

機関番号：13101

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2008～2010

課題番号：20790224

研究課題名(和文)

Bcl11b による大腸がん抑制機構の解析

研究課題名(英文)

The analysis for mechanisms of colon tumor suppression by Bcl11b

研究代表者

葛城 美德 (KATSURAGI YOSHINORI)

新潟大学・医歯学系・助教

研究者番号：60401759

研究成果の概要(和文):

我々は *Bcl11b* がマウスやヒトの新規大腸がん抑制遺伝子として機能することを明らかにし、*Bcl11b* は腸上皮幹細胞や TA 細胞に強く発現することを示した。変異体マウスや線照射実験の解析から *Bcl11b* は TA 細胞の過剰な増殖や供給を抑える可能性が示唆された。

研究成果の概要(英文):

We showed that *Bcl11b* is the novel colon tumor suppressor gene in mice and human, and *Bcl11b* is strongly expressed in ISCs and TA cells. Analyses of *Bcl11b* mutants and -irradiation experiments suggest that *Bcl11b* play roles in suppression of oversupply of TA cells.

交付決定額

(金額単位:円)

	直接経費	間接経費	合計
2008 年度	1,500,000	450,000	1,950,000
2009 年度	1,000,000	300,000	1,300,000
2010 年度	800,000	240,000	1,040,000
年度			
年度			
総計	3,300,000	990,000	4,290,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：基礎医学・医化学一般

キーワード：大腸がん、がん抑制遺伝子、APC、Bcl11b、マウス

1. 研究開始当初の背景

(1) *Bcl11b* 遺伝子産物は C2H2 型 Zinc-finger タンパク質であり、マウス胸腺リンパ腫の LOH マッピングによって当研究室で単離されたがん抑制遺伝子である。我々は研究開始当時マウス胸腺リンパ腫の発がん機構の解析を行っており、胸腺リンパ腫形成の様々な段階で比較した結果、*Bcl11b* 遺伝子が他のがん関連遺伝子よりも早期から不活性化していることを明らかにした(Ohi *et al.* 2007. *oncogene*)。

(2) 当時 *Bcl11b* の解析は胸腺細胞や中枢

神経系に関する報告のみで、他の組織での発現の有無やその解析は行われていなかった。一方、ヒト大腸がんの遺伝学的解析が多数あるなか、複数の文献の結果において *Bcl11b* 遺伝子と未同定の大腸がん抑制遺伝子の遺伝子座がよく一致していたことから、*Bcl11b* 遺伝子が大腸がん抑制遺伝子である可能性が考えられた。そこで大腸がんモデルマウスである *Apc^{Min/+}* マウスを用いた予備実験を行った結果、*Bcl11b* の大腸がん抑制遺伝子としての可能性が確認できた。

2. 研究の目的

Bcl11b が大腸がん抑制遺伝子として機能するかを確認し、その発現部位やがん抑制の機序を明らかにする。また *Bcl11b* が発現し機能する他の組織の結果とも比較しながら *Bcl11b* の一般的な機能についても明らかにする。さらにヒトにおいても *Bcl11b* ががん抑制遺伝子として機能しているのか確認を行う。

3. 研究の方法

(1) 大腸がんモデルマウス *Apc^{Min/+}* と *Bcl11b^{+/-}* の F1 マウスを用いた発がん実験を行ない、16-20 週齢での腸管腫瘍 (adenoma) の数や腫瘍サイズの比較を行う。また、放射線照射による発がん感受性への影響も解析し、腫瘍部の LOH 解析による *Bcl11b* 遺伝子欠損の有無も確認した。免疫染色により小腸および大腸における *Bcl11b* の発現確認も行った。

(2) 理研 ENU 変異体マウスライブラリーから矮小型変異体として *Bcl11b^{S826G/+}* マウスを単離したので、この *Bcl11b^{S826G/+}* マウスと *Bcl11b^{+/-}* との F1 マウスも用いて *Bcl11b* 機能低下時の腸管への影響を調べた。

(3) コンディショナルノックアウト (CKO) マウス (*Bcl11b^{flox}* マウス) を作製し、*Bcl11b* を欠失させた腸管にどのような変化が起きるかも調べた。*Mx-cre* マウスと交配し、pIpC 投与により成体マウスの任意の時期で遺伝子欠失を行った。

