

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 6 月 23 日現在

機関番号：13101

研究種目：基盤研究(B)

研究期間：2011～2013

課題番号：23310036

研究課題名(和文)腸管腫瘍における放射線発がんの標的細胞の同定と変異蓄積性

研究課題名(英文)Radiation target and mutagenesis in intestinal tumors

研究代表者

木南 凌(Kominami, Ryo)

新潟大学・医歯(薬)学総合研究科・客員研究員

研究者番号：40133615

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 15,100,000円、(間接経費) 4,530,000円

研究成果の概要(和文)：Lgr5幹細胞マーカー発現腸管細胞でBcl11bの片アレルを消失させるマウスの解析から、Bcl11b減弱は放射線照射後の腸管再生を促進することがわかり、この細胞が発がん母体細胞であることが示唆された。Bcl11bはSWI/SNFクロマチン再構成複合体の一因子として働き、その減弱はWnt/beta-cateninシグナル下流のc-jun遺伝子などの発現を亢進させることにより、発がんに貢献することがわかった。

研究成果の概要(英文)：Attenuated expression of Bcl11b in Lgr5-expressing intestinal crypt cells promoted regeneration of intestinal epithelial cells after the radiation-induced injury in Lgr5-Cre; Bcl11b<sup>flox/+</sup> mice. This suggests that the origin of cells in intestinal tumors, which are enhanced by loss of one Bcl11b allele in Apc<sup>min/+</sup> mice, is Lgr5-expressing cells. It was also demonstrated that Bcl11b functions as a subunit of SWI/SNF chromatin remodeling complex and down-regulates transcription of Wnt/beta-catenin target genes such as c-jun. This suggests that Bcl11b impairment instigates intestinal tumor development at least in part through deregulation of beta-catenin pathway.

研究分野：複合新領域

科研費の分科・細目：環境学/放射線・化学物質影響科学

キーワード：電離放射線 発がん 幹細胞 大腸がん 胸腺リンパ腫 Bcl11b

## 1. 研究開始当初の背景

現在の放射線防護体系で仮定されている発がんパラダイムは、放射線が誘発する DNA 損傷に基づく。すなわち、放射線が DNA に損傷を与え、それが一定の確率で突然変異として細胞内に蓄積し、この蓄積した変異をもつ細胞の中から確率的にがんが生じるというシナリオである。この発がんパラダイムでは、個々の細胞に変異が蓄積すること、その変異の数が最も重要なイベントとして捉えられている。しかし、個体では組織を構成している細胞は常に入れ替わっており、細胞のターンオーバー期間によって蓄積性は変化するはずである。したがって、変異の蓄積性は細胞のターンオーバーを加味してはじめて現実的な意味をもつ。言い換えると、細胞レベルで提示されてきた変異蓄積の重要性はより小さい可能性がある。したがって、この組織レベルでの蓄積性の研究は重要かつ必要である。このことは、低線量率長期被ばくの場合にさらに重要となるはずである。本研究は、腸管腫瘍をモデルに変異蓄積を示す細胞の同定、この蓄積性の重要度を研究するが、この解析に Bcl11b 遺伝子改変マウスを用いる。それは Bcl11b<sup>KO/+</sup> 遺伝子型クリプト細胞は発がん感受性および放射線発がん感受性を示し、放射線の発がん影響をモニターするよいモデルと考えるからである。また、我々が Bcl11b 遺伝子を単離し、その変異マウスを作製したという研究背景がある。

## 2. 研究の目的

腸管腫瘍における放射線発がんの標的細胞を同定する。組織内の種々の細胞は常に入れ替わるため、照射により変異を蓄積し、存続する細胞の同定は重要課題である。そこで、腸管クリプト内の幹細胞・TA (transit amplify) 細胞の中で、放射線発がんの標的細胞は何かを明らかにする。なお、Bcl11b は腸管クリプト内の幹細胞および TA 細胞 (transit amplifying cells) と判断される領域内の細胞に発現する。

