

科学研究費補助金研究成果報告書

平成22年5月31日現在

研究種目：特定領域研究

研究期間：2005～2009

課題番号：17012018

研究課題名（和文） 発生と発がんのフロンティア研究

研究課題名（英文） Frontier studies in development and cancer

研究代表者

山村 研一（YAMAMURA KENICHI）

熊本大学・生命資源研究・支援センター・教授

研究者番号：90115197

研究成果の概要（和文）：可変型遺伝子トラップ法を用いてトラップクローンを単離し、約800クローンについてトラップ遺伝子と挿入部位を確定し、EGTCデータベースを構築した。日本産野生マウス MSM/Ms から ES 細胞の樹立に成功した。Cre-変異 lox を用いて、遺伝子の挿入ができるシステムを構築した。Abhd2 遺伝子は、血管平滑筋の遊走、単球からのマクロファージへの分化に関与することを明らかにした。Skt 遺伝子は、脊索や椎間板で発現し尾椎形成に関与することを明らかにした。Lgr4 は、精巣上体および胆嚢の発生に関与することを明らかにした。Spink3 遺伝子はオートファジーの抑制、EGFR を介して細胞増殖作用を有することを明らかにした。

研究成果の概要（英文）：We carried out gene trap mutagenesis using the exchangeable gene trap method and 800 gene trap clones with information of gene names and insertion sites were deposited to EGTC bank and database. The germ-line competent ES cell lines derived from the Japanese wild mouse, MSM/Ms, was established. We developed the exchangeable gene targeting method using Cre-mutant lox system. We demonstrated that the Abhd2 gene, the Skt gene, the Lgr4 gene, and the Spink3 gene are involved in migration of smooth muscle cells and differentiation of monocyte into macrophage, in tail vertebrate formation, development of epididymidis and gall bladder, and in inhibition of autophagy and cell proliferation through EGFR pathway, respectively.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2005年度	16,500,000	0	16,500,000
2006年度	16,600,000	0	16,600,000
2007年度	16,600,000	0	16,600,000
2008年度	16,600,000	0	16,600,000
2009年度	16,600,000	0	16,600,000
総計	82,900,000	0	82,900,000

研究分野：発生遺伝学

科研費の分科・細目：

キーワード：遺伝子トラップ、Abhd2、Spink3、Atg5、条件的遺伝子破壊、オートファジー

1. 研究開始当初の背景

| (1) がん研究に有用な遺伝子破壊マウスの

作製に関する方法論の開発及び遺伝子破壊マウス作製

遺伝子破壊の方法として、相同組換え法以外に遺伝子トラップ法があるが、この方法ではランダムに遺伝子を破壊できるので効率が良く、この方法でどの程度がん関連遺伝子を発見し、破壊できるのかが不明であった。ES 細胞を用いた相同組換え法による遺伝子破壊マウスの作製法はほぼ確立していたが、マウス遺伝子を興味のある遺伝子に置換する方法は必ずしも十分ではなかった。また、ES 細胞の樹立にしても、129 系統や BCF1 系統由来のものは広く流布していたが、それ以外の系統の ES 細胞はまだあまり樹立されていなかった。

(2) 発生と発がんの接点に関する研究

発生とは、細胞の増殖と分化、細胞の有機的な相互作用による形態形成、成長と定義されるが、「がん」は、個体の中で、みずからの世界を構築するために、同様のことを行っていると考えられる。したがって、発生段階で機能している遺伝子は、発がんにおいても何らかの役割を果たしていることが多いと考えられる。発生段階で機能する遺伝子をランダムに選択し、それがどの程度の確率でがんと関与するかを検討する研究も必要である。この方法により、仮説検証型の研究ではたどりつかない遺伝子が、実は「がん」と深く接点を持つことを発見できると考えられた。

2. 研究の目的

(1) がん研究に有用な遺伝子破壊マウスの作製に関する方法論の開発及び遺伝子破壊マウス作製

遺伝子トラップ法による遺伝子トラップクローンの単離をすすめ、トラップした遺伝子の情報等も含め、データベース上で公開し、これらのリソースを研究者に対してオープンにする。

