

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 6 月 18 日現在

機関番号：82504

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2013～2014

課題番号：25860303

研究課題名(和文)腫瘍悪性化プロセスを制御する抵抗性遺伝子の同定

研究課題名(英文)Identification of resistance genes in the process of tumor progression

研究代表者

奥村 和弘 (Okumura, Kazuhiro)

千葉県がんセンター(研究所)・発がん研究グループ・実験動物研究室・客員研究員

研究者番号：80584680

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,300,000円

研究成果の概要(和文)：これまでにDMBA-TPAによる多段階皮膚発がんモデルを用い、皮膚腫瘍抵抗性遺伝子座(Stmm)を複数のマウス染色体上にマップしている。本研究では第7および4番染色体上Stmm1および3を対象に各サブコンジェニック系統を作製し、それらの原因遺伝子を同定する目的で遺伝学的解析を実施した。その結果、それぞれの遺伝子座を遺伝学的に2-5 cM程度に狭めることに成功した。さらにStmm1bの候補遺伝子であるPthに着目し、BACクローンをを用いた遺伝子改変マウスを作製した。それらを用いて発がん実験を実施した結果、有意に良性腫瘍を抑制したことから、PthはStmm1bの原因遺伝子である可能性が示唆された。

研究成果の概要(英文)：Using a forward genetics approach to map such loci in a mouse skin cancer model, we previously identified strong genetic loci conferring resistance to early-stage and late-stage chemically induced skin papillomas on chromosome 7 and 4 by analyzing a large number of [(FVB/N×MSM/Ms)×FVB/N] F1 backcross mice. In this report, we describe a sub-congenic mapping analysis of the loci on chromosome 7 and 4. We used linkage analysis and congenic mouse strains to refine the location of Stmm (Skin tumor modifier of MSM) 1 and 3 loci within a genetic interval of about 2-5 cM, respectively. The parathyroid hormone (Pth) gene was found in the vicinity of Stmm1b. Here, we report a genetic polymorphism located in the Pth gene, which produces Val/Met pro-Pth variants. Skin carcinogenesis experiments using MSM-BAC transgenic mouse lines FVB/N-Tg(MSMg01-047A16) showed MSM-Pth alleles conferred resistance to tumors. These results suggested that Pth might be a candidate responsible gene for Stmm1b.

研究分野：マウス遺伝学、がん分子生物学

キーワード：DMBA-TPA多段階皮膚発がん 皮膚腫瘍抵抗性遺伝子座 日本産野生由来近交系 コンジェニックマウス
BACトランスジェニックマウス

1. 研究開始当初の背景

日本産野生由来近交系マウス MSM/MS の発がん抵抗性に着目し、マウス系統間の遺伝的背景効果を利用した順遺伝学的ながん感受性/抵抗性遺伝子の探索を DMBA/TPA による多段階皮膚発がんモデルにより実施した。その結果、これまでに *Skin Tumor Modifier of MSM* (*Stmm*) 遺伝子座を第7番および4番染色体を含めた複数の染色体上にマップしている。そこで、これら *Stmm* 遺伝子座の候補領域を遺伝学的に限定し、がん感受性/抵抗性遺伝子の同定を試みる。特に早期良性腫瘍に対して抵抗性遺伝子座である *Stmm1*、2 および後期良性腫瘍抵抗性遺伝子座の *Stmm3* を中心に解析対象とする。

2. 研究の目的

変異原物質である DMBA と TPA を用いた多段階皮膚発がんモデルは皮膚良性腫瘍、扁平上皮がんをマウスに誘導する実験系として広く用いられている。我々は、良性腫瘍、扁平上皮がんに対して抵抗性を与える遺伝子座の探索を日本産野生マウス由来近交系 MSM を用いて行った。その結果、早期良性腫瘍に対してはマウス第7番染色体上 (*Stmm1* および 2) に、後期良性腫瘍、扁平上皮がんに対しては第4番染色体上 (*Stmm3*) にそれぞれ強い抵抗性を与える遺伝子座を検出し、2012年に報告した(文献1)。そこで、これらの遺伝子座の候補領域を遺伝学的に狭め、原因遺伝子の同定を行うことを本研究の目的とする。

