目的は、ヒトのがんで最も高頻度に活性化変異が同定され、Ras 発がんモデルマウスの系が確立している皮膚と膵臓に焦点を絞り、p53 依存性細胞老化の亢進がみられる *Bach1* に着目し、生体内における Ras 発がんの過程を明らかにすることである。

また、活性型 H-Ras 誘導性 SCC 発生に対する、マウスの遺伝的背景と感受性の関係について検討する。

3. 研究の方法

(1) 皮膚扁平上皮がん発症モデルマウスを用いた *Bach1* の機能解析

まず、遺伝的背景と SCC 発症時期等の関係を調べるため、*ptch* 遺伝子近傍のみが FVB 系統の K5-Hras Tg; *ptch*^{FVB/FVB} マウスを得た。具体的には、遺伝的背景について、FVB 系統と B6 系統が混在した K5-Hras Tg マウスを、B6 系統野生型マウスと戻し交配を繰り返した。この時、マイクロサテライトマーカーを利用した PCR 解析を行い、各染色体が B6 あるいは FVB のどちらの系統に由来するかを判断した。

このようにして得られた K5-Hras Tg; *ptch*^{FVB/FVB} マウスの経過観察を行い、腫瘍の発生頻度や発生部位・発生時期等を、コントロールマウス [K5-Hras Tg; *ptch*^{B6/FVB} マウス、K5-Hras Tg; *ptch*^{B6/B6} マウス] と比較した。

次に、*bach1* 遺伝子欠損マウスと前述の SCC

発症モデルマウスを交配した。得られた *bach1*^{-/-}(B6); K5-Hras Tg; *ptch*^{FVB/FVB} マウスならびに、コントロールマウス [*bach1*^{+/-}(B6); K5-Hras Tg; *ptch*^{FVB/FVB} マウス、*bach1*^{+/-}(B6); K5-Hras Tg; *ptch*^{FVB/FVB} マウス] に関して経過観察を行い、SCC 発生における Bach1 欠損の影響について検討した。

なお、SCC 発生時期の比較については、Kaplan-Meier 法と一般化 Wilcoxon 検定を用いた。

(2) 膵臓がん発症モデルマウスを用いた Bach1 の機能解析

膵臓がんの前がん病変 PanIN を発症するモデルマウス (LSL-Kras^{G12D/+}; Ptf1a-Cre) と *bach1* 遺伝子欠損マウスを交配し、得られたマウスについて PanIN の発生頻度と Bach1 欠損の影響について検討した。

また、PanIN から PDAC への悪性化における Bach1 欠損の影響について調べるため、ヒトの膵臓がんで変異が認められるがん抑制遺伝子 (*p53*, *smad4* 等) を不活化したマウスとの交配を行った。

4. 研究成果

(1) 皮膚扁平上皮がん発症モデルマウスを用いた Bach1 の機能解析

① 活性型 H-Ras 誘導性 SCC 発生と *ptch* 遺伝子の多型に関する解析

遺伝的背景が FVB 系統と B6 系統の混在した K5-Hras Tg マウスを、B6 系統野生型マウスと戻し交配を繰り返した。その結果、戻し交配第 10 世代マウスでは、第 13 番染色体は *ptch* 遺伝子の上流 10.6MB/下流 21.8Mb まで B6 に置き換わった。また、第 13 番染色体以外の染色体は、調べたマイクロサテライトマーカー 138 種類全てが B6 由来を示し、*ptch* 遺伝子近傍のみが FVB 由来の K5-Hras Tg; *ptch*^{FVB/FVB} マウスを得ることが出来た。

得られたマウスのうち、*ptch* 遺伝子近傍の遺伝的背景が FVB/FVB 系統の場合、生後 4 週までに 12 匹中 9 匹 (約 75%) のマウスが SCC を発症した。一方、B6/FVB 系統 (15 匹中 0 匹) や B6/B6 系統 (9 匹中 0 匹) では、生後 4 週までの SCC 発症は観察されなかった (図 1)。

統計学的解析の結果、FVB/FVB 系統マウスは、B6/FVB 系統・B6/B6 系統マウスと比較して、有意に SCC の発生時期が早くなっていた ($P < 0.001$)。なお、B6/FVB 系統と B6/B6 系

