

科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成 24 年 5 月 7 日現在

機関番号：14301

研究種目：若手研究（B）

研究期間：2010～2011

課題番号：22791277

研究課題名（和文） 新規癌抑制遺伝子 Prox1：遺伝子改変マウスの解析

研究課題名（英文） Analysis of the role of transcriptional factor Prox1 using genetically modified mice

研究代表者

大越 香江（OKOSHI KAE）

京都大学・医学研究科・特定病院助教

研究者番号：90534355

研究成果の概要（和文）：遺伝子導入で 11 種の ES クローンを作製し、その中から 3 種のキメラマウスを作製し得た。FLP マウスとの交配を合計 2 回行い、最終的にジェノタイピングにより確認された雄 5 匹雌 5 匹の cKO ヘテロマウスを得た。cKO ヘテロマウス同士を交配させて cKO ホモマウスを作製することにも成功した。cKO マウスを用いて Adeno-Cre を食道に感染させて食道粘膜の Prox1 発現を無くした状態にして NMBA (N-nitrosomethylbenzylamine) による食道癌誘発モデルを用いて食道癌における Prox1 の役割について検討を行った。

研究成果の概要（英文）：Eleven types of ES clones were produced by gene transfer and three chimeras were obtained. By 2 times mating with FLP mice, five male and five female prox1^{+/-} mice were obtained and they were confirmed by genotyping. We succeeded to prepare prox1^{-/-} mice by mating prox1^{+/-} mice. We investigated the role of Prox1 in the drug-induced esophageal cancer model using NMBA (N-nitrosomethylbenzylamine) under lack of the expression of Prox1 by infection of the Adeno-Cre.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2010 年度	1,900,000	570,000	2,470,000
2011 年度	1,200,000	360,000	1,560,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,100,000	930,000	4,030,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：外科系臨床医学・消化器外科学

キーワード：癌、遺伝子

1. 研究開始当初の背景

ホメオボックス遺伝子 Prox1 は、Drosophila では Prospero として知られ、神経幹細胞が細胞分裂をする際に asymmetric

に分裂するために必須であることがわかっている。このような機能をもつ遺伝子の多くが (APC, aPKC など)、癌抑制遺伝子として働くことが報告されている。当研究室の研究で、Prox1 も遺伝子導入実験あるいは siRNA を用

いたノックダウン実験で癌抑制遺伝子候補であることが示唆された。特に、食道癌では、80%のヒト症例で発現低下が認められた。興味深いのは、Prox1が $\text{INF-}\gamma$ で誘導されることである。最近、p53が $\text{INF-}\alpha, \beta$ によって誘導されるという報告があった (Takaoka A, et al. Nature. 424:516-23, 2003)。Prox1も同様のメカニズムで腫瘍免疫の機構として働いている可能性がある。これを直接的に証明するために、遺伝子改変マウスの作成はもっとも有効な方法である。Prox1KOマウスは胎生致死であるため (Dyer MA, et al. Nat Genet. 34:53-8, 2003)、コンディショナルKO (cKO) マウスを作成する必要がある。

2. 研究の目的

最近当研究室から新規癌抑制遺伝子候補として報告されたホメオボックス Prox1は、食道癌において、発現が著明に低下していることがわかった。また、我々は食道癌において、Prox1が $\text{INF-}\gamma$ によって誘導されることで癌抑制効果を示すことを確認しつつある。Prox1は腫瘍免疫の機構として働いている可能性がある。本研究では、遺伝子改変マウスを用いて食道癌の癌化過程を解明する。

