

研究種目：基盤研究（C）

研究期間：2006～2008

課題番号：18590384

研究課題名（和文）DNAポリメラーゼイオタ欠損マウスの作製とその肺発がん感受性の解析

研究課題名（英文）Development of DNA polymerase ϵ -deficient mice and characterization of their susceptibility to lung tumor development

研究代表者

李 康弘（Lee Gang-Hong）

高知大学・教育研究部医療学系・教授

研究者番号：10261405

研究成果の概要：DNAポリメラーゼイオタは、我々が発見した肺発がん抵抗性遺伝子座の有力な候補遺伝子である。この遺伝子の欠損が肺発がんに及ぼす影響を直接的に調べるため、DNAポリメラーゼイオタ欠損マウスの樹立を遺伝子工学技術によって試み、成功した。しかし、樹立の過程は様々な要因により当初計画よりも遅れを生じたため、3年間の研究期間で肺発がん感受性実験の終了にまで至ることができなかった。2009年度以降も外部資金獲得に努め、研究を継続する。

交付額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2006年度	1,500,000	0	1,500,000
2007年度	1,000,000	300,000	1,300,000
2008年度	900,000	270,000	1,170,000
年度			
年度			
総計	3,400,000	570,000	3,970,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：基礎医学・実験病理学

キーワード：腫瘍、発がん感受性、量的形質、連鎖解析

1. 研究開始当初の背景

個体の発がん感受性は、遺伝因子の強い影響下にある。20世紀初頭までに、家族性大腸ポリポーシス遺伝子を始めとして、複数の発がん感受性遺伝子がヒトの高発がん家系の解析により単離された。だが、これらは遺伝子の胚細胞突然変異によって極端に高い病的発がん感受性をもたらす遺伝子で、その異常形質は単一遺伝子支配に基づく明瞭なメンデル遺伝様式に則って出現する。従って、家系の連鎖解析による原因遺伝子の染色体マッピングは比較的容易であり、ポジショナルクローニングの最初の目標とされた。しか

しながら、この種の遺伝的発がん感受性は、遺伝病の範疇に入る極めて特殊なものと言わざるを得ない。何故ならば、一般的に観察される個体差ないし体質としての発がん感受性は、例外なく、複雑な多遺伝子支配を受けているからである。このような一般的発がん感受性が発現する機序の遺伝学的理解は、いわゆる「オーダーメイド医療」の基盤として、今後重要視されるべきである。だが、ヒトが遺伝的に多様な集団であることを考えると、ヒトを直接対象とした一般的発がん感受性の解析には莫大な経費と人材が必要となることは明らかである。

本研究は多遺伝子支配形質の分析に有利なマウスの実験系を利用して、ヒトの一般的な発がん感受性の支配に関わる責任遺伝子の候補を追究するものである。

2. 研究の目的

我々はBALB/cマウスの第18番染色体に存在するウレタン誘発肺発がん抵抗性遺伝子座 *Par2* (*Pulmonary adenoma resistance 2*) のポジショナルクローニングを目指して来た。*Par2*は二段階発がん説における第1相としてのイニシエーションの修飾因子であるが、その有力な候補遺伝子として *Poli* を同定し発表した。*Poli* は極端に塩基選択精度が低い損傷乗り越え型のDNAポリメラーゼで、DNA修復を通じて発がんに関与することが想定される。

興味深いことに、129系統マウスは *Poli* 遺伝子にナンセンス突然変異を持ち、*Poli* 活性を欠いていることをアメリカのグループが近年発表した。よって我々は連鎖解析を用いて129マウスの *Poli* 遺伝子座がウレタン誘発肺発がん感受性に及ぼす影響を検討した。その結果、129の変異 *Poli* アレルは正常アレルに比して、肺腫瘍数を約60%増加させる可能性が示された。

以上の実験事実より、*Poli* は肺腫瘍発生の防御に何らかの貢献をしているものと推測される。しかしながら、現在までに得られた証拠のみでは *Poli* 遺伝子の極近傍に位置する他の遺伝子が発がん防御の責任遺伝子である可能性も否定できない。従って、我々は *Poli* 遺伝子の欠損が肺発がんの促進を惹起する直接的証拠を得る目的で、本研究助成によって *Poli* 遺伝子ノックアウトマウスを樹立し、その肺発がん感受性を精査することとした。