3. 研究の方法

***Stmm1*、2 および 3 のサブコンジェニックマウスの作製**

Stmm1、2 および 3 の候補領域を遺伝学的に限定するために MSM マウスに FVB マウスを12世代戻し交配することにより、7 および 4番染色体が MSM/FVB のヘテロ接合体であるコンジェニックマウスをそれぞれ作製した。また、*Stmm1*、2 および 3 をマップした候補領域をスクリーニングする目的で7番染色体においては9系統、4番染色体においては3系統のサブコンジェニック系統を作製し、発がん実験に使用した。

DMBA/TPA 多段階皮膚発がん実験

各サブコンジェニックマウスは、候補領域内の遺伝子型 FVB/FVB および FVB/MSM のマウス7-8週齢の雌の個体を各15頭前後用意し、実験に供試した。まず、マウスの背部を剃毛後、翌日 DMBA (0.1mg/マウス) を塗布し、その後、TPA (10mg/マウス) 処理を開始し、週2回20週間続けた。良性腫瘍は背部皮膚にマルチタイプに発症する。この数を8週から20週まで週1回のカウントを続け、扁平上皮がんが進展するまでさらに10-20週飼育維持した。これらを継続しながら、各染色体の候補遺伝子が数十個程度になるまで、候補領域を狭めた。

***Stmm3* コンジェニックマウスを用いた短期間 TPA 処理による表皮細胞動態の解析**

8週齢雌マウス背部を除毛後、TPA (10mg/マウス) 処理を1回行い、TPA 処理後6時間、2、4、8 および 10 日目の皮膚組織を採取し、パラフィン組織切片を作製し、ヘマトキシリン・エオシン染色により組織学的解析を行った。それらを細胞増殖マーカーである Ki-67 抗体を用いた免疫染色法により、細胞増殖陽性細胞を可視化した。また、TPA 処理後の皮膚の一部は、トリプシン処理により単細胞化し、PI 染色法による細胞周期解析を FACS セルソーターにより行った。

***Stmm1b* 候補遺伝子領域の MSM-BAC クローンを用いたトランスジェニックマウスの作製と皮膚発がん実験**

Stmm1 の候補遺伝子である *Pth* 周辺領域をカバーする MSM の BAC クローンを MSM-BAC クローンライブラリーのデータベース上で検索した結果、MSMg01-047A16 が存在していた。そのクローンを理化学研究所・BRC から取り寄せ、BAC クローンを精製後、東京医学総合研究所・遺伝子改変動物開発室と共同で FVB 遺伝子背景のトランスジェニックマウス (*Tg* (*MSMg01-04A16*) : MSM-PTH⁺) を作製した。それらのマウスを用いて、上述した DMBA-TPA 多段階皮膚発がん実験を実施した。

4. 研究成果

***Stmm1* および 2 のコンジェニックマッピング解析**

MSM と FVB を用いた順遺伝学的手法によりマップした早期良性腫瘍 *Stmm1* (D7SNP507-D7SNP513) および 2 (D7SNP6-D7Mit10) をカバーするようなサブコンジェニックマウス系統 a (1.91-60.49 cM) および b (68.16-88.85 cM) を用いて DMBA-TPA 多段階皮膚発がん実験を行った結果、a 群は DNBA 処理後 10 週目において良性腫瘍数が平均 3.6±3.8 であったのに対し、野生型群では 19.8±4.9 であった (図 1B、 $p=3.2E-10$)。一方、b 群は 12.5±5.0 であり、