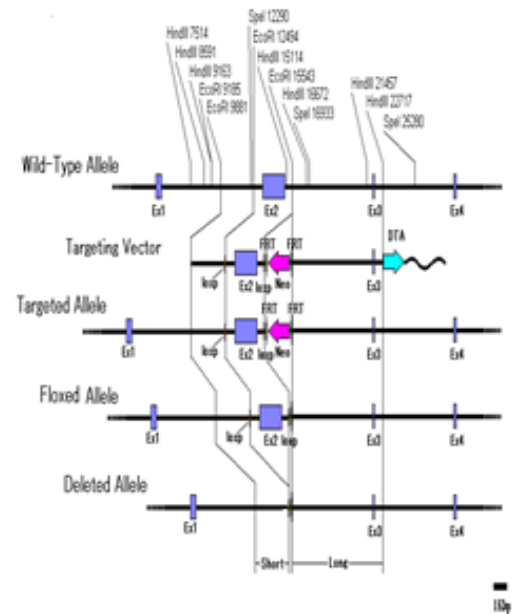
3. 研究の方法

本研究課題は大きく以下の3つの項目に分類される。すなわち(1)Prox1 cKOマウスの作成、(2)ヒト食道癌の検討、(3)NMBA誘発食道癌の検討である。

(1) Prox1 cKOマウスの作成

Prox1のコンディショナル・ノックアウト(cKO)マウスを以下の手順で作製した。Prox1遺伝子のExon2をloxP配列で挟み、FLT配列で挟んだNeo遺伝子をタンデムにおいたターゲティングベクターを構築(下図を参照)し、ES細胞に遺伝子導入を行った。neomycinで陽性選択を行い、ESクローンを作製した。これをマウス胚にマイクロインジェクションして、キメラマウスを作製した。このキメラマウスと正常マウスを交配し、ジェノタイピングによりヘテロマウスを確認した。これとFLPマウスを交配して、Neo遺伝子が除かれたcKOヘテロマウスを作製した。

コンディショナルKOマウス用Targeting Vector設計図 ES細胞の系統 (C57BL/6) マウスの系統 (C57BL/6)



(2) ヒト食道癌の検討

①ヒト食道癌サンプルのProx1発現をreal-time PCRで測定した。また、p53はsequencingによって、mutationをチェックした。

②ヒト食道癌株KYSEを用いたin vitro実験
当科で収集しているヒト食道癌株KYSEシリーズについて、p53 wild/prox1 low or highとmutant/low or high株を選択し、それぞれのProx1を遺伝子導入によってgain-of-functionか、siRNAによってloss-of-functionのアッセイを施行した。形態、分化、増殖、アポトーシス、遊走を評価した。

③ $\text{INF-}\gamma$ に対する反応を評価
KYSE細胞株に $\text{INF-}\gamma$ を投与して、それらの形態、分化、増殖、アポトーシス、遊走を調べた。

(3) NMBA誘発食道癌の検討

①Loxp-loxpでProx1ゲノムのexon2を挟んだFRT-neo-FRTカセットをもつvectorを使ってProx1cKOマウスを作出した。Prox1の発現消失をreal-time PCR、Western blot、免疫染色で確認するとともに、このマウスをもちいてNMBAによる食道癌の誘発実験を行った。

②当科で収集しているヒト食道癌細胞株KYSEシリーズについてProx1を遺伝子導入に

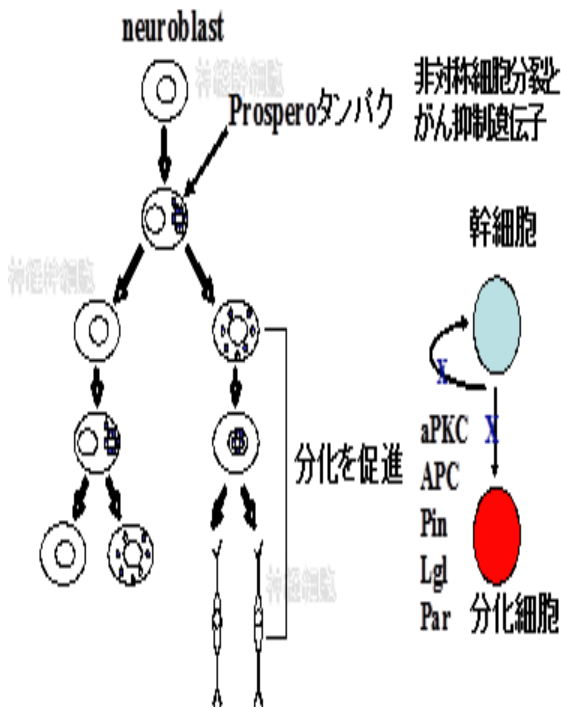
よって強制発現させたり、siRNAにより発現抑制したりすることで、形態、分化、増殖、アポトーシス、遊走能の変化などを評価した。

③マウスのNMBA誘発食道癌におけるProx1, p53を検討するとともに、p53変異マウスでもNMBA誘発実験を行い、食道癌細胞株を樹立した。それらの細胞株を使ってIFN-gammaを投与して形態、分化、増殖、アポトーシス、遊走能が変化するか検討した。