日本産野生マウス MSM/Ms は *Mus Musculus Molossinus* に属し、*Mus Musculus Domesticus* に属する通常よく用いられる実験用近交系マウスとは、約 100 万年前に分離し、ゲノム配列が約 1%異なっている。さらに、ウレタンによる肺がん抵抗性であることも知られ、がんの発生の研究にも有用であると示唆されている。そこで、MSM/Ms から ES 細胞を樹立する。

また、バクテリオ P1 フェージ由来の組換えシステムである Cre-loxP を用いて、遺伝子置換法を確立することも目的とした。

(2) 発生と発がんの接点に関する研究

遺伝子トラップ法により単離した、Abhd2、Skt、Lgr4 について機能解析とがんとの関連

性の解析を行う。

またトリプシンインヒビターである Spink3 遺伝子についての機能解析とがんとの関連性の解析を行うことを目的とした。

3. 研究の方法

(1) がん研究に有用な遺伝子破壊マウスの作製に関する方法論の開発及び遺伝子破壊マウス作製

遺伝子トラップベクター-pU17 等により遺伝子トラップを行い、1 コピーのトラップベクターが挿入される頻度、トラップする遺伝子の種類等、遺伝子トラップ法の効率を検討する。これらのデータをデータベース上で公開する。

トラップベクター内の、lox71-薬剤耐性遺伝子 loxP がマウスゲノム上に組み込まれたのち、この薬剤耐性遺伝子を、置換ベクターにより興味のある遺伝子に効率よく置換できるかどうかを、すでに得られているトラップクローンを用いて解析する。

MSM/Ms マウスから胚盤胞を理研 BRC より入手し、通常の方法で ES 細胞の樹立を試みる。その後、キメラマウスにはどの系統由来の受容胚が適しているかを検討し、効率よい生殖キメラ作製法を確立する。また、この ES 細胞を用いて遺伝子トラップを行い、単一コピー組み込まれる頻度、トラップした遺伝子、トラップ後の生殖系列への伝達率について検討を行う。

(2) 発生と発がんの接点に関する研究

Abhd2、Skt、Lgr4 がトラップされている ES クローンから、それぞれの遺伝子のノックアウトマウスを作製し、表現型解析を行うことにより機能を明らかにするとともに、これらの遺伝子と発がんとの関連性を文献的に考察する。

4. 研究成果

(1) がん研究に有用な遺伝子破壊マウスの作製に関する方法論の開発及び遺伝子破壊マウス作製

遺伝子トラップベクター-pU21 等を用いて遺伝子トラップを行い、トラップベクターが 1 コピー組み込まれたクローンを選別した。この中で、トラップされた遺伝子が同定でき、その染色体上の遺伝子が同定できたもの約 800 クローンについて、その情報を EGTC (Exchangeable Gene Trap Clone) として公開した。

MSM/Ms 由来の ES 細胞の樹立に成功した。また、受容胚として、B6xBFF1 由来のものを用いることにより効率よく生殖キメラが作製できることを明らかにした。

相同組換えベクターとして、lox71-neo 耐

性遺伝子-loxP-polyA の構造を入れておき、第1段階で相同組換えを行うとこのカセット

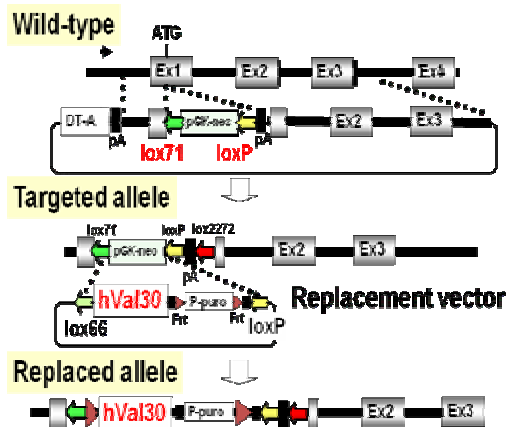


図1. 可変型相同組換えによる遺伝子置換

がゲノム上に組込まれる。そして、第2段階で置換ベクターを作製するが、この時 lox66-挿入したい遺伝子の cDNA-loxP を組み込んでおけば、lox71 と lox66 および loxP と loxP 間で組換えが起こり、挿入したい遺伝子をマウスゲノム上に挿入できることが明らかとなった(図1)。