## 3. 研究の方法

(1) Lgr5-Cre; Bcl11b<sup>lox/+</sup> マウスとその解析: Lgr5 発現細胞で Bcl11b 遺伝子型が KO/+ となる、Apc<sup>min/+</sup> マウスを作製した。これには Lgr5-Cre (tamoxifen-induced) マウ

スと Bcl11b<sup>lox/+</sup> マウスを用いた。この Lgr5-Cre; Bcl11b<sup>lox/+</sup> マウスが元の Apc<sup>min/+</sup> マウスと比べ、照射後腸管組織にどのような影響を与えるか、照射後腸管腫瘍を有意に高く発症するかどうかを調べた。一方、Bcl11b<sup>KO/+</sup> マウスは照射後 Ki-67 染色陽性を示す増殖細胞数がより多い。そこで、Lgr5-Cre; Bcl11b<sup>lox/+</sup> マウスのクリプト内で異常に増殖している細胞と、 $\beta$ -カテニン活性をモニターする TOP/GAL 陽性細胞との関連性、および Lgr5 発現細胞との関連性を調べた。これらにより、Lgr5 発現細胞が放射線発がん標的細胞かどうかを判定した。

(2) SWI/SNF 複合体の解析: 細胞を低調液 A (10mM HEPES pH7.6, 25mM KCl, 1mM EDTA, 10% Glycerol, 1mM DTT) に懸濁し、ホモジネートした後 700xg、10 分間の遠心で核分画を得た。核抽出液を超遠心分離を行い、不溶性のクロマチン沈殿画分に分けた。この核抽出液をグリセロール密度勾配遠心法で、分画した。各分画をウエスタン法で SWI/SNF 構成員の有無を調べた。

## 4. 研究成果

(1) 腸管クリプト内細胞への照射および Bcl11b 片アレル消失の影響: Bcl11b は腸管クリプト内の幹細胞と考えられる CBC 細胞、およびプロジェニターと考えられる TA 細胞 (transit amplifying cells) に発現する。Apc<sup>min/+</sup> 腸管腫瘍モデルマウスに Bcl11b の片アレル欠失を導入したマウスは、Apc<sup>min/+</sup> 単独マウスに比べ、腫瘍発症を有意に促進する。また、2 週齢のマウスに 3Gy の線を照射すると、腫瘍数はさらに増大するが、その増大比でも Apc<sup>min/+</sup> 単独マウスに比べ、促進することがわかっている。したがって、Bcl11b<sup>KO/+</sup> 遺伝子型クリプト細胞は発がん感受性および放射線発がん感受性を示し、Bcl11b<sup>KO/+</sup> マウスは照射の発がん影響をモニターするよいモデルと考える。

マウスに 12Gy の線を照射すると、腸管上皮細胞の増殖停止と細胞の上部への移動が停止するが、Bcl11b の片アレル消失したマウスではこの増殖停止を減弱する。しかし、この Bcl11b の働きが腸管細胞特異的か、他の細胞 (例えば、免疫細胞) の変化による二次的な結果かどうかは不明である。そこで、Lgr5 を発現する細胞 (腸管幹細胞) で特異的

に Bcl11b を消失させる Lgr5-Cre;  
Bcl11b<sup>flox/+</sup>マウス、さらに Lgr5-Cre;  
Bcl11b<sup>ko/flox</sup> マウスを作製し、検討した。