4. 研究成果

(1) *B6-Apc^{Min/+}* と *Balb/c-Bcl11b^{+/-}* の F1 マウスを用いた発がん実験の結果、*Apc^{Min/+}; Bcl11b^{+/+}* よりも *Apc^{Min/+}; Bcl11b^{+/-}* において腸管腫瘍 (adenoma) が多数生じた (図 1)。また 7 週齢のマウスに 2Gy ガンマ線照射を行った場合、腫瘍数増加は *Apc^{Min/+}; Bcl11b^{+/-}* においてより顕著であった。この結果は *Apc^{Min/+}* マウスの腫瘍発症が *Bcl11b^{+/-}* 条件下で促進されることを強く示唆する。

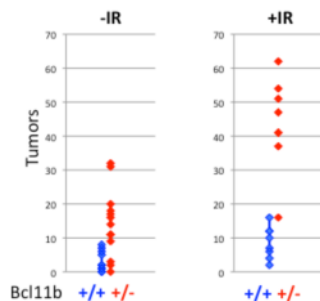


図 1 腫瘍数比較

一方 *Bcl11b* 遺伝子型の腫瘍サイズへの顕著な影響は認められなかった。さらに腫瘍部の LOH 解析を行った結果、*Apc^{Min/+}* の野生型 *Apc*

アリルに関しては全ての腫瘍で欠失が確認できたものの、*Bcl11b^{+/-}* の野生型 *Bcl11b* アリルはほとんど欠失がみられず、*Bcl11b^{+/+}* では 1 つの野生型アリルのみ欠失がみられる場合があった。以上の結果から *Bcl11b* は *Apc^{Min/+}* 条件下ではハプロ不全 (haproinsufficient) 型の大腸がん抑制遺伝子である可能性が示唆された (図 2)。

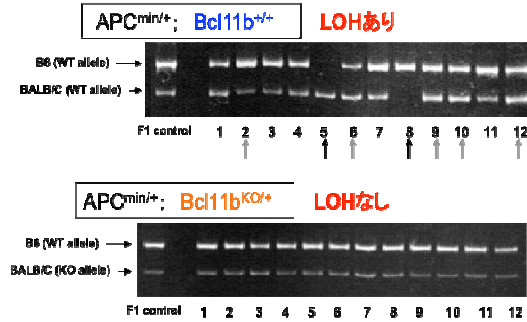


図 2 腫瘍部における *Bcl11b*-LOH

そこでヒト大腸がんにおいても *Bcl11b* ががん抑制遺伝子として機能しているか明らかにするため、*Bcl11b* 遺伝子座近傍の SNP を利用した LOH 解析を行った。その結果、マウスの発がん実験と同様に LOH が確認でき、さらに複数の点突然変異も同定した。これにより *Bcl11b* がヒト大腸がん抑制遺伝子であることが判明した。またマウスの発がん実験と同様にヒト腫瘍においても *Bcl11b* の点変異と LOH の共存は確認できなかったことから、ある程度の *Bcl11b* 活性保持が発がんには必須であると考えられ、やはりマウスの場合と同様にハプロ不全型のがん抑制遺伝子であることが強く示唆された。

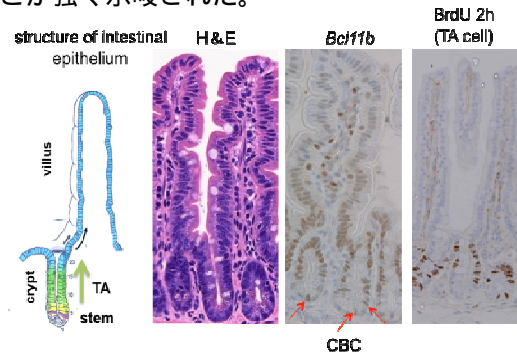


図 3 *Bcl11b* の発現部位 (小腸)

腸管における *Bcl11b* の発現部位を免疫染色で調べたところ、*Bcl11b* タンパク質は増殖性の高い細胞 (TA 細胞) の多い crypt から villi 基部の腸上皮細胞に強く発現が認められた。また、*Bcl11b* は腸上皮幹細胞様の細胞 (CBC 細胞) にも強い発現が認められた (図 3)。小腸 crypt-villi 構造が形成される前の P0 マウスにおいては腸上皮全般での発現が認められ、P0 の *Bcl11b^{+/-}* の腸管は脆弱で腸上皮形成に異常が起きていたことから