(2) 発生と発がんの接点に関する研究

Abhd2 (/ hydrolase domain containing 2) 遺伝子は、肺気腫の組織から発現が低下している遺伝子として単離され、加水分解酵素に見られる / hydrolase domain を有している。この遺伝子は、発生段階では血管平滑筋で発現すること、血管平滑筋細胞の移動能が上昇していることを見出した。そこで、in vivo での機能解析を目的にマウス大腿動脈に cuff placement 刺激を与えたところ、血管平滑筋の遊走による新生内膜肥厚が誘導されることが分かった(図2)。

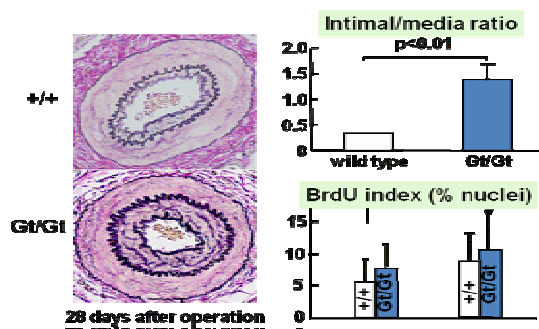


図2. Abhd2 欠損マウスにおける新生内膜肥厚

そこで、ヒト狭心症患者の冠状動脈での発現を見たところ、発現亢進が見られ、それはマクロファージであることを見出した。さらに単球細胞を用いた分化誘導実験から、単球からのマクロファージへの分化に伴って、

Abhd2 の発現が上昇することを明らかにした。

Skt (Sickle tail) のホモ欠損マウスは、kinky tail を示した(図3)。そこで、発生段階での発現を解析したところ、notochord とその誘導体である椎間板での発現を確認した。kinky tail の原因としては、胎生17日目ごろからの椎間板の変性に起因することが分かった。遺伝子を単離したところ、第2番染色体上の Sd 座位の約 1Mb 付近にあり、proline rich region と coiled-coil domain を持つことが分かった。



図3. Skt 変異マウスにおける尾椎異常

Lgr4 (Leucine-rich domain containing G-protein coupled receptor 4) は細胞外ドメインに leucine-rich repeat を 17 個も持ち、まだリガンドが同定されていない GPCR である。トラップマウスの解析から、精巣上体の initial segment が欠損していること、basement membrane の remodeling を通して精巣上体の発生に関与することを明らかにした(図4)。

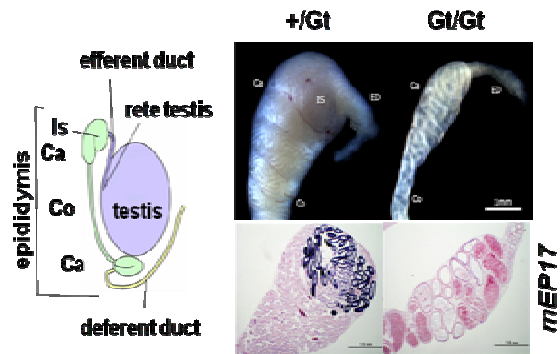


図4. Lgr4 欠損マウスの精巣上体の異常

また、Lgr4 は胆嚢上皮で発現していること、その欠損マウスでは、胆嚢芽葉は形成されるが、その後の伸長はなく、また胆嚢周辺の間葉組織も消失していることを見出した。がん細胞の浸潤と転移に関与することが Gao らにより報告され、がんとの接点が浮かび上がっている。