照射後の Lgr5-Cre; Bcl11b<sup>flox/+</sup> マウスの  
解析：

Bcl11b<sup>KO/+</sup>および Lgr5-Cre; Bcl11b<sup>flox/+</sup> マウスは、非照射時では腸管の形態や増殖性に变化はみられない。まず、マウスに 4OHT 投与 (Cre を発現誘導する) し、2 週間後の Lgr5-Cre; Bcl11b<sup>flox/+</sup> マウスおよびコントロールマウスに 12Gy の線、1 回の全身照射を行い、16 時間後に放射線照射後の腸管上皮細胞への影響を解析した。Lgr5-Cre; Bcl11b<sup>flox/+</sup> マウスで、BrdU 陽性の増殖細胞がクリプト下部により多く観察され、Bcl11b 片アレル消失を導入したクリプト内の CBC 細胞、TA 細胞が、照射による増殖抑制を受けにくいこと、抵抗性であることが示唆された。すなわち、Lgr5-Cre; Bcl11b<sup>flox/+</sup> マウスでも Bcl11b<sup>KO/+</sup> マウスと同様の細胞増殖停止の減弱が観察された。さらに、照射後の腸管組織回復への影響を検討した。照射後 4 日は障害を受けた腸管上皮は正常な形態を取り戻す回復、再生期である。そこで、この時期の Ki-67 陽性細胞数を比較した。Lgr5-Cre; Bcl11b<sup>flox/+</sup> マウスでより多くの陽性細胞が観察された。この結果は、野生型マウスに比べ、Lgr5-Cre; Bcl11b<sup>flox/+</sup> マウスは照射後腸管組織再生が (恐らく異常に) より高いことを示唆する。以上の結果は、Lgr5 陽性細胞での Bcl11b の片アレル消失は、照射後の増殖、再生をより増大させることを示す。すなわち、細胞増殖の抑制に Bcl11b は寄与し、その機能低下は腸管幹細胞に増殖性を与えることを示唆する。

Lgr5-Cre; Bcl11b<sup>flox/+</sup> マウスを用いた放射線発がん実験：

Apc<sup>Min/+</sup> マウスに Lgr5Cre マウスと Bcl11b<sup>F/+</sup> マウスを交配し、最終的に 4 頭の Apc<sup>Min/+</sup>; Lgr5-Cre; Bcl11b<sup>flox/+</sup> マウスを作製した。6 週齢のこのマウスおよびコントロールの Apc<sup>Min/+</sup> マウスに 4OHT (tamoxifen) を投与し、18 週齢で腸管腫瘍数を調べた。4OHT 投与により Bcl11b の片アレル欠失を誘導した Min マウスの腫瘍数は、コントロール Min マウスに比べ有意な差を示さなかった。これは Lgr5+ 幹細胞での Bcl11b 片アレル欠失は発がんを促進しないこと、Lgr5+ 細胞よりも上位の

Bmi1+ 幹細胞で片アレル欠失は貢献することを示唆する。しかし、Bcl11b の Cre による欠失効率が約 20% (下記参照) と低いため、検出精度に限界があり、最終結論は得られなかった。

(2) Bcl11b を両アレル消失したマウスの腸管の非照射時の解析：

Lgr5-Cre; Bcl11b<sup>flox/KO</sup> マウスを作製し、4OHT 投与により Bcl11b の両アレルを消失させ、その腸管への影響を調べた。Cre 発現を GFP 染色でモニターすると、35%-45% のクリプト底部で Cre 発現が確認された。これは先行研究と一致する。しかし、このクリプトの約半数でしか Bcl11b 発現の消失が観察されなかった。一方、Lgr5-Cre; ROSA26-LacZ マウスでは GFP 染色 (Lgr5 発現) と LacZ 染色が同程度であった。これは、Bcl11b 発現を消失したクリプトが減少し、クリプトの維持能低下を引き起こしていることを示唆する。この結果から、Bcl11b 消失の幹細胞は存続能が低下すると考えられる。