Bcl11b は正常な腸上皮形成に必要な遺伝子であると考えられる。

(2) さらに当初の実験計画に含まれてはいないが、理研 ENU 変異マウスから得た *Bcl11b* 変異体マウスの解析から、*Apc^{Min/+}* バックグラウンドではない *Bcl11b^{S826G/-}* マウスにおいても、著しい大腸の肥厚化が認められた(図4)。*Apc^{Min/+}* マウスにおいて腫瘍が多発する小腸においては、増殖性の高い crypt 領域が伸長していた。これらの組織では実際に BrdU の取り込みや Ki67 陽性細胞の増加を伴っていたことから、細胞増殖の亢進が起きていることが確認された(図4)。

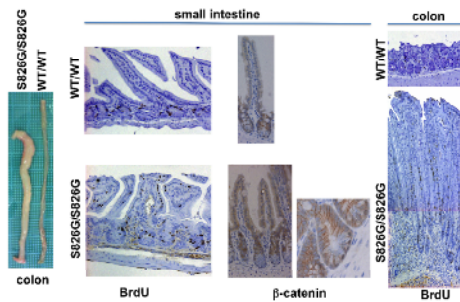


図4 *Bcl11b^{S826G/-}* マウス腸管

これらの結果は *Bcl11b* の活性低下が *Apc* 変異に依存せず、腸管がん発症を引き起こしうることを示唆するのかもしれない。*Apc^{Min/+}* マウスの腫瘍形成時期(20週齢以内)と比べると *Bcl11b^{S826G/-}* の肥厚化時期(40週齢程度)はかなり遅いことから *Bcl11b^{S826G/-}* ではこの間に *Apc* も含めた他の変異や変化を生じる必要があるのかもしれない。

(3) *Bcl11b^{-/-}* マウスは出生直後(P0)致死となるため、*Bcl11b* 欠失が生後あるいは成体での腸上皮に与える影響は不明であった。そこで *Mx-cre; Bcl11b^{lox/lox}* マウスを用いたコンディショナル KO 実験を行った。pIpC 三回投与後10日で *Bcl11b* の発現が消失した crypt が確認できたため、*Bcl11b* の発現が欠失した crypt と *Bcl11b* 発現 crypt 間の違いを調べた。

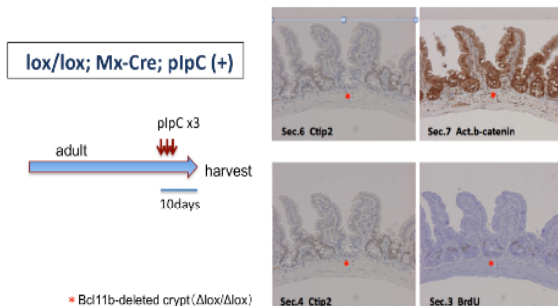


図5 *Bcl11b*CKO 後10日の小腸 crypt

crypt の形態や細胞増殖、*Apc* の標的である β -catenin の発現量、局在等について調べたが、これらに大きな影響は認められなかったため、*Bcl11b* 欠失直後の変化は確認できなかった(図5)。

つぎに長期的な影響を調べるため、*Bcl11b* 欠失後十分に時間をおいた場合の影響を調べた。*Mx-cre; Bcl11b^{lox/lox}* Cマウス(*Bcl11b⁰*: C末端欠失アリルでほぼ null に近いアリル)に pIpC を三回投与し、4ヶ月後の腸管の状態を調べたところ、*Bcl11b* 欠失が起こったと思われる小腸 crypt の長さはコントロールと比較して伸長傾向にあった(図6)。これは *Bcl11b^{S826G/-}* マウスの小腸 crypt の伸長とよく似た結果であることから、*Bcl11b* は小腸上皮の crypt-villi 構造の恒常性に関与し、長期的に機能低下を起こした場合には細胞増殖が盛んになり、その結果 crypt の伸長を引き起こすと考えられる。