統の SCC 発生時期を比較しても、有意差は認められなかった ($P = 0.111$)。

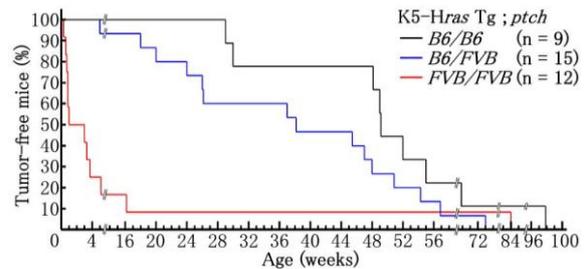


図 1. SCC 発生時期の比較

SCC の発生部位は、FVB/FVB 系統マウスのように生後 4 週までの早期に発症した場合、全身性が多く見られたが (FVB/FVB 系統: 9 匹中 8 匹)、B6/FVB 系統や B6/B6 系統マウスのように生後 4 週以降に発症した場合、多くは耳に局限していた (B6/FVB 系統: 15 匹中 13 匹、B6/B6 系統: 9 匹中 8 匹)。

以上の結果より、遺伝的背景が B6 の K5-Hras Tg マウスにおいて、第 13 番染色体上の *ptch* 遺伝子近傍のみを FVB 系統にすることにより、SCC 発生に対する感受性が高くなることが明らかとなった。

② 活性型 H-Ras 誘導性 SCC 発生における Bach1 の機能解析

得られた *bach1*^{-/-}(B6); K5-Hras Tg; *ptch*^{FVB/FVB} マウスの経過観察を行った結果、コントロールマウスと同様、SCC を発症した (図 2)。

また、統計学的解析の結果、コントロールマウスと比較して、Bach1 の欠損と SCC 発生時期に有意な差は認められなかった (*bach1*^{-/-} vs *bach1*^{+/-}, $P = 0.230$; *bach1*^{-/-} vs *bach1*^{+/-}, $P = 0.563$)。

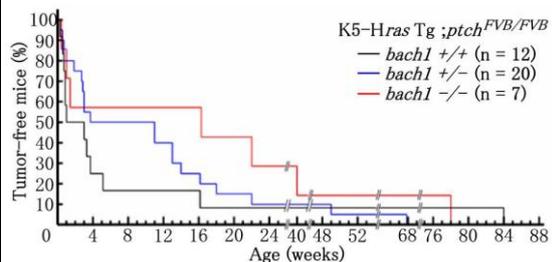


図 2. SCC 発生時期の比較

SCC の発生部位は、前述①の結果と同様、生後 4 週までの早期発症では全身性が多く、それ以降は耳に局限する傾向が見られた。

結果として、本研究に用いたモデル系では、Bach1 の欠損による SCC の発生頻度・発生部位等に明らかな違いは認められなかった。

(2) 膵臓がん発症モデルマウスを用いた
Bach1 の機能解析

PanIN を発症するモデルマウス (LSL-*Kras*^{G12D/+}; Ptf1a-Cre) と *bach1* 遺伝子欠損マウスを交配し、解析対象となる *bach1*^{-/-}; LSL-*Kras*^{G12D/+}; Ptf1a-Cre マウスを得た。

得られたマウスの経過観察を行い、生後 30 週齢 (1 匹)、生後 52 週齢 (2 匹) の時点で膵臓を摘出し、前がん病変 PanIN の有無を調べた。その結果、*bach1* 遺伝子を欠損したマウスでも、PanIN の発症は認められた。

ただし、解析した匹数が少ないため、Bach1 の欠損による PanIN の発生頻度や進展への影響については、今後、匹数を増やして検討する必要がある。

また、PanIN から PDAC への悪性化に Bach1 の欠損が影響を及ぼすのか否かについても、現在解析中である。

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文] (計 0 件)

[学会発表] (計 0 件)

6. 研究組織

(1) 研究代表者

坂原 瑞穂 (SAKAHARA MIZUHO)
公益財団法人がん研究会・がん研究所細胞
生物部・研究員
研究者番号：00572314

(2) 研究分担者

なし

(3) 連携研究者

なし