3. 研究の方法

ノックアウトマウスの作製には、通常129系統マウス由来の胚幹細胞が用いられる。しかしながら、129マウスの *Poli* 遺伝子はもともナンセンス突然変異を有するため、機能的な蛋白を産生できない。よって、129マウス胚幹細胞は本研究の目的には適さない。そこで、近年実用化されたC57BL/6マウス由来の胚幹細胞を使用して、*Poli* ノックアウトマウスの創出を試みた。

マウス *Poli* 遺伝子は10個のエキソンより成っているが、そのエキソン5から7までを欠損し、かつ、欠損の直後にストップコドンが派生するように、相同組換えのターゲティングベクターを設計する。このベクターをC57BL/6マウス系統由来胚幹細胞へエレクトロポレーション法によって導入し、相同組換えによって *Poli* 遺伝子がヘテロ状態でノック

アウト（以下、ヘテロノックアウトと呼ぶ）されたクローンを選択する。正常 *Poli* 蛋白は全長717個のアミノ酸から構成されるが、ノックアウトの結果、N末端側の161アミノ酸のみから成る不完全な蛋白が発現することになる。この不完全な蛋白は *Poli* のポリメラーゼ機能に必須なモチーフを欠いているため、活性を持たない。ヘテロノックアウトクローン細胞を約200個以上のICRマウス8細胞期胚に注入した後、偽妊娠雌ICRマウスの子宮に移植し、キメラマウスを出産させる。C57BL/6の体毛は黒色、ICRのそれは白色であるため、体毛のキメラパターンを観察することにより、容易にキメラマウスを同定することができる。得られたキメラマウスは正常のC57BL/6マウスと交配し、C57BL/6の遺伝背景を有する *Poli* ヘテロノックアウトマウスを産出する。

ヘテロノックアウトマウスを肺発がん感受性の高いA/Jマウスと交配して得られたF₁マウスにウレタンを投与し、*Poli* のノックアウトアレルが肺発がん感受性に及ぼす効果を調べる。

4. 研究成果

初年度に設計したターゲティングベクターのC57BL/6マウス系統由来胚幹細胞へのエレクトロポレーション法では正しい組換えを保有するクローンを得ることができなかった。これにより、研究計画が約1年遅延した。ベクターを再設計したところ、適切なクローンが複数得られたので、そのクローンのうちのひとつをICRマウス初期胚に注入して偽妊娠マウス子宮へ移植した結果、3匹のキメラマウスが出産した。性別はいずれも雄であった。これらのキメラマウスを生殖可能月齢まで飼育し、C57BL/6マウスと交配して *Poli* の組換え体マウスを獲得した。図1に示すごとく、組換え体では一方の *Poli* アレル内にLoxP配列で挟まれたneo遺伝子が存在する。このneo遺伝子を含むLoxP配列間の外来性断片をCreリコンビナーゼによって除去することにより、目的とする *Poli* のノックアウトアレルへの転換が完了する。そのために、Cre遺伝子をトランスジーンとして全組織で発現するC57BL/6由来トランスジェニックマウスと交配し、最終的に *Poli* のヘテロノックアウトマウスを得た。

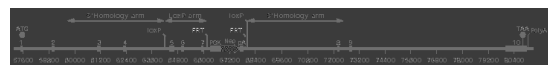


図1 *Poli* の組換えアレル模式図

樹立したヘテロノックアウトをA/Jマウスと交配し、生まれたF₁マウスを使用してウレタン誘発肺発がん実験を現在進めている。F₁マウスには *Polt* がヘテロノックアウト状態のものと正常のものが約半々の比率で存在する筈であり、前者を実験群、後者を対照群として肺腫瘍の発生数を比較する予定である。しかしながら、ノックアウトマウス樹立段階における計画の遅延により、ノックアウトマウスを使用した肺発がん実験を申請した研究期間内に終了できなかった。