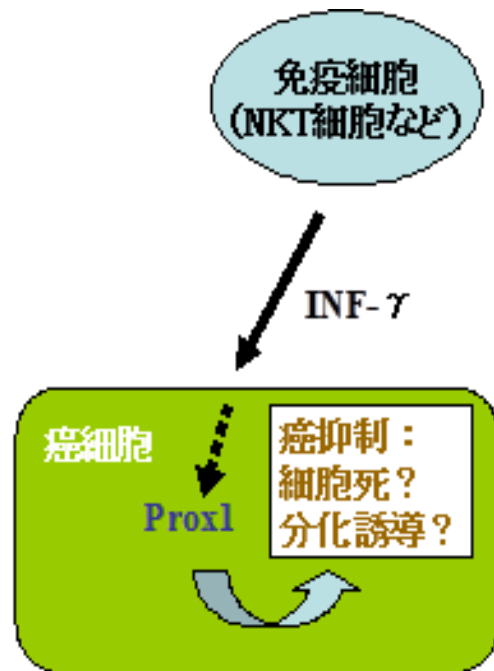
4. 研究成果

(1) 遺伝子導入で11種のESクローンを作製し、その中から3種のキメラマウスを作製し得た。FLPマウスとの交配は合計2回行い、最終的にジェノタイピングにより確認された雄5匹雌5匹のcKOヘテロマウスを得た。cKOヘテロマウス同士を交配させてcKOホモマウスを作製することにも成功した。

(2) cKOマウスを作成後は、自然発生食道癌モデルにてAdeno-Creを食道に感染させて食道粘膜のProx1発現を無くした状態にてNMBA(N-nitrosomethylbenzylamine)による食道癌誘発モデルを作成することで、食道癌におけるProx1の役割について検討した。その結果、prosperoは非対称性分裂に関わることが確認された(下図参照)。



(3) 当研究室の研究で、Prox1も遺伝子導入実験あるいはsiRNAを用いたノックダウン実験で癌抑制遺伝子候補であることが以前から示唆されており、特に、食道癌では、80%のヒト症例で発現低下が認められている。しかしながら、p53が $INF-\alpha, \beta$ によって誘導されるという報告(Takaoka A, et al. Nature. 424:516-23, 2003)と同様のメカニズムでProx1も腫瘍免疫の機構として働いている可能性を直接的に証明するまでには至らず、Prox1が $INF-\gamma$ で誘導されるかどうかは確認できなかった(下図参照)。



(4) キメラマウスと正常マウスを交配した後、FRT-neo-FRTカセットをもつTargeting vectorを設計し、Neo遺伝子をタンデムにおいたターゲティングベクターを構築、さらにProx1の発現低下にp53変異が必須であるかどうか判定するためにFLPマウスにおいても同様の作業を行った結果、p53変異はNeo遺伝子においてgain-of-functionおよびsiRNAを施行した場合のみ必須であることが判明した。

(5) NMBAによる誘発実験に進む前にProx1をKOしておいたNKT細胞数の変化を免疫染色で確認したところ、正常に増加していることが確認された。

(6) $INF-\gamma$ を投与したcKOマウスを一般的なラットと比較した場合、Prox1の発現低下に

p53 変異が必須であるかどうか、またそれぞれの p53 wild/prox1 low or high と mutant/low or high 株の間にアポトーシスを発現させることができるのかどうかは確認することができなかつた。さらに、食道基底部の Prox1KO を免疫染色で確認したところ、KYSE 細胞株に遊走反応が起こったため、食道癌細胞の Prox1 発現を測定するために cKO ホモマウスおよびヒト食道癌株 KYSE シリーズを移植したラットに IFN- γ を投与し経過観察をした結果、同様の反応が見られた。これは、Prox1 ゲノムが癌遺伝子に対して作用することによってもたらされる p53 変異が原因であるものと思われる。

(7) ラットにおいて食道粘膜（特に基底細胞）で Prox1 を KO する場合と、cKO マウスにおいて同様の操作を行う場合とでは、NKT 細胞数とその活性化に関して、ほぼ同様の結果が得られた。これは Prox1KO マウスは胎生致死のため、KYSE 細胞株について形態、分化、増殖、アポトーシス、遊走のそれぞれがラットと極めて類似しているためであると考えられる。さらに、この cKO マウスに対し、遺伝子導入によって gain-of-function および siRNA を施行し、Prox1 ゲノムの exon2 を挟むことで Targeting vector を設計することができた。

