

科学研究費助成事業（学術研究助成基金助成金）研究成果報告書

平成 25 年 6 月 25 日現在

機関番号：12102

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2011～2012

課題番号：23650228

研究課題名（和文）発癌組織を可視化する遺伝子改変マウスの開発

研究課題名（英文）Development of Transgenic Mice to Visualize Tumor Tissues

研究代表者

八神 健一（YAGAMI KENICHI）

筑波大学・医学医療系・教授

研究者番号：40166476

研究成果の概要（和文）：

本研究では、腫瘍細胞親和性を有するパルボウイルス由来P4プロモーター制御下でEGFPを発現するTgマウスを作製し、発がん組織を可視化可能なマウスを開発することを目的とした。作製したP4-EGFPマウスは精巣の精母細胞で特異的にEGFPが発現したが、精巣以外の主要組織ではEGFP発現は認められなかった。本マウスにMNUを投与し、発生した腫瘍組織についてEGFPの発現を観察したところ、一部のマウス腫瘍においてEGFPの発現を認めた。

研究成果の概要（英文）：

The present study is aimed to develop the transgenic mouse that express reporter gene, EGFP, under the parvovirus P4 promoter, and to visualize tumor by *in vivo* imaging. The P4-EGFP Tg mice older than 20-days old expressed EGFP in spermatocytes of testis, but not in other tissues. Some of tumor tissues in P4-EGFP mice induced with carcinogen or mating to oncogenic ras H2 Tg mice, were detectable by EGFP expression.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
交付決定額	2,900,000	870,000	3,770,000

研究分野：実験動物学

科研費の分科・細目：実験動物学・実験動物学

キーワード：EGFP, パルボウイルス、発癌

1. 研究開始当初の背景

発癌ウイルスである adenovirus type 12 や SV40(simian virus 40)は、ウイルスの増殖に対して非許容性であるハムスター細胞に *in vitro* transformation を起こし、新生仔ハムスターへの接種により癌を発生させる。これらのウイルスゲノム中の adenovirus E1A/E1B や SV40 T 抗原をコードする遺伝子が癌遺伝子をみなされ、これらの遺伝子の細胞への導入によっても細胞が癌化 (*in vitro* transformation) することが知られている。E1A/E1B 及び T 抗原の発癌メカニズムについては、癌遺伝子産物が癌抑制遺伝子産物と

結合（例えば、E1A と Rb, E1B と p53, SV40 と Rb/p53）し、癌抑制遺伝子産物の機能を抑制する等のメカニズムも明らかにされている。

一方、従来より、parvovirus は抗腫瘍活性をもつことが知られ、その鍵となる nonstructural proteins(NS)の機能解析が進みつつある。研究代表者は、parvovirus の NS が宿主ゲノムにエピジェネティック修飾を誘導し、宿主細胞に様々な表現型変化をもたらすことを示し、その現象が parvovirus の抗腫瘍活性、感染耐過細胞のウイルス感染抵抗性、アポトーシス抵抗性等に関与する可

能性を示唆してきた (J. Virol., 2001, 2005)。また、parvovirus は腫瘍細胞や細胞周期 S 期の細胞で増殖活性が高く、これには NS の発現を制御する P4 プロモーターには細胞周期や発癌に関連するいくつかの転写因子結合サイトがあることが関連していると考えられている。また、NS は転写コアロペーター CBP を介して様々な転写因子と相互作用し、宿主細胞遺伝子の発現を制御するほか、自身の P4 プロモーターにも作用する auto-regulation 機能も有している。特に、癌細胞では Ras が P4 プロモーターを活性化し、NS の発現を高め、過剰に発現する NS の細胞傷害性により癌抑制に向かうというメカニズムも示唆されている。

以上のように、parvovirus の癌抑制や病原性の解明には NS の機能と P4 プロモーターの腫瘍細胞特異的な活性が重要と考えられている。

一方、遺伝子改変マウスの普及により、生体機能をレポーター遺伝子の発現の有無により可視化する技術とそれを検出する in vivo イメージング装置の開発が進んでいる。マウスを用いた発癌実験において生体で発癌の経過や腫瘍組織を観察できれば、マウスの使用数も削減でき、発癌研究に有用なバイオリソースとなり得る。