本研究は、*Par2* のポジショナルクローニングの最終段階として、*Polt*ノックアウトマウスを作製し、その肺発がん感受性を検討することを目的とした。ノックアウトマウスの作製は様々な要因によってその成否が左右されるが、我々の場合も初回に設計したターゲットベクターの不良により、研究計画が焼く1年遅延してしまった。その結果、ノックアウトマウスの肺発がん実験を期間内に終了することができなかった。しかし、今後は本研究助成によって樹立されたノックアウトマウスを利用して、*Polt*の欠損が肺発がん感受性に与える影響の精査を継続する。

我々が肺発がん抵抗性遺伝子の候補として *Polt* を提案してのち、同遺伝子の欠損がマウスの皮膚発がんを促進する可能性を二つの研究グループが発表している。彼らの実験は *Polt* 遺伝子にもともとナンセンス突然変異を有する129マウス由来コンジェニック系を使用しているため、皮膚発がん促進が *Polt* 遺伝子欠損によるものか、それともその近傍に位置する遺伝子によるものかは確定できておらず、我々の肺発がんに関する研究と同様の問題に直面している。本研究助成によって樹立された *Polt* ノックアウトマウスを利用すれば、肺発がんのみならず、皮膚を含む他臓器の発がんに対する *Polt* の影響をも明らかにすることができるであろう。

一方、*Polt* が生理現象、病理現象において果たす役割はほとんど解明されていないため、発がん以外の研究でも同ノックアウトマウスが将来的に有用な研究材料となることは間違いない。特に、*Polt* が免疫グロブリン遺伝子の組換え、変異に関与しているという仮説が根強くあるが、この点の解明にも極めて有効な実験モデルを提供し得るものと考えられる。

2009年度以降も外部研究資金の獲得に努め、本研究の終了を目指す。

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30件)

1. Kuroda N, Katto K, Tamura M, Shiotsu T, Inoue K, Ohara M, Mizuno K, Lee G-H. Ureteral small cell carcinoma. *Med Mol Morphol*. 2009 ;42:55-57. (査読有)
2. Radhakrishnan G, Suzuki R, Maeda H, Yamamoto M, Hirose N, Gopalrao RK, Lee G-H, Hayashi Y, Rao P, Sasaguri S. Inhibition of neointimal hyperplasia development by MCI-186 is correlated with downregulation of nuclear factor-kappaB pathway. *Circ J*. 2008 ;72:800-806. (査読有)
3. Kuroda N, Katto K, Tamura M, Shiotsu T, Hes O, Michal M, Nagashima Y, Ohara M, Hirouchi T, Mizuno K, Hayashi Y, Lee G-H. Carcinoid tumor of the renal pelvis: consideration on the histogenesis. *Pathol Int*. 2008 ;58: 51-54. (査読有)
4. Ohtsuki Y, Yamanaka A, Ohyama H, Yamada E, Terada N, Fujita J, Lee G-H, Furihata M. Histochemical demonstration of aluminum and iron deposition in pulmonary bony tissues in three cases of diffuse pulmonary ossification. *Histol Histopathol*. 2008 ;23:137-141. (査読有)
5. Hirose N, Maeda H, Yamamoto M, Hayashi Y, Lee G-H, Chen L, Radhakrishnan G, Rao P, Sasaguri S. The local injection of peritoneal macrophages induces neovascularization in rat ischemic hind limb muscles. *Cell Transplant*. 2008 ;17:211-222. (査読有)
6. Kuroda N, Tamura M, Ohara M, Hirouchi T, Mizuno K, Miyazaki E, Hayashi Y, Lee G-H. Possible identification of third stromal component in extraadrenal paraganglioma: myofibroblast in fibrous band and capsule. *Med Mol Morphol*. 2008 ;41:59-61. (査読有)
7. Ohtsuki Y, Ochi K, Okada Y, Lee G-H, Furihata M. Multiple minute nests of incidentally detected paraganglionic cells associated with urothelial carcinoma of the urinary bladder in a 73 year-old woman. *Med Mol Morphol*. 2008 ;41:62-65. (査読有)
8. Kuroda N, Tanida N, Oonishi K, Inoue K, Ohara M, Mizuno K, Taguchi T, Hayashi Y, Hanazaki K, Lee G-H. Significance of D2-40 expression in the diagnosis of gastrointestinal stromal tumor. *Med Mol Morphol*. 2008 ;41:109-112. (査読有)
9. Kuroda N, Fujishima N, Inoue K, Ohara M, Hirouchi T, Mizuno K, Hayashi Y, Lee G-H. Basal-like carcinoma of the breast: further evidence of the possibility that most metaplastic carcinomas may be

