

平成 22 年 5 月 15 日現在

研究種目：基盤研究(A)
 研究期間：2006～2009
 課題番号：18201009
 研究課題名（和文）
 放射線発がんプロセスにみられる遺伝子異変と発がん宿主要因の遺伝解析
 研究課題名（英文）
 Host factors and genetic mutations in radiation carcinogenesis
 研究代表者
 木南 凌 (KOMINAMI RYO)
 新潟大学・医歯学系・教授
 研究者番号：40133615

研究成果の概要（和文）：研究成果の概要：放射線照射は胸腺細胞の減少と萎縮をもたらすが、その萎縮した胸腺環境の中に、リンパ腫へと進展する発がん前駆体細胞が発生する。この前駆体細胞の特徴、関連する遺伝子を明らかにした。クローナル増殖が第一の特色であるが、分化能を保持したものと消失した細胞が存在し、分化停止には *Bcl11b* が関与する。興味深いことに、この *Bcl11b* は腸管腫瘍発症の修飾遺伝子としても働く。さらに、発がん促進因子として *Sirt4* を候補遺伝子とした。

研究成果の概要（英文）：The mouse thymus at one month after γ -irradiation shows decrease in thymocyte number and probably harbors premalignant cells, some of which eventually develop thymic lymphomas. We have characterized properties of the premalignant cells in the atrophic thymus. There are two distinct populations of clonally growing thymocytes, one being thymocytes that retain the capacity to differentiate and the other having lost their ability to differentiate. *Bcl11b* tumor suppressor affects this differentiation capacity. Of interest is that the former thymocytes possess the stem cell properties, the capacity to self renew and differentiate into multiple cell lineages. Furthermore, *Sirt4* has been identified as a candidate for lymphoma susceptibility gene.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2006年度	16,700,000	5,010,000	21,710,000
2007年度	7,800,000	2,340,000	10,140,000
2008年度	7,800,000	2,340,000	10,140,000
2009年度	7,800,000	2,340,000	10,140,000
年度			
総計	40,100,000	12,030,000	52,130,000

研究分野：複合新領域

科研費の分科・細目：2003

キーワード：発がん感受性：電離放射線影響：前リンパ腫細胞・腸管腫瘍：Bcl11b 遺伝子

1. 研究開始当初の背景

電離放射線で誘発されるマウス胸腺リンパ腫は代表的な放射線発がん研究モデルであり、放射線の発がん作用が間接的であるとの示唆を与えた歴史的な系である。放射線はDNAに直接作用し、DNA損傷を与えることが

できるため、この傷害作用こそが発がんの原因であると考えられてきた。しかし、Kaplanらは移植実験により、照射は胸腺の内部環境を変え、その結果胸腺で生育する胸腺細胞ががん化に導くという説（間接説）を提唱した。しかしながら、この提示された問題（直接説

と間接説)への分子生物学的説明、すなわち放射線発がんプロセス、がん細胞と宿主組織との相互依存性についての理解は進んでいない。そこで、放射線照射より誘発される前リンパ腫細胞の同定およびその性質の解明を試みてきた。萎縮胸腺内細胞の大部分はすでにクローナルな増殖をし、しかも大型化していることが分かってきた。

2. 研究の目的

放射線誘発リンパ腫を対象に、多段階発がん機構、個々の段階での放射線影響を明らかにする。具体的には、関与するがん抑制遺伝子を単離し、発がんのどの段階で変異を受け、発がんに寄与するかを、組織の微小環境を視野に入れ検討する。この目標達成のために、以下の具体的な目的を定めた。

(1) 照射後萎縮胸腺に存在する前リンパ腫細胞の特色を明らかにする。

(2) 5 番染色体上のがん感受性遺伝子を同定する。候補領域を 104.6Mb - 115.5Mb にまでに限定してきた。詳細なコンジュニックマウスを作製し、発がん実験を行う。その結果を参考に候補遺伝子を探索し、多型(変異)を検出する。また、その遺伝子機能、発がんへの関与を検討する。

(3) Min マウスに発生する腸管腫瘍への Bcl11b 遺伝子型と放射線照射の影響について検討する。Bcl11b-KO ヘテロマウスを交配し、Min(+)/Bcl11b-KO/+マウスを得、そのマウスの生後 2 週および 7 週に 3Gy ガンマ線を照射し、腸管腫瘍発症への放射線影響を解析する。