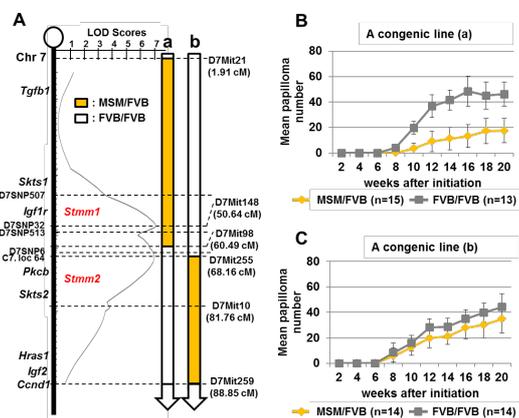


図1. 第7番染色体サブコンジェニック系統を用いたDMBA-TPA多段階発がん実験による*Stmm1/2*のマップ。A: 第7番染色体におけるコンジェニック領域の位置(オレンジ)と連鎖解析のLODピーク位置(赤字: *Stmm1* および 2)。B: サブコンジェニック系統aの発がん実験による良性腫瘍数の推移。C: サブコンジェニック系統bの発がん実験による良性腫瘍数の推移。

野生型群は 15.8 ± 6.2 であった (図 1C, $p=0.13$)。これらのことから、*Stmm2* よりも *Stmm1* の方が、より良性腫瘍発生に対する抵抗性が強いことが明らかとなった (図 1)。そこで、*Stmm1* の候補領域をさらに、狭めるために、c-i のサブコンジェニックマウスを用いた発がん実験を実施した (図 2A)。その結果、c、d、e、f 系統マウスでは、DMBA 処理後 10 週目の平均良性腫瘍数が a 群と同等であったのに対し、g、h および i 群の平均良性腫瘍数は野生型とほぼ変わらないことが明らかとなった (図 2B)。これらのことから、*Stmm1* 領域を 52.92-60.49 cM の約 8 cM に絞り込むことが可能となった。また、1995 年に Nagase らにより報告されたマウス皮膚がん感受性/抵抗性遺伝子座 *Skts1* がマップされている領域よりも、*Stmm1* は、よりテロメア側に位置しており、新たなマウス皮膚がん感受性/抵抗性遺伝子座であることも明らかとなった (図 1 および 2、文献 2)。さらに、この領域内において組換えを起こしたサブコンジェニック系統 127 (52.92-57.52 cM) および 124 (58.21-60.49 cM) を作製した。これらのマウスを用いた発がん実験の結果、127 系統の DMBA 処理後 10 週目の平均良性腫瘍数は、 2.6 ± 3.4 であったのに対し、124 系統では 14.5 ± 6 、また野生型では 18.2 ± 5.2 であり、早期良性腫瘍に対する候補領域は、52.92-57.52 cM の約 4.5 cM まで絞り込むことが可能であった。しかしながら、興味深いことに 124 系統においては DMBA 処理後 20 週目の良性腫瘍数が、 29.2 ± 6.4 であるのに対し、野生型は 47.2 ± 7.8 であり有意に低かった。このことから *Stmm1* は 2 個以上の修飾遺伝子によるマルチジーンローカスであることが示唆された。よって、我々は、52.92-57.52 cM の領域を *Stmm1a* および 58.21-60.49 cM の領域を *Stmm1b* とした。

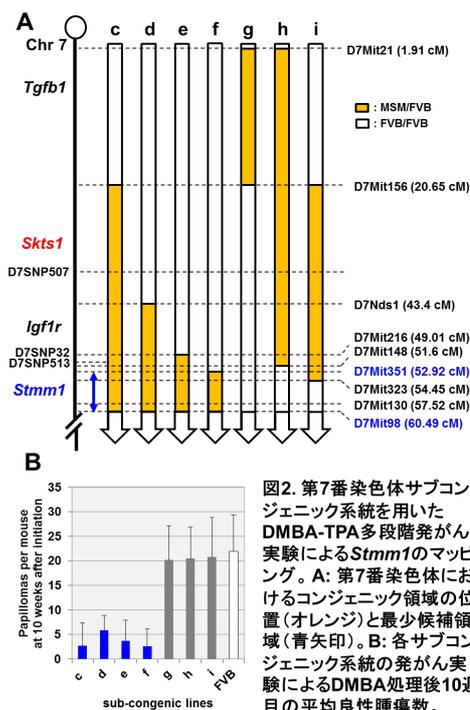


図2. 第7番染色体サブコンジェニック系統を用いた DMBA-TPA 多段階発がん実験による *Stmm1* のマッピング。A: 第7番染色体におけるコンジェニック領域の位置 (オレンジ) と最少候補領域 (青矢印)。B: 各サブコンジェニック系統の発がん実験による DMBA 処理後 10 週目の平均良性腫瘍数。