actually basal-like carcinomas. *Med Mol Morphol.* 2008 ;41:117-120. (査読有)

10. Ohtsuki Y, Ochi K, Okada Y, Kato M, Lee G-H, Furihata M. Micropapillary component of urothelial carcinoma detected in transurethral resection of bladder tumor (TUR-BT) tissues: a case report. *Med Mol Morphol.* 2008 ;41:113-116. (査読有)

11. Ohtsuki Y, Kobayashi M, Yoshida S, Kishimoto N, Kubo K, Yokoyama A, Lee G-H, Furihata M. Immunohistochemical localisation of surfactant proteins A and D, and KL-6 in pulmonary alveolar proteinosis. *Pathology.* 2008 ;40:536-539. (査読有)

12. Kuroda N, Tamura M, Taguchi T, Tominaga A, Hes O, Michal M, Ohara M, Hirouchi T, Mizuno K, Hayashi Y, Shuin T, Lee G-H. Sarcomatoid acquired cystic disease-associated renal cell carcinoma. *Histol Histopathol.* 2008 ;23:1327-1331. (査読有)

13. Ohtsuki Y, Uomoto M, Hachisuka Y, Kato M, Iguchi M, Lee G-H, Furihata M. A rare case of coexistence of pulmonary adenocarcinoma with Langerhans' cell histiocytosis. *Med Mol Morphol.* 2008;41:175-178. (査読有)

14. Kuroda N, Hamaguchi N, Ohara M, Hirouchi T, Mizuno K, Hayashi Y, Lee G-H. Elastofibroma: a histochemical, immunohistochemical, and ultrastructural study of two patients. *Med Mol Morphol.* 2008 ;41:179-182. (査読有)

15. Kuroda N, Hes O, Michal M, Nemcova J, Gal V, Yamaguchi T, Kawada T, Imamura Y, Hayashi Y, Lee G-H. Mucinous tubular and spindle cell carcinoma with Fuhrman nuclear grade 3: a histological, immunohistochemical, ultrastructural and FISH study. *Histol Histopathol.* 2008 ;23:1517-1523. (査読有)

16. Hayashi Y, Toda K, Saibara T, Okamoto S, Osanai M, Enzan H, Lee G-H. Expression of fascin-1, an actin-bundling protein, in migrating hepatoblasts during rat liver development. *Cell Tissue Res.* 2008 ;334:219-226. (査読有)

17. Ohtsuki Y, Daibata M, Bandobashi K, Lee G-H, Furihata M, Yokoyama A, Miyoshi I. Ultrastructural study of the morphogenesis of human herpesvirus 6 type B in human T-lymphotropic virus type I-producing lymphoid cells. *Med Mol Morphol.* 2008 ;41:204-210. (査読有)

18. Kuroda N, Katto K, Yamaguchi T, Kawada T, Imamura Y, Hes O, Michal M,

Shuin T, Lee G-H. Chromophobe renal cell carcinoma: useful diagnostic application of imprint cytology and fluorescence in situ hybridization of chromosomes 10 and 21 in two cases of typical and eosinophilic variants. *Med Mol Morphol.* 2008 ;41:227-232. (査読有)

19. Kuroda N, Fujishima N, Ohara M, Hirouchi T, Mizuno K, Hayashi Y, Lee G-H. Coexistent adenomyoepithelioma and invasive ductal carcinoma of the breast: presentation as separate tumors. *Med Mol Morphol.* 2008 ;41:238-242. (査読有)