Bcl11b を両アレル消失したマウスの腸管の照射後の解析：

Lgr5-Cre; Bcl11b<sup>flox/KO</sup> マウスに 4OHT 投与後 12Gy 照射し、96 時間後のクリプト再生時での変化を観察した。Lgr5 発現をモニターする GFP 発現は 1-3% と激減していた。これは Lgr5 陽性幹細胞の再生が少ないことを意味する。一方、Bcl11b 発現消失のクリプトは 20-30% のクリプトで観察され、非照射時の割合と変わらなかった。これは照射後の再生時では、Bcl11b 消失幹細胞は Bcl11b 発現細胞と比べ、クリプト形成に強く寄与することを示唆する。したがって、非照射時、すなわちクリプト・ホメオスタシス (維持) の時期とは、反対の影響を与えると考えられる。

(3) Lgr5-Cre; Bcl11b<sup>flox/+</sup> マウスおよび Lgr5-Cre; Bcl11b<sup>flox/KO</sup> マウスの腸管細胞から Lgr5 発現細胞をソーティングし、Bcl11b 片アレルのみ消失した細胞を得た。この細胞とコントロール細胞での発現変化を DNA アレイで解析した。脂質代謝やクリプト特異的な発現の上昇が一つの特徴であり、これは予想と合致した。一方、Wnt/ $\beta$ -catenin シグナル下流の遺伝子としては、c-jun と FGF18 の発現上昇がみられた。しかし、Lgr5-Cre; Bcl11b<sup>flox/KO</sup> マウスの腸管細胞ではみられない。両遺伝子

とも大腸がん細胞で上昇するとの報告があり、これらの遺伝子発現上昇を介してBcl11b片アレル消失が大腸がん発症に貢献する可能性が示された。

#### (4) Bcl11b<sup>S826G/KO</sup> マウスの解析：

Bcl11b-S826G は亜鉛フィンガードメインの826番目（フォーム）のセリンがグリシンに置換したアレルであり、機能低下をもたらすことがわかっている。Bcl11b<sup>S826G/KO</sup> マウスを作製し、3週齢での腸管を観察した。クリプトサイズは有意に小さく、クリプト低形成をもたらすと考えられた。

#### (5) TOP/GALマウスを用いたβ-catenin活性化への照射影響

腸管上皮細胞の増殖は主にWnt/β-catenin経路により調節される。そこで、β-catenin経路活性化への放射線照射影響をTOP/GALマウスを用いて調べた。このTOP/GALマウスは、活性化されたβ-catenin転写複合体が核内で結合するTOP配列をもち、β-catenin経路の下流にある遺伝子の転写活性をモニターすることができる。12Gy照射後24時間の影響をみると、野生型マウスではクリプト内GAL染色陽性細胞数は照射により低下するが、Bcl11b<sup>flox/+</sup>マウスでは逆にGAL陽性細胞が増加していた。このGAL陽性細胞は、増殖している幹細胞を示唆すると考えると、Bcl11b片アレル消失を導入したマウスの幹細胞は照射後分裂が抑制されるのではなく、むしろ活性化されると考えられる。

#### (6) Bcl11b は SWI/SNF 複合体の一員として転写に参与する：

Bcl11b は C<sub>2</sub>H<sub>2</sub> 型 Zn フィンガードメインをもち、転写因子と考えられていたが、2013年になって、SWI/SNF 複合体の一員として転写に参与するとの報告があった。SWI/SNF 複合体はクロマチン再編成複合体の一つであり、それらの構成体の変異がヒト T-ALL を含む多くのがんで高頻度に見つかっている。そこで、18種類の報告された T-ALL 変異をもつ Bcl11b プラスミドを作製し、p53 依存性の HDM2-P2、p21 プロモーター活性や p27 に対する影響を調べた。その結果、予想通り転写抑制効果の減弱を示すものが約半数であった。このことは、Bcl11b 変異がドミナントネガティブに働くことを示唆し、SWI/SNF 複合体の一員として転写に参与する可能性を支持する。