Stmm1a 領域には遺伝子が約 450 個存在しており、*Stmm1b* には約 30 個の遺伝子が存在していた。そこで、まずは *Stmm1b* に着目し、MSM と FVB 間の SNP を国立遺伝学研究所が運営する NIG Mouse Genome Database 上で検索した結果、5 つの遺伝子において、MSM に 1 つ以上の非同義置換が存在することが明らかとなった。なかでも、副甲状腺ホルモン *Pth* は細胞内プロセシングに重要な配列部位の 28 番目のパリンがメチオニンに変化する変異が存在していた。そこで *Pth* を *Stmm1b* の有力候補遺伝子とした。一方、*Stmm1a* については、今後も継続してコンジェニックマッピングにより候補領域の限定を行う予定である。

Stmm3 のコンジェニックマッピング解析

マウス第 4 番染色体上にマップされた *Stmm3* (D4Mit174- D4Mit15) は腫瘍の直径サイズが 6 mm 以上の後期良性腫瘍に対する抵抗性遺伝子座である。さらに、強力ながん抑制遺伝子である *p53* がヘテロ接合体 ($p53^{+/-}$) の遺伝子背景の N_2 マウスでは、その連鎖が消失することから、*Stmm3* の原因遺伝子は *p53* 遺伝子に機能的に依存することが、我々の過去の研究から明らかになっている (文献 1)。そこで、4 番染色体のコンジェニックマウスを FVB 遺伝子背景の *p53* ノックアウトマウスと交配し、 $p53^{+/+}$ と $p53^{+/-}$ のサブコンジェニック系統 4a (44.5-74.5 cM)、4b (31.3-63.4 cM) および 4c (42.5-44.5 cM) をそれぞれ作製した (図 3A)。これらのマウスを用いて DMBA-TPA による発がん実験を行った結果、 $p53^{+/+}$ -4a 系統の DMBA 処理後 20 週目の平均後期良性腫瘍数は 6.5 ± 5.9 であったのに対し、 $p53^{+/+}$ の野生型では 4.7 ± 4.6 であり、ほぼ差がなかった。一方、 $p53^{+/+}$ -4b および $p53^{+/+}$ -4c 系統においてはそれぞれ 0.11 ± 0.32 、 0.063 ± 0.25 であり、後期良性腫瘍がほとんど発症しなかった (図 3B)。また、 $p53^{+/+}$ の野生型マウスでは後期良性腫瘍数は 4.6 ± 6.8 であったのに対し、 $p53^{+/+}$ -4b および $p53^{+/+}$ -4c 系統においてはそれぞれ 1.4 ± 1.3 、 2.6 ± 5.8 であり、後期良性腫瘍の発生が認められた (図 3B)。これらの結果から、*Stmm3* 遺伝子座は良性腫瘍の発達に影響を与え、その機能は *p53* 遺伝子に依存していることがサブコンジェニック系統を用いた発がん実験からも示唆された。さらに *Stmm3* の候補領域は 42.5-44.5 cM の約 2 cM に限定することが可能であった (図 3A)。

この領域内には 23 個の遺伝子が存在していたが、Nagase らにより報告されたマウス皮膚がん感受性/抵抗性遺伝子座 *Skts7* や *Skts-fp1*、マウス肺がんモデルでマップされた *Papg1* およびプラズマ細胞腫でマップされた *Pctrl* と領域が重複していた。それらの最有力候補遺伝子として *Cdkn2a* がすでに報告されていた。*Cdkn2a* には $p19^{Arf}$ と $p16^{Ink4a}$ の 2 つの遺伝子が、また近傍に位置する *Cdkn2b*