Spink3 (Serine protease inhibitor, Kazal type 3) は、トリプシンインヒビターとして発見された。その後の、膵炎患者の association study で、遺伝子変異との間で連関が認められている。しかし、in vivo での活性は不明である。そこで、先ずノックアウトマウスを作製し膵炎が発症するかどうかを解析した。ところが、マウスは生後2週

間までに死亡し、肉眼的には膵炎は認められず、変性と消失が観察された。そこで、電顕で観察したところ、オートファジーが誘導されていることが分かった(図5)。

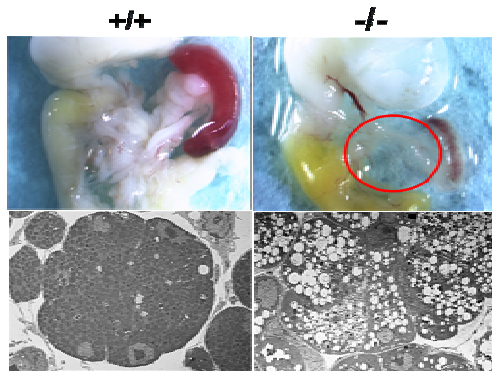


図5. Spink3 欠損マウスにおける膵臓の消失とオートファジーの誘導

しかし、予想されたトリプシンの活性化は極めてわずかであり、Spink3 はオートファジーを直接制御していると考えられた。オートファジーの役割を解析するため、セルレイン膵炎の系で解析したところ、この系においてもオートファジーは誘導されることが分かった。そこで、Atg5 遺伝子を膵腺房細胞特異的に破壊し、オートファジーが起こらないようにしたところ、膵炎は軽症化した。その原因を探るため、トリプシノーゲンの活性化状態を解析したところ、オートファジーがない状態では、活性が起こりにくいことを発見した。このことは、オートファジーがトリプシンの活性化に関与していることを示唆している。このことから、トリプシン活性化におけるオートファジー説を提唱した。一方、Spink3 は、細胞増殖作用を有していることが報告されているが、そのリセプターと下流のシグナルについて不明であった。そこで、その同定を試みたところ、EGFR と結合すること、ただし、EGF の約半分程度の親和性であること、細胞増殖には MAP kinase pathway が関与することを発見した。

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10件)

Ozaki, N., Ohmuraya, M., Hirota, M., Ida, S., Wang, J., Takamori, H., Higashiyama, S., Baba, H. and Yamamura, K. Serine protease inhibitor, Kazal type 1, promotes proliferation of pancreatic cancer cells through the epidermal growth factor receptor. *Mol. Cancer Res.* 7巻, 2009, 1572-1581

Yamashita, R., Takegawa, Y., Sakumoto, M., Nakahara, M., Kawazu, H., Hoshii, T., Araki, K., Yokouchi, Y. and Yamamura, K. Defective development of the gall bladder and cystic duct in *Lgr4*-hypomorphic mice. *Mechanism Dev.* 238巻, 2009, 993-1000

Araki, K., Takeda, T., Yoshiki, A., Obata, Y., Nakagata, N., Shiroishi, T., Moriwaki, K. and Yamamura, K. Establishment of germline-competent embryonic stem cell lines from the MSM/Ms strain. *Mammal. Genome* 20巻, 2009, 14-20

Hashimoto, D., Ohmuraya, M., Hirota, M., Yamamoto, A., Suyama, K., Baba, H., Araki, K., Mizushima, N. and Yamamura, K. Involvement of autophagy in trypsinogen activation. *J. Cell Biol.* 181巻, 2008, 1065-1072

Miyata, K., Nakayama, M., Mizuta, S., Hokimoto, S., Sugamura, K., Oshima, S., Oike, Y., Sugiyama, S., Ogawa, H. and Yamamura, K. Elevated expression of human ABHD2 gene in mature macrophage in vulnerable plaques. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 365巻, 2008, 207-213

Hoshii, T., Takeo, T., Nakagata, N., Takeya, M., Araki, K. and Yamamura, K. LGR4 regulates the postnatal development and integrity of male reproductive tracts in mice. *Biol. Reprod.* 76巻, 2007, 303-313