(8) α -GalCel は NKT 細胞数と活性化を促進する一方、ヒト食道癌株 KYSE シリーズについてアポトーシスを発現させることで mutation が確認できる。そこで、ヒト食道癌サンプルの Prox1 発現を real-time PCR で測定するため、Loxp-lopx を用いて p53 wild/prox1 low or high 株に p53 を sequencing し、FRT-neo-FRT カセットを持たせることで食道癌細胞の Prox1KO を確認することができた。しかし、western blot を用いて同様に測定を行ったところ、食道癌細胞の Prox1KO は目立って確認することができなかつた。おそらく western blot を用いる場合は、aPKC 遺伝子あるいは APC 遺伝子に対し、siRNA によって gain-of-function 施行すれば同様の結果が見られるものと考えられるが、現段階で確認をとるまでには至らなかつた。

(9) マウスの NMBA 誘発食道癌の Prox1, p53 をヒトサンプルと同様に検討し、さらに同様の実験を p53 変異マウスで行うことで p53 変異マウスの NMBA 誘発食道癌の検討を行った。これらの結果、NMBA 誘発食道癌細胞の分離・培養のための食道癌細胞株を樹立することに成功した。この食道癌細胞株に IFN- γ を投与して、形態、分化、増殖、アポトーシス、遊走を調べたところ、 α -GalCel は NKT 細胞を活性化させ、局所での NKT 細胞数と活性化

を促進することがわかり、また、血液中の INF- γ を上昇することが確認され、これらの結果は当科の他の実験でも確かめられている結果と整合的であった。

(10) Prox1KO マウスは胎生致死のため、cKO マウスを作成し、その後 Cre 塗布あるいは、Adeno-Cre 感染後、食道基底部の Prox1KO を real-time PCR, western blot, 免疫染色で確認するというプロセスを踏んだわけだが、この際 α -GalCel の効果を検討し Adeno-prox1 (作成済み) 感染による効果の変化を解析した結果、正常マウス、p53 変異マウスを用いた NMBA 誘発癌に Prox1 の発現低下がみられるかなどを確認するために行われている基礎実験と同様、 α -GalCel による活性化の効果が確認できた。そして、Adeno-prox1 (作成済み) 感染による効果は確認できなかったが、IFN- γ に対するアポトーシスおよび遊走反応が確認できた。

(11) 当科で収集しているヒト食道癌株 KYSE シリーズについて、gain-of-function もしくは siRNA によって loss-of-function のアッセイを施行したところ、KYSE 細胞株に IFN- γ を投与した場合と同様、事前に測定しておいたヒト食道癌サンプルの Prox1 発現が real-time PCR でも測定された。しかし p53 について sequencing によって同様の操作を行ったところ、事前に期待したような mutation をチェックする事はできなかつた。IFN-gamma を投与しても同様の結果となった。これは、Prox1 を遺伝子導入によって強制発現させたり、siRNA により発現抑制させたことで樹立したヒト食道癌細胞株 KYSE シリーズについて、 α -GalCel の効果が予想以上に認められたことがおそらく原因であると思われる。

(12) (1)~(11)より、実際の食道でみられるように、p53 の変異が必要条件である可能性があり食道癌における Prox1 の役割を検証する上で p53 wild/prox1 low or high と mutant/low or high 株の間には大きな差異を認めることができなかつた。また、一般に in vitro 実験では exon2 を Loxp-lopx によって mutant/low or high 株に挟み込み、Drosophila および Prospero における遺伝子導入の効果を測定するが、当研究では INF- α および INF- β から asymmetric に分裂した KYSE 細胞株を用いたため、cKO ヘテロマウスの Prox1 ゲノム発現の mutation チェックにおいて期待したような drastic な反応が見られなかつた。このような評価は IFN-gamma を投与したすべての食道癌細胞株で妥当なのかどうか、今後も引き続き当科で収集しているヒト食道癌細胞株 KYSE シリーズについて、

Prox1 を遺伝子導入によって強制発現させたり、siRNA により発現抑制したりすることで、形態、分化、増殖、アポトーシス、遊走等の変化などを評価していきたい。

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)

6. 研究組織

(1) 研究代表者

大越 香江 (OKOSHI KAE)

京都大学・医学研究科・特定病院助教

研究者番号：90534355