3. 研究の方法

(1) 発がん実験: BALB/c コンジュニックマウスを MSM マウスと交配し、そのプロジェニーに対して γ 線、2.5Gy を 4 回照射した。また、3Gy を 1 回照射するという条件も用いた。胸腺リンパ腫の発症は努力呼吸で判定した。

(2) FACS による細胞解析: CD4、CD8 発現の測定は一般的な方法に従った。胸腺細胞の大きさ、細胞周期の測定には、まず BrdU をマウスに投与し、1 時間後に胸腺(または胸腺リンパ腫)を取り出し、胸腺細胞を採取した。胸腺細胞を DNA 量と BrdU 取り込み量とを指標に FACS で 2 次元に展開し、G1 期分画、S 期分画、G2/M 期分画に分けた。次にそれぞれの分画にある細胞の大きさは FSC 値をもとに測定した。

(3) V(D)J 組換え型の決定: D1 領域と D2 領域の 5' 側にそれぞれ F-primers を設定し、一方 J1 領域と J2 領域の 3' 側にそれぞれ R-primers を設定した。PCR 反応は 3 種類のプライマーの組み合わせ、すなわち F-D1 R-J1、F-D2 R-J2、F-D1 R-J2 のプライマーセットで行った。PCR 産物の分離、解析にはポリア

クリルアミドゲル電気泳動を用いた。

(4) 遺伝子型の決定および野生型アレル消失の判定。遺伝子型の決定にはそれぞれ適当なプライマーセットを用いて PCR 法を用いた。コンジュニック領域の決定には MIT マーカーを WEB サイトから選択し、利用した。一方、胸腺細胞のクローナル増殖の有無には DJ 組み換えパターンを PCR 法で判別し、決定した。

4. 研究成果

(1) リンパ腫前駆体細胞の解析:

放射線誘発萎縮胸腺に存在する前リンパ腫細胞の解析を行った。野生型マウスに分割照射を行い、その 40 日後、80 日後の萎縮胸腺、それぞれ 95、43 のサンプルを用い、解析した。

①クローナル増殖と Bcl11b アレル消失: クローナル増殖を検討するため、DJ 組み換えアッセイを行った。照射後 40 日の萎縮胸腺では 95 胸腺の内、43 が単一の DJ 組換えパターン、すなわちクローナル増殖を示唆する組換えパターンを示した(C type とする)。また、52 が正常胸腺細胞と類似の DJ 組換えパターン(T type とする)を示した。前者が示唆するクローナル増殖は前リンパ腫細胞の一つの特色と考えられる。一方、CD4、CD8 胸腺細胞分化マーカーの発現測定では多くの細胞がダブルポジティブ(DP)細胞から成っていた。クローナル増殖を示す C type 胸腺細胞が DP 細胞であるという結果は、C type 細胞は DP 段階で分化を停止し、胸腺内に留まっていることを示唆する。

クローナル増殖という性質を付与する一つの要因に、遺伝子変化が考えられる。そこで、Bcl11b 遺伝子座のアレル消失(LOH)解析を行った。95 サンプル中、38 が Bcl11b アレル消失パターンを示し、残りの 57 には変化がみられなかった。すなわち、C type 胸腺で 49%(21/43)に、T type 胸腺では 33%(17/52)に LOH が観察された。C type 胸腺細胞はすでにクローナルな細胞集団なので、高頻度に LOH が観察されることは想像の範囲内であったが、T type でも高頻度に LOH が検出されたのは予想外の結果であった。T type 細胞は色々な DJ 組換えパターンを示すことから、まだ分化能を保持していると考えられる。従って、これらの LOH(+) T type 細胞では Bcl11b のアレル消失が DJ 組換え前のプロジェニター細胞内で起こり、それがクローナル増殖を引き起こしていることを示唆する。