には $p15^{Ink4b}$ がコードされている。 $p16^{Ink4a}$ と $p15^{Ink4b}$ は Rb 経路を介し、 $p19^{Arf}$ は $p53$ 経路を介し細胞周期の停止、アポトーシスおよび細胞老化を誘導することでがんを抑制することが多数報告されている。そこで、 $p53$ に最も機能的に依存していると予測される $p19^{Arf}$ における MSM と FVB 間のアミノ酸配列を比較した結果、MSM はトランスメンブレンドメイン内の 149 番目のロイシンがバリンに変異していた。また、 $p16^{Ink4a}$ および $p19^{Arf}$ において、それら遺伝子のノックアウトマウスを用いた DMBA/TPA 多段階皮膚発がん実験がすでに行われており、野生型マウスと比較すると $p19^{Arf}$ ノックアウトマウスにおいては後期良性腫瘍発生数および扁平上皮がん発症率が上昇し、 $p16^{Ink4a}$ ノックアウトマウスにおいては後期良性腫瘍発生数に差が認められないが、扁平上皮がん発症率は上昇するということが報告されている(文献 3)。従って $p19^{Arf}$ ノックアウトマウスの腫瘍に与える表現型は *Stmm3* サブコンジェニック系統マウスとよく一致することから、*Stmm3* の最有力候補遺伝子として $p19^{Arf}$ に着目し、以降の実験を進めた。

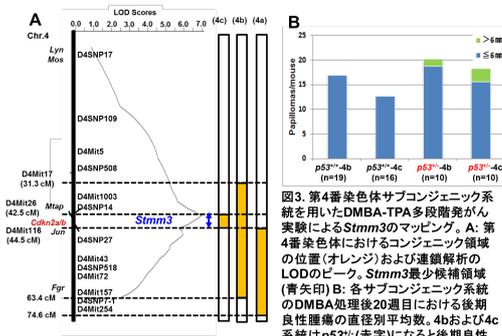


図3. 第4番染色体サブコンジェニック系統を用いたDMBA-TPA多段階発がん実験による *Stmm3* のマッピング。A: 第4番染色体におけるコンジェニック領域の位置(オレンジ)および連鎖解析の LOD のピーク。 *Stmm3* 最少候補領域(青矢印) B: 各サブコンジェニック系統のDMBA処理後20週目における後期良性腫瘍の直径別平均数。4bおよび4c系統は $p53^{+/+}$ (赤字) になると後期良性腫瘍の発生が認められる。

短期間 TPA 処理による *Stmm3* コンジェニックマウスの表皮細胞の細胞周期解析

Stmm3 の候補遺伝子である $p19^{Arf}$ は細胞周期を制御し、がん抑制に関与することが、ノックアウトマウスの解析から明らかになっている。一方、2005 年の Inoue らの報告から、ヒト $p14^{Arf}$ において、TPA 刺激により活性化された PKC を介して $p14^{Arf}$ が安定化することが細胞レベルで報告されている(文献 4)。そこで、*Stmm3* のコンジェニックマウスを用いて、短期間の TPA 刺激を与えた場合の表皮細胞の動態解析を実施した。野生型群として FVB マウス、対象群としてサブコンジェニック $p53^{+/+}$ -4c 系統を用い、背部皮膚に TPA 処理することで表皮細胞の変化を組織学的に解析した。その結果、TPA 処理後 2 日目で表皮の肥厚が認められたが、野生型および $p53^{+/+}$ -4c 系統間での有意な違いは認められなかった。次に、細胞増殖マーカーである抗 Ki67 抗体を用いて蛍光免疫組織染色を行った結果、TPA 処理後 8 日目においては Ki67 陽性細胞が野生型において 58.4 ± 14.4 ($n=5$) であったのに対し、 $p53^{+/+}$ -4c 系統において 26.2 ± 4.3 ($n=5$; $p=0.0028$)、10 日目においては