#### (7) Bcl11b-SWI/SNF 複合体の検出

Bcl11b 発現細胞である MOLT4F 細胞の核抽出物を、10-30%グリセロール密度勾配遠心法で分子量のサイズにより 21 本（10%グリセロール分画を 1 番とし 30%グリセロール分画を 21 番とした）に分画化し、BCL11B が SWI/SNF 複合体と挙動を同じにするか否かを調べてみた。この条件下では、SWI/SNF の構成因子 BAF53A が認められる（分画番号 14-16）に Bcl11b の大部分が存在し、低分子側（分画 3-7）には殆ど分布していなかった。また、SWI/SNF 複合体の構成因子である BRM、BAF155、SNF5 は分画 11-13 に分布し、SWI/SNF 複合体が単一ではなく、構成因子が変化するような複数の複合体があることが示唆された。

次に、ヒト大腸がん細胞での SWI/SNF 複合体形成を検討した。ヒト大腸がん由来の HCT116 培養細胞では Bcl11b の発現は認められない。そこで、HCT116 細胞に Bcl11b 発現ベクター（フォームの野生型、S754G（フォーム 826 番目に対応）変異体および 744-end 変異体：6 番目の亜鉛フィンガードメインの欠損体）をトランスフェクトし、24 時間後の細胞から核抽出液を調製し、グリセロール密度勾配遠心法で分画化し、ウエスタン法で調べた。野生型 Bcl11b は SWI/SNF 複合体の構成因子である BRG1 や BAF53A と同じ分画（分画番号 10-12）に存在するものと、低分子の分画（分画番号 3-7）に認められた。このことから、Bcl11b は SWI/SNF 複合体の構成因子であることが示唆された。また、S754G 変異体では、低分子の分画（分画番号 3-7）に存在する Bcl11b が野生型に比べて減少し、BRG1 が認められる分画 11-13 に多く分布した。一方、744-end 変異体型 BCL11B は、低分子の分画（分画番号 3-6）に分布し、BRG1 が認められる分画 10-12 には殆ど検出されなかった。このことから、Bcl11b の C 末端に位置する亜鉛フィンガードメインが複合体形成に参与する可能性が示唆された。

(8) 結論：Lgr5 幹細胞マーカーを発現する腸管細胞で Bcl11b の片アレルを消失させるマウスを解析した。その結果、Bcl11b 減弱は放射線照射後の腸管細胞の増殖、腸管再生を促進することがわかった。このことは、Lgr5 発現細胞が発がん母体細胞、放射線表的細胞で

あることを示唆する。一方、Bcl11b片アリル欠失は発がんを促進しなかった。しかし、Bcl11bのCreによる欠失効率が約20%と低く、検出精度に限界があるため、結論は得られなかった。Bcl11bは腸管細胞でもSWI/SNFクロマチン再構成複合体の一因子として働くことが示唆された。Bcl11bはβ-cateninシグナル下流のc-jun遺伝子などの発現を抑制するため、その減弱は発現亢進をもたらす、発がんに貢献することが示唆された。