②分化能保持とクローナル増殖: 照射後 40 日と 80 日の萎縮胸腺で LOH(+) T type 細胞の割合を比較したところ、40 日では T type の LOH が 33%であったのに対し、80 日のそれは 5%(1/22)と有意に減少していた。一方、C type 胸腺では LOH の頻度に 40 日と 80 日では差がみられなかった。80 日での LOH(+) T

type 細胞の減少は、40 日で検出された LOH(+) T type 細胞が正常に分化し、成熟 T 細胞となって末梢へ移出してしまっただけにと考えられる。このシナリオに従えば、照射後 40 日から 80 日の間に骨髄から新しく胸腺に供給される造血系幹細胞は変異をもたず、胸腺内の変異をもった前駆細胞はそれに置き換えられていったと考えられる。一方、LOH(+) C type 細胞の割合は一定もしくはやや増加していたので、これらの前がん細胞は胸腺内に留まっていたと考えられる。分化能を保持し、クローナル増殖を示す血液前がん細胞として CML が知られており、そのモデルとしての可能性を示す。

③ Bcl11b 機能低下による異常増殖細胞出現の促進：放射線照射後早い段階の萎縮胸腺にクローナルな細胞由来の異常増殖細胞が出現し、その細胞は *Bcl11b* の LOH がみられる。これは、*Bcl11b* 遺伝子の機能低下が胸腺リンパ腫の発症過程に重要な役割を果たすと考えられる。実際、*Bcl11b*^{KO/+} マウスはリンパ腫感受性を示す。そこで、*Bcl11b*^{KO/+} マウスに 3Gy 1 回のガンマ線照射を行い、照射後 40 日と 80 日の萎縮胸腺細胞の解析を行った。その結果、分割照射した野生型マウスの解析結果と同様に、クローナル増殖を示し、DP 分化段階まで分化した異常増殖細胞が約半数に見られ、その頻度は照射後の日数により増加する傾向があった。一方、照射後 80 日の萎縮胸腺では、分化が未分化な (CD4-CD8-) DN 段階で停止している胸腺細胞が約半数にみられ、照射後 40 日萎縮胸腺でもその一部に見られた。すなわち、分化停止した胸腺細胞の出現は、照射後時間が経つにつれて増加した。したがって、*Bcl11b* 機能低下はリンパ腫発症過程で分化を停止働きのあることがわかった。

④ 細胞増殖の亢進と DNA 複製ストレスチェックポイント制御：DNA 複製ストレスはこのチェックポイントに関与する γ -H2AX、Chk1、Chk2、p53 の活性化をウエスタンブロット法でみた。 γ -H2AX、Chk1、Chk2、p53 の活性化、すなわちリン酸化の亢進はみられず、DNA 複製ストレスおよびそのチェックポイントは働いていないことを示唆する。総合すると、照射後萎縮胸腺の前リンパ腫細胞は、ヒト前がん組織の特徴として知られている細胞増殖亢進、DNA 複製ストレスという重要な特色を示さないことが分かった。

(2) 第 5 番染色体上の発がん抵抗性遺伝子領域のマッピングと候補遺伝子の検索：

最初に 4 種類のコンジェニックマウスを作製し、発がん実験を行った。その結果、候補領域を 104.47Mb から 116.12Mb にまで限定することができた。さらに Line-J1 (98.11Mb-112.32Mb) 系統と Line-J2 (98.11Mb-104.59Mb) 系統という 2 種類のコンジェニックマウスを作製し、発がん実験を

行った。J1 では γ 線照射した F1 マウス 93 頭中、50 頭が胸腺リンパ腫発症、33 頭がリンパ腫未発症、10 頭が不明死であった。また J2 では、F1 マウス 103 頭中 55 頭が胸腺リンパ腫発症、36 頭がリンパ腫未発症、12 頭が不明死であった。Kaplan-Meier 解析の結果、J1、J2 ともに、コンジェニック領域が C/M 遺伝子型でも M/M 遺伝子型でも発がん頻度に有意差はみられなかった。これらの結果から、感受性遺伝子候補領域は 98.11Mb-112.32Mb には存在せず、5 番染色体上の約 4Mb (112.32Mb-116.12Mb) に存在することが明らかになった。従って、当初の 12Mb (104.47Mb-116.12Mb) よりも 8Mb 短い領域に限定された。