2. 研究の目的

研究代表者は、これまでの研究過程で parvovirus NS の P4 プロモーターの持つ腫瘍細胞特異的な活性に注目し、腫瘍細胞特異的にレポーター遺伝子を発現させ、発癌の過程を in vivo でイメージング可能なマウス系統の開発を目的とした。

3. 研究の方法

(1) P4-EGFP マウスの作製

P4 プロモーターと EGFP を結合した導入遺伝子 (図 1) を C57BL/6 マウス受精卵にマイクロインジェクションし、常法に従いトランスジェニック (Tg) マウスを作製した。

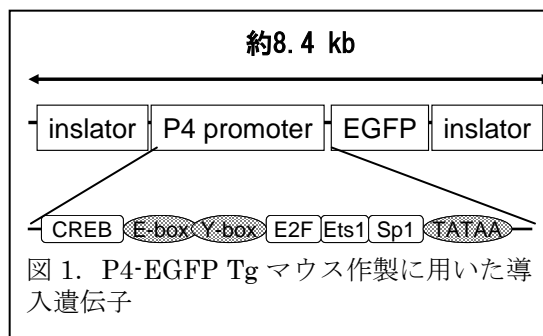


図 1. P4-EGFP Tg マウス作製に用いた導入遺伝子

(2) P4-EGFP マウスを用いた発癌実験

P4-EGFP マウスに MNU (N-methyl-N-nitrosourea) を接種し、発癌の経過を観察した。発癌が認められたマウスよりを麻酔下で腫瘍組織を摘出し、EGFP の緑色蛍光を蛍光顕微鏡により観察した。また、一部の組織は免疫染色で EGFP の発現を検出した。

さらに、P4-EGFP マウスとヒト由来のプロト型癌遺伝子 c-Ha-ras を持つ rasH2 マウスと交配し、P4-GFP および c-Ha-ras を保有するマウスを得た後、この P4-EGFP/ras H2 マウスに MNU を接種し、同様に発癌の経過観察、生体での腫瘍部位の観察を IVIS @spectrum で行うと共に、提出した腫瘍組織でのレポーター遺伝子の発現を観察した。

4. 研究成果

(1) P4-EGFP マウスの作製

導入遺伝子を 340 個の C57BL/6J マウス受精卵にマイクロインジェクションし、ICR 偽妊娠マウスに胚移植し 119 匹のマウスを得た。この中から 8 匹のマウスが導入遺伝子を保有し、子孫への継代可能な 6 ラインのうち発現量の多い 4 ラインのマウスについて、EGFP の発現状況を蛍光顕微鏡により観察した。その結果、精巣において、弱い緑色蛍光が認められた。さらに心臓、肝臓あるいは精巣由来の各細胞について、FACS 解析により EGFP を検出した。その結果、図 2 に示すとおり、4 ラインの Tg マウスの精巣由来細胞において、それぞれ 9.0%、5.4%、2.6%、1.31% が EGFP 陽性細胞であり、野生型マウスの精巣由来細胞 (0.05%) と明らかな差が認められた。一方、心臓および肝臓由来細胞においては、いずれも 0.05% 以下で野生型マウスとの差は認められなかった。

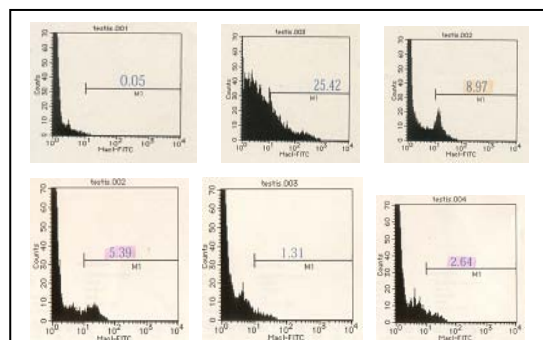


図 2. FACS 解析による精巣由来細胞中の EGFP 陽性細胞の検出

上段左：野生型マウス、上段中：CAG-EGFP マウス (陽性対照)、上段右：P4-EGFP マウス line 6、下段左：P4-EGFP マウス line 97、下段中：P4-EGFP マウス line 105、下段右：P4-EGFP マウス line 110