Ohmuraya, M., Hirota, M., Araki, K., Baba, H. and Yamamura, K. Enhanced trypsin activity in pancreatic acinar cells deficient for serine protease inhibitor Kazal type 3. *Pancreas* 33巻, 2006, 104-106

Semba, K., Araki, K., Li, Z., Matsumoto, K., Suzuki, M., Nakagata, N., Takagi, K., Takeya, M., Yoshinobu, K., Araki, M., Imai, K., Abe, K. and Yamamura, K. A novel murine gene, *Sickle tail (Skt)*, linked to the *Danforth's short tail (Sd)* locus, is required for normal development of the intervertebral disc. *Genetics* 172 巻, 2006, 445-456

Ohmuraya, M., Hirota, M., Araki, M., Mizushima, N., Matsui, M., Mizumoto, T., Haruna, K., Kume, S., Takeya, M., Ogawa, M., Araki, K. and Yamamura, K. Autophagic cell death of pancreatic acinar cells in serine protease inhibitor Kazal Type 3 deficient mice. *Gastroenterology* 129 巻, 2005,

696-705.

Miyata, K, Oike, Y, Hoshii, T, Maekawa, H, Ogawa, H, Suda, T, Araki, K, and Yamamura, K. Increase of smooth muscle cell migration and of intimal hyperplasia in mice lacking the abhydrolase domain containing 2 gene. Biochem Biophys Res Commun. 査読あり、329 巻, 2005, 296-304

〔学会発表〕(計5件)

Yamamura, K., Araki, K.: MMS/Ms mouse as a tool for humanized mouse project in Japan, Fourth meeting on Asian Mouse Mutagenesis and Resource Association, December 17, 2009, Kumamoto

Yamamura, K.: Pancreatic Acinar Cell Death In Spink3 Deficient Mice, 40th Anniversary Joint Meeting of the American Pancreatic Association & Japan Pancreas Society, November 6, 2009, Hawaii

山村研一: ヒト疾患の遺伝学的解析のためのモデルマウス(シンポジウム), 日本人類遺伝学会第53回大会 2008.9.2, 横浜

山村研一: ヒト疾患研究における動物モデルの有用性と世界の現状(教育講演2), 第52回大会日本人類遺伝学会 ゲノム解析から臨床応用へのロードマップ, 2007.9.14, 東京

Ken-ichi Yamamura: Exchangeable gene trap as a tool in the mouse knockout project(symposium), The 12th International Symposium for Mouse Genomics The BK21 International Symposium of Veterinary Science, Seoul National University, 2007.5.15, Korea

〔図書〕(計2件)

山村研一: ES 細胞 研究の歴史、最新医学増刊号 vol.64:497-505, 2009

山村研一: 学問領域としての「発生医学」の曙光期 日本における発生工学の黎明と「発生医学」への展開、再生医療 vol.8 No.4:394-400, 2009

〔産業財産権〕

出願状況(計0件)

取得状況(計2件)

名称: トラップベクターおよびこれを用いた遺伝子トラップ法

発明者: 山村研一、荒木喜美

権利者: 株式会社トランスジェニック

種類: 特許

番号: EP1201759

取得年月日: 平成22年3月10日

国内外の別: 国外(欧州)

名称: トラップベクターおよびこれを用いた遺伝子トラップ法

発明者: 山村研一、荒木喜美

権利者: 株式会社トランスジェニック

種類: 特許

番号: US7312075

取得年月日: 平成19年12月25日

国内外の別: 国外(米国)

〔その他〕

ホームページ等

<http://www.irida.kumamoto-u.ac.jp/>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

山村 研一 (YAMAMURA KENICHI)

熊本大学・生命資源研究支援センター・教授

研究者番号: 90115197

(2) 研究分担者

なし

(3) 連携研究者

川上 穰(KAWAKAMI MINORU)

熊本大学・発生医学研究所・助教

研究者番号: 40363527