そこで、この 112.32Mb-116.12Mb 領域内に存在する遺伝子の中で、BALB/c と MSM 系統で多型のみられる遺伝子をマウスデータベースから探索した。このとき、MSM と系統の近い MOLF の SNP 情報を MSM とみなして比較した。その結果、Ssh1 (protein phosphatase Slingshot homolog 1) と Sirt4 (NAD-dependent deacetylase sirtuin-4) が候補遺伝子として選択された。Ssh1 では 1042 個中 1034 番目のアミノ酸が MOLF や C57BL/6 では serine、BALB/c では asparagine になっていることが報告されていた。MSM 系統の塩基配列を決定し、MSM でもこの多型が存在することを確認した。しかし、Ssh1-KO マウスは重篤な病的表現型を示さないことから、候補遺伝子としての期待度は高くはない。一方 Sirt4 では 333 個中 106 番目のアミノ酸が BALB/c や C57BL/6 では leucine、MOLF では終止コドンとなっていることが報告されていた。同様に MSM の配列決定を行い、この多型の存在が間違いないことを確認した。前者では 1042 個中 1034 番目のアミノ酸置換が、後者では 333 個中 106 番目のアミノ酸が終止コドンとなっていた。この変異は UniProt 解析からタンパク質の機能に直接影響を及ぼす可能性の高い nonsynonymous SNPs であり、Sirt4 が感受性遺伝子の候補であることが分かった。

(3) *Bcl11b* 遺伝子型と放射線照射の腸管腫瘍発症への影響について：

この影響を調べるために、腸管腫瘍モデル・Min マウスを用い検討した。*Bcl11b* は腸管クリプト内の幹細胞および TA 細胞 (transit amplifying cells) に発現し、 β -カテニン遺伝子の転写抑制活性をもつ。*Bcl11b*-KO ヘテロマウスを交配し、Min(+) *Bcl11b*-KO/+ マウスを得た後、生後 2 週または 7 週に 3Gy ガンマ線を照射し、腸管腫瘍発症への放射線影響を検討した。その結果、生後 2 週の照射では明らかに発症を促進し、その促進の程度は *Bcl11b*-KO/+ マウスでさらに顕著であった。一方、生後 7 週の照射では、*Bcl11b*-KO/+ の

影響は存在するものの、発症率そのものはむしろ低下した。したがって、Bcl11b-KO/+遺伝子型クリプト細胞は放射線発がん感受性をもち、Bcl11b-KO/+マウスは照射影響をモニターするよいモデルと考えられる。照射影響（12Gy、1回全身照射）についての実験結果は、以下のものであった。照射後1日（形態学的に損傷がはじまる前）では、形態学的に損傷の程度は強くなく、絨毛（Villi）のβ-カテニン染色性は維持されるが、クリプトでの染色性は著しく低下していた。この現象は、Bcl11b 遺伝子型の違いに影響されない。一方、Ki-67 染色（増殖マーカー）では、照射後陽性細胞は減少するが、Bcl11b-KO/+マウスの方が明らかに多くの細胞が強く染色されており、BrdU の取り込み実験でも同様の結果であった。これは Bcl11b が細胞増殖の負の転写調節因子であることの反映と考えられる。TUNEL 染色でみた細胞死は Bcl11b-KO/+マウスで低下していた。照射後4日（回復、再生期）では、Bcl11b-KO/+マウスのクリプトで Ki-67(+)細胞数が多く観察され、クリプトの回復、再生期像も強くみられた。これらの結果は、組織再生が（恐らく異常に）亢進するためだと考えられる。