次に、精巣の凍結組織切片を抗 EGFP 抗体で免疫染色したところ、図 3 に示すように生後 20 日齢以上のマウスの精母細胞において EGFP 陽性の反応が認められた。生後 20 日齢未満の幼齢個体の精巣およびその他の組織においては、EGFP 陽性の細胞は検出されなかった。

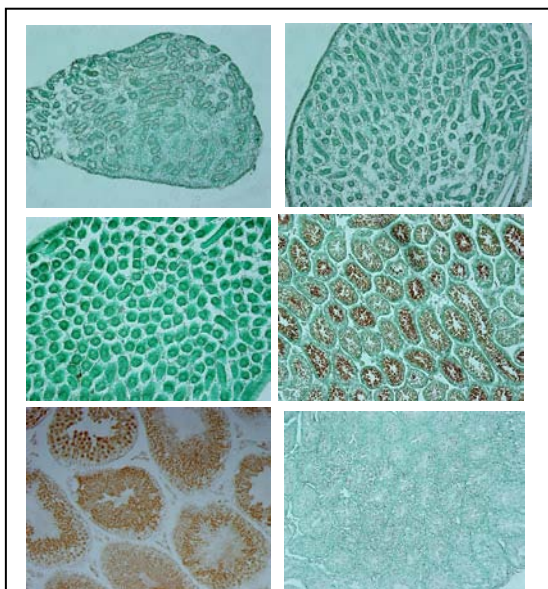


図 3. 精巣における EGFP 陽性細胞
上段左：0 日齢 Tg マウス、上段右：3 日齢 Tg マウス、中段左：8 日齢 Tg マウス、中段右：20 日齢 Tg マウス、下段左：8 週齢 Tg マウス、下段右：8 週齢野生型マウス

(2) 組織および生体での EGFP 検出の条件検討

P4-EGFP マウスの繁殖および ras H2 マウスとの交配、さらに発癌実験の観察に多くの時間を要したため、この間に組織および生体での EGFP 発現の観察について、蛍光顕微鏡および *in vivo* イメージング装置 (IVIS@spectrum) の各種観察条件の検討を行った。検討には、別途に作製した Cre 発現により EGFP の発現を制御可能な Tg マウスを用いた。これらのマウスでは、組織中の EGFP の発現を高感度に検出でき、非特異的な反応は認められず、イソフルラン麻酔下のマウス生体でも EGFP の発現組織を検出が可能であった (データは示さない)。

(3) P4-EGFP マウスを用いた発癌実験

6 週齢の P4-EGFP マウス 10 匹に MNU(150mg/Kg)を隔週 4 回、経口投与し、30 週間にわたり、発癌の状況を観察した (P4-EGFP/MNU 群)。

また、癌遺伝子 c-Ha-ras を持つ rasH2 マ

ウスと交配し、両遺伝子を有するマウス (rasH2/P4-EGFP マウス) を得た。6 週齢の rasH2/P4-EGFP マウス 10 匹に、MNU (75Mg/Kg BW)を隔週 2 回、腹腔内投与し、26 週間にわたり発癌の状況を観察した (ras H2/P4-EGFP/MNU 群)。

その結果、P4-EGFP/MNU 群では、観察期間の終了時に行った剖検により、3 匹の胃に腺癌が組織学的に認められたが、摘出した胃組織において、蛍光顕微鏡下が EGFP の発現を示す緑色蛍光は観察できなかった。

一方、ras H2/P4-EGFP/MNU 群では、投与開始後 20 週および 25 週で、*in vivo* イメージング装置 (IVIS imaging system) により EGFP の発現状況を全身麻酔下で観察した。しかし、いずれのマウスにおいても陽性像は観察されなかった。さらに、ras H2/P4-EGFP/MNU 群の各マウスを 26 週で安楽死させ剖検した。剖検により、10 匹中 3 匹にリンパ腫、2 匹に胃腺癌、2 匹に肺腺癌が認められた。

これらの腫瘍組織について、蛍光顕微鏡により EGFP の発現を観察したが、明瞭な発現は認められなかった。リンパ腫由来細胞および同個体の脾臓由来細胞を FACS により解析したところ、リンパ腫由来細胞では EGFP 陽性細胞が認められた。しかし、リンパ腫発症個体の脾臓では陽性細胞を検出できなかった (図 4、データは一部のみ公表)。