## 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 12 件)

1. Okumura K, Saito M, Aoto Y, Hachiya T, Sakakibara Y, Katsuragi Y, Hirose S, Kominami R, Goitsuka R, Nakamura T and Wakabayashi Y. Congenic mapping and allele-specific alteration analysis of Stmm1 locus conferring resistance to early-stage chemically induced skin papillomas. Plos One in press (2014). 査読有り
2. Shibata K, Yamada H, Nakamura M, Hatano S, Katsuragi Y, Kominami R, Yoshikai Y. IFN- $\gamma$ -producing and IL-17-producing T cells differentiate at distinct developmental stages in murine fetal thymus. J Immunol. 192:2210-2218 (2014). 査読有り
3. Go R, Hirose S, Katsuragi Y, Obata M, Abe M, Mishima Y, Sakimura K, Kominami R. Cell of origin in radiation-induced premalignant thymocytes in mice conditionally losing one Bcl11b allele. Cancer Sci. 104:1009-1016 (2013). 査読有り
4. Katsuragi Y, Anraku J, Nakatomi M, Ida-Yonemochi H, Obata M, Mishima Y, Sakuraba Y, Gondo Y, Kodama Y, Nishikawa A, Takagi R, Ohshima H, Kominami R. Bcl11b transcription factor plays a role in the maintenance of the ameloblast-progenitors in mouse adult maxillary incisors. Mech Dev. 130: 482-492 (2013). 査読有り
5. Miyasaka Y, Suzuki S, Ohshiba Y, Watanabe K, Sagara Y, Yasuda SP, Matsuoka K, Shitara H, Yonekawa H, Kominami R, Kikkawa Y. Compound Heterozygosity of the Functionally Null Cdh23v-*ngt* and Hypomorphic Cdh23ahl/*i* Alleles Leads to Early-onset Progressive Hearing Loss in Mice. Exp Anim. 62:333-346 (2013). 査読有り
6. Tanaka H, Naito T, Muroi S, Seo W, Chihara R, Miyamoto C, Kominami R, Taniuchi I. Epigenetic Thpok silencing limits the time window to choose CD4+ helper-lineage fate in the thymus. EMBO J. 32: 1183-1194 (2013). 査読有り
7. Okumura K, Sato M, Saito M, Miura I, Wakana S, Mao JH, Miyasaka Y, Kominami R, Wakabayashi Y. Independent genetic control of early and late stages of chemically induced skin tumors in a cross of a Japanese wild-derived inbred mouse strain, MSM/Ms. Carcinogenesis. 33: 2260-2268 (2012). 査読有り
8. Go, R, Takizawa, K, Hirose, S, Katsuragi Y, Aoyagi, Y, Mishima Y, and Kominami R. Impairment in differentiation and cell cycle of thymocytes by loss of a Bcl11b tumor suppressor allele that contributes to leukemogenesis. Leuk Res. 36: 1035-1040 (2012) 査読有り
9. Kominami R. Role of the transcription factor Bcl11b in development and lymphomagenesis. Proc Jpn Acad Ser B. 88: 72-87 (2012). 査読有り
10. Obata M, Kominami R, Mishima Y. BCL11B tumor suppressor inhibits HDM2 expression in a p53-dependent manner. Cell Signal. 24:1047-52 (2012). 査読有り
11. Okumura H, Miyasaka Y, Morita Y, Nomura T, Mishima Y, Takahashi S, Kominami R. Bcl11b heterozygosity leads to age-related hearing loss and degeneration of outer hair cells of the mouse cochlea. Exp Anim. 60:355-61 (2011). 査読有り
12. Enomoto T, Ohmoto M, Iwata T, Uno A, Saitou M, Yamaguchi T, Kominami R, Matsumoto I, Hirota J. Bcl11b/Ctip2

controls the differentiation of vomeronasal sensory neurons in mice. J Neurosci. 31:10159-10173 (2011). 査読有り

〔学会発表〕(計 3 件)

1. 木南 凌、郷 梨江香、葛城 美徳、小幡美貴、三嶋行雄. 放射線発がんにおける発がん母細胞と標的細胞 第 55 回大会 日本放射線影響学会、青森市(2013年 10月 18日)
2. 木南 凌. Radiation target cells in thymic lymphomas. 第 71 回日本がん学会学術総会、札幌市(2012年 9月 20日)
3. 葛城 美徳、郷 梨江香、木南 凌. 放射線照射後の腸上皮における Bcl11b の働き 第 55 回大会 日本放射線影響学会、仙台市 (2012年 9月 7日)

〔図書〕(計 0 件)

〔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： なし

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

木南 凌(KOMINAMI RYO)  
新潟大学医歯学総合研究科客員研究員  
研究者番号：40133615

### (2) 研究分担者

三嶋 行雄(MISHIMA YUKIO)  
新潟大学医歯学系准教授  
研究者番号：30142029

### 研究分担者

葛城 義徳(KATSURAGI YOSHINORI)  
新潟大学医歯学系助教  
研究者番号：60401759

### 研究分担者

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( )  
研究者番号：