野生型において 25.8 ± 7.3 ($n=5$) であったのに対し、 $p53^{+/+}$ -4c 系統で 6.2 ± 2.9 ($n=5$; $p=0.0062$) と有意に減少していることが認められた(図 4A および B)。次に細胞周期解析を PI 染色法により FACS セルソーターを用いて実施した。その結果、TPA 未処理、TPA 処理後 8 および 10 日目の野生型と $p53^{+/+}$ -4c 系統間において有意な差は認められなかった(図 4C)。しかし、TPA 処理後 2 日目の野生型においては G_0/G_1 期の細胞の割合が 58.7% であったのに対し、 $p53^{+/+}$ -4c 系統では 74.9%、S 期の細胞の割合は野生型において 23.2%、 $p53^{+/+}$ -4c 系統において 9.7% であり、野生型と比較して G_0/G_1 期の細胞の割合が増加し、それに伴い S 期の細胞の割合が減少していた(図 4C)。これらの結果から、MSM アレルの *Stmm3* 遺伝子座に存在する原因遺伝子は TPA 処理による表皮細胞の細胞増殖能を抑制し、細胞周期における G_1 期停止を誘導していることが考えられ、細胞における $p19^{Arf}$ の機能とよく一致する。よって $p19^{Arf}$ が *Stmm3* の原因遺伝子である可能性をより支持する結果であった。

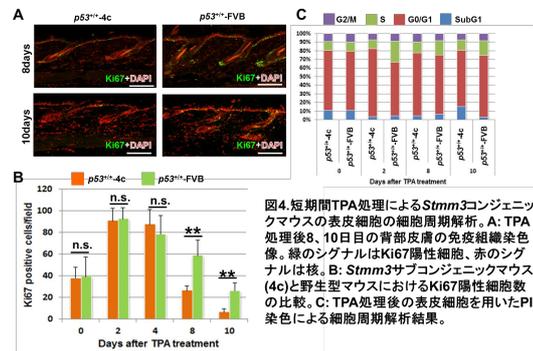


図4. 短期間TPA処理による *Stmm3* コンジェニックマウスの表皮細胞の細胞周期解析。A: TPA 処理後8、10日目の背部皮膚の免疫組織染色像。緑のシグナルはKi67陽性細胞、赤のシグナルは核。B: *Stmm3* サブコンジェニックマウス(4c)と野生型マウスにおけるKi67陽性細胞数の比較。C: TPA処理後の表皮細胞を用いたPI染色による細胞周期解析結果。

Pth トランスジェニックマウスを用いた DMBA/TPA 多段階皮膚発がん実験

Stmm1 領域のコンジェニックマッピングの結果から、*Stmm1 b* 遺伝子座の最有力候補遺伝子として、副甲状腺ホルモン *Pth* に着目した。*Pth* 周辺領域をカバーする MSM-BAC クロノンを FVB に導入したトランスジェニックマウス (MSM-*Pth*⁺) を作製した。*Pth* は生体内カルシウム恒常性に重要なホルモンである。そこで、これらのマウスの血清カルシウム量および intact-*Pth* 量を OCPC 法および ELIZA 法により測定した結果、血清カルシウム量に有意な差はなく、intact-*Pth* 量が MSM-*Pth*⁺ の方が同腹仔の野生型マウスよりも約 2 倍多いことが明らかとなった。それらのマウスを用いて発がん実験を行った結果、DMBA 処理後 20 週目において MSM-*Pth*⁺ の平均良性腫瘍数は 19.1 ± 10.2 であり、同腹仔の野生型は 33.8 ± 15.7 であり、良性腫瘍数が有意に低下していた(図 5A および B、 $p < 0.01$)。これらのことから、*Pth* が皮膚腫瘍形成に何らかの影響を与えている可能性が予測され、*Stmm1b* の有力な候補遺伝子であることが示唆された。

今後は *Pth* および $p19^{Arf}$ の MSM および FVB アレル高発現細胞株を用いた解析を行い、それぞれの SNP がどのような機能を持つのか

明らかにしていきたい。さらに、それと並行して、ヒトにおけるアソシエーションスタディ・データとも統合していくことで、孤発性がん感受性/抵抗性に関与するヒト SNP の同定を行うことが重要である。