20. Lee G-H. The *Kras2* oncogene and mouse lung carcinogenesis. *Med Mol Morphol.* 2008 ;41:199-203. (査読有)

21. Kuroda N, Amano S, Shiotsu T, Tamura M, Hes O, Michal M, Lee G-H. Mixed testicular germ cell tumor in an adult with cryptorchidism and Down's syndrome. *APMIS.* 2007 ;115:1292-1295. (査読有)

22. Kuroda N, Mizobuchi M, Shimamura Y, Taniguchi Y, Daibata M, Miyoshi I, Ichimura T, Beppu H, Ohara M, Hirouchi T, Mizuno K, Lee G-H. An Asian variant of intravascular lymphoma: unique clinical and pathological manifestation in the gallbladder. *APMIS.* 2007 ;115:371-375. (査読有)

23. Kuroda N, Inoue Y, Taguchi T, Tominaga A, Hes O, Michal M, Hayashi Y, Hiroi M, Shuin T, Lee G-H. Renal leiomyoma: an immunohistochemical, ultrastructural and comparative genomic hybridization study. *Histol Histopathol.* 2007 ;22:883-888. (査読有)

24. Kuroda N, Fujishima N, Ohara M, Hirouchi T, Mizuno K, Lee G-H. Invasive ductal carcinoma of the breast with signet-ring cell and mucinous carcinoma components: diagnostic utility of immunocytochemistry of signet-ring cells in aspiration cytology materials. *Diagn Cytopathol.* 2007 ;35:171-173. (査読有)

25. Yamamoto M, Maeda H, Hirose N, Radhakrishnan G, Katare RG, Hayashi Y, Rao P, Lee G-H, Yamaguchi T, Sasaguri S. Bilirubin oxidation provoked by nitric oxide radicals predicts the progression of acute cardiac allograft rejection. *Am J Transplant.* 2007 ;7:1897-1906. (査読有)

26. Kuroda N, Oonishi K, Ohara M, Hirouchi T, Mizuno K, Hayashi Y, Lee G-H. Invasive micropapillary carcinoma of the colon: an immunohistochemical study. *Med Mol Morphol.* 2007 ;40:226-230. (査読有)

27. Kuroda N, Iwamura S, Fujishima N, Ohara M, Hirouchi T, Mizuno K, Hayashi Y, Lee G-H. Anaplastic carcinoma of the pancreas with rhabdoid features and hyaline globule-like

structures. Med Mol Morphol. 2007 ;40:168-171.
(査読有)

28. Kuroda N, Hamaguchi N, Ohara M, Hirouchi T, Mizuno K, Lee G-H. Large cell neuroendocrine carcinoma of the lung with calcification and expression of osteopontin. Med Mol Morphol. 2007 ;40:218-220. (査読有)

29. Kuroda N, Mizobuchi M, Shimamura Y, Daibata M, Miyoshi I, Ohara M, Hirouchi T, Mizuno K, Lee G-H. Bridging necrosis and reticulin bridging fibrosis induced by intrahepatic involvement of acute biphenotypic leukemia. APMIS. 2006 ;114:908-911. (査読有)

30. Kuroda N, Takahashi T, Moriki T, Okanoue Y, Mizobuchi H, Miyazaki E, Hayashi Y, Lee G-H. Askin tumor with metastasis to the scalp: a histochemical, immunohistochemical and ultrastructural study. Med Mol Morphol. 2006 ;39:221-225. (査読有)

〔学会発表〕(計2件)

1. 李康弘、林芳弘「マウスを利用した肺癌がん感受性の研究 -マウスからヒトへ、ヒトからマウスへ-」第97回 日本病理学会総会 2008年5月16日 金沢

2. Lee G-H. Genetic basis for the lung tumor resistance of BALB/cByJ mice. First JCA-AACR Special Joint Conference. March 12-14, 2007, Nagoya, Japan.

6. 研究組織

(1) 研究代表者

李 康弘 (LEE GANG-HONG)

高知大学・教育研究部医療学系・教授

研究者番号：10261405