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13件）

1. Ikawa T, Hirose S, Masuda K, Kakugawa K, Satoh R, Shibano-Satoh A, Kominami R, Katsura Y, Kawamoto H. An essential developmental checkpoint for production of the T cell lineage. *Science* 有. (2010) in press.
2. Go R, Hirose S, Morita S, Yamamoto T, Katsuragi Y, Mishima Y, and Kominami R. Bcl11b heterozygosity promotes clonal expansion and differentiation arrest of thymocytes in γ -irradiated mice. *Cancer Science* 有. (2010) in press.
3. Yamamoto T, Morita S, Go E, Obata M, Katsuragi Y, Fujita Y, Maeda Y, Yokoyama M, Aoyagi Y, Ichikawa H, Mishima Y, and Kominami R. Clonally expanding thymocytes having lineage capability in γ -ray induced mouse atrophic thymus. *Int. J. Radiation Oncology Biol.* 有. 77 (2010) 235-243.
4. Nagamachi A, Yamasaki N, Miyazaki K, Oda H, Miyazaki M, Honda Z, Kominami R, Inaba T, Honda H. Haploinsufficiency and acquired loss of Bcl11b and H2AX induced blast crisis of chronic myelogenous leukemia in a transgenic mouse model. *Cancer Science* 有. 100 (2009) 219-226.
5. Akulevich N, Saenko V, Rogounovitch T, Drozd V, Lushnikov E, Ivanov V, Mitsutake N, Kominami R, Yamashita S. Polymorphisms of DNA damage response genes in radiation-related and sporadic papillary thyroid carcinoma. *Endocrine-Related Cancer* 有. 16 (2009) 491-503.
6. Yoshikai Y, Sato T, Morita S, Kohara Y, Takagi R, Mishima Y, Kominami R. Effect of Bcl11b genotypes and γ -radiation on the development of mouse thymic lymphomas. *Biochem Biophys Res Commun.* 有. 373 (2008) 282-285.
7. Maruyama M, Yamamoto T, Kohara Y, Katsuragi Y, Mishima Y, Aoyagi Y, Kominami R. Mtf-1 lymphoma-susceptibility locus affects retention of large thymocytes with high ROS levels in mice after γ -irradiation. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 有. 354 (2007) 209-215.
8. Kamimura K, Ohi H, Kubota T, Okazuka K, Yoshikai Y, Wakabayashi Y, Aoyagi Y, Mishima Y, Kominami R. Haploinsufficiency of Bcl11b for suppression of lymphomagenesis and thymocyte development. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 有. 355 (2007) 538-542.
9. Ohi H, Mishima Y, Kamimura K, Maruyama M, Sasai K, Kominami R. Multi-step lymphomagenesis deduced from DNA changes in thymic lymphomas and atrophic thymuses at various times after γ -irradiation. *Oncogene* 有. 26 (2007) 5280-5289.
10. Kamimura K, Mishima Y, Obata M, Endo T, Aoyagi Y, Kominami R. Lack of Bcl11b tumor suppressor results in vulnerability to DNA replication stress and damages. *Oncogene* 有. 26 (2007) 5840-5850.
11. Narai S, Kodama Y, Maeda Y, Yokoyama M, Takagi R, Kominami R. Trp53 affects the developmental anomaly of clefts of the palate in irradiated mouse embryos but not clefts of the lip with or without the palate. *Radiation Research* 有. 166 (2006) 877-882.
12. Inoue J, Kanefuji T, Okazuka K, Watanabe H, Mishima Y, Kominami R. Expression of TCR $\alpha\beta$ partly rescues developmental arrest and apoptosis of $\alpha\beta$ T cells in Bcl11b $^{-/-}$ mice. *J. Immunology* 有. 176 (2006) 5871-5879.
13. Kominami R, Niwa O. Radiation carcinogenesis in mouse thymic lymphomas. *Cancer Science* 有. 97 (2006) 575-581.

〔学会発表〕（計1件）

Ryo Kominami, Satoshi Hirose, Ryota Ishizawa, Yoshinori Katsuragi, Yoshiya Sakuraba, Yoichi Gondo. Dose-dependent effect of zinc finger transcription factor Bcl11b on differentiation of cytotoxic T cells. 22nd International Mammalian Genome Conference, Prague, Czech Republic

(2008年11月5日 Prague, Czech Republic)

[図書] (計1件)

R Kominami, H Ohi, K Kamimura, M Maruyama,
T Yamamoto, K Takaku, S Morita, R Go, Y
Mishima. γ -Ray-Induced mouse Thymic
Lymphomas: Bcl11b Inactivation and
Prelymphoma cells. Radiation Health Risk
Sciences (Eds, Nakashima et al.), Springer
Library of Congress Control Number:
2008937558, (2009) 232-239.

[産業財産権]

○出願状況 (計0件)

なし

○取得状況 (計0件)

なし

[その他]

なし

6. 研究組織

(1)研究代表者

木南 凌 (Kominami Ryo)
新潟大学・医歯学系・教授
研究者番号：40133615

(2)研究分担者

三嶋 行雄 (Yukio MIshima)
新潟大学・医歯学系・准教授
研究者番号：30166003

葛城 美徳 (Kturagi Yshinori)
新潟大学・医歯学系・助教
研究者番号：60401759

廣瀬 哲史 (Hirose Stoshi)
新潟大学・医歯学系・助教
研究者番号：10415276

小幡 美貴 (Obata Miki)
新潟大学・医歯学系・教務職員
研究者番号：00420307

(3)連携研究者

なし