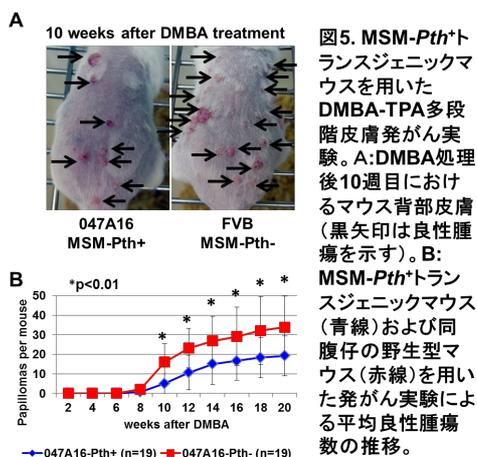


図5. MSM-Pthトランスジェニックマウスを用いたDMBA-TPA多段階皮膚がん実験。A:DMBA処理後10週目におけるマウス背部皮膚(黒矢印は良性腫瘍を示す)。B: MSM-Pth⁺トランスジェニックマウス(青線)および同腹仔の野生型マウス(赤線)を用いたがん実験による平均良性腫瘍数の推移。

【引用文献】

- I. Okumura, K. *et al.* Independent genetic control of early and late stages of chemically induced skin tumors in a cross of a Japanese wild-derived inbred mouse strain, MSM/Ms. *Carcinogenesis*. 2012, **11**: 2260-8.
- II. Nagase, H. *et al.* Distinct genetic loci control development of benign and malignant skin tumors in mice. *Nat Genet*. 1995, **4**: 424-29.
- III. Takeuchi, S. *et al.* Intrinsic cooperation between p16INK4a and p21Waf1/Cip1 in the onset of cellular senescence and tumor suppression in vivo. *Cancer Res*. 2010, **22**: 9381-9390.
- IV. Inoue, R. *et al.* PKCalpha is involved in phorbol ester TPA-mediated stabilization of p14ARF. *Biochem Biophys Res Commun*. 2005, **4**: 1314-1318.

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2件)

- I. Okumura K., Saito M, Isogai E, Miura I, Wakana S, Kominami R, Wakabayashi Y. Congenic mapping and allele-specific alteration analysis of *Stmm1* locus conferring resistance to early-stage chemically induced skin papillomas. *PLoS One*. 2014, **11**: e97201. 査読有り
- II. Saito M, Okumura K., Miura I, Wakana S, Kominami R, Wakabayashi Y. Identification of *Stmm3* locus conferring resistance to late-stage chemically induced skin papillomas on mouse chromosome 4 by congenic mapping and allele-specific alteration analysis. *Exp Anim*. 2014,

3:339-348. 査読有り

〔学会発表〕(計4件)

- I. 第60回日本実験動物学会年会・MSM/Ms系統における皮膚がん抵抗性遺伝子座のコンジェニックマッピングとアレリンバランス解析(奥村和弘)つくば
- II. 第27回モロシヌス研究会・MSM/Msにおける発がん抵抗性遺伝子の探索(奥村和弘)つくば
- III. 第37回分子生物学会年会・MSM/Msにおける発がん抵抗性遺伝子の探索(奥村和弘)横浜
- IV. 第28回モロシヌス研究会・MSMから同定された皮膚がん抵抗性遺伝子座 *Stmm1* の遺伝学的解析(奥村和弘)静岡

〔図書〕(計0件)

〔産業財産権〕

○出願状況(計0件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
出願年月日：
国内外の別：

○取得状況(計0件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
出願年月日：
取得年月日：
国内外の別：

〔その他〕

ホームページ等

6. 研究組織

(1) 研究代表者

奥村 和弘 (OKUMURA, Kazuhiro)
千葉県がんセンター研究所・実験動物研究室・客員研究員
研究者番号：80584680

(2) 研究分担者

()
研究者番号：

(3) 連携研究者

若林 雄一 (WAKABAYASHI, Yuichi)
千葉県がんセンター研究所・実験動物研究室・室長
研究者番号：40303119