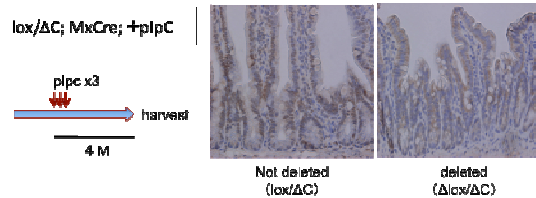


図6 *Bcl11b* CKO 4ヶ月後の小腸 crypt

(4) *Apc^{Min/+}* マウスに放射線照射した場合、*Bcl11b^{+/+}* よりも *Bcl11b^{+/-}* マウスで顕著に小腸腫瘍数増加が起っていた。その原因を探るべく、ガンマ線照射後の *Bcl11b^{+/+}* と *Bcl11b^{+/-}* マウス小腸上皮の TA 細胞や増殖細胞の分布を調べた。

12Gy 照射後16時間の Ki67 陽性細胞数は *Bcl11b^{+/+}* の場合平常時(0h)よりも減少していたが *Bcl11b^{+/-}* マウスではその抑制が弱く Ki67 陽性細胞が多く認められた。これは *Bcl11b^{+/-}* ではガンマ線照射によって起こる増殖低下(DNA 損傷チェックポイント停止)が起こりにく

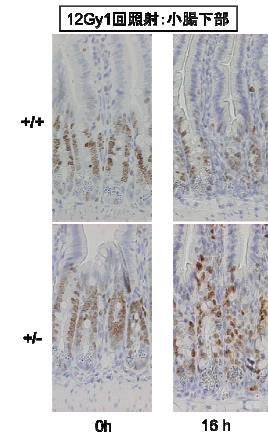


図7 Ki67 染色

くなっている可能性が考えられた。これらの結果から *Bcl11b* は腸上皮においてその恒常性だけでなく、DNA 損傷等による組織再生過程における増殖細胞(TA 細胞)の過剰供給の抑制に関与する可能性があると考えられる。

以上より、*Bcl11b* 低下が過度の細胞増殖亢

進あるいは腸上皮恒常性の異常をもたらし、これが腸管腫瘍形成の基盤となっている可能性が示唆された。今後は腸管腫瘍形成における Bcl11b の直接の標的の同定が必要となるだろう。

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)

1. Yamamoto T, Morita S, Go R, Obata M, Katsuragi Y, Fujita Y, Maeda Y, Yokoyama M, Aoyagi Y, Ichikawa H, Mishima Y, Kominami R. Clonally expanding thymocytes having lineage capability in gamma-ray-induced mouse atrophic thymus. (2010). *Int J Radiat Oncol Biol Phys.* **77**. 235-243. 査読あり

2. Go R, Hirose S, Morita S, Yamamoto T, Katsuragi Y, Mishima Y, Kominami R. Bcl11b heterozygosity promotes clonal expansion and differentiation arrest of thymocytes in gamma-irradiated mice. (2010). *Cancer Sci.* **101**. 1347-1353. 査読あり

[学会発表](計5件)

1. 葛城美德、坂牧僚、小幡美貴、三嶋行雄、権藤洋一、木南凌 Bcl11b は腸上皮細胞の恒常性を制御する大腸がん抑制遺伝子である 第33回日本分子生物学会(BMB2010) 2010年12月8日 神戸

2. 葛城美德、安楽純子、依田浩子、大島勇人、権藤洋一、木南凌 Bcl11b/Rit1 は正常な歯胚発生に必要である 第32回日本分子生物学会年会 2009年12月12日 横浜

3. 葛城美德、郷梨江香、森田慎一、小幡美貴、木南凌 放射線照射による萎縮胸腺内の前がん細胞の特徴と発がん機構 日本放射線影響学会 第52回大会 2009年11月11日 広島

4. 葛城美德、坂牧僚、岩崎友洋、佐藤俊大、三嶋行雄、落合雅子、中釜齊、権藤洋一、味岡洋一、木南凌 Bcl11b/Rit1 はハプロ不全な腸管がん抑制遺伝子として機能する 第67回日本癌学会 2009年10月1日 横浜

5. 葛城美德 Bcl11b は APC^{Min/+}マウスの消化管発がんを抑制する BMB2008(第31回日本分子生物学会年会) 2008年12月9日 神戸

[図書](計1件)

1. Lauren Pecorino (監訳)日合弘、木南凌 (訳

者)葛城美德ほか5名 (2010).「ペコリーノ がんの分子生物学」 メディカル・サイエンス・インターナショナル *全300p中40p担当

[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:

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

葛城 美德 (KATSURAGI YOSHINORI)

新潟大学・医歯学系・助教

研究者番号:60401759

(2)研究分担者

()

研究者番号:

(3)連携研究者

()

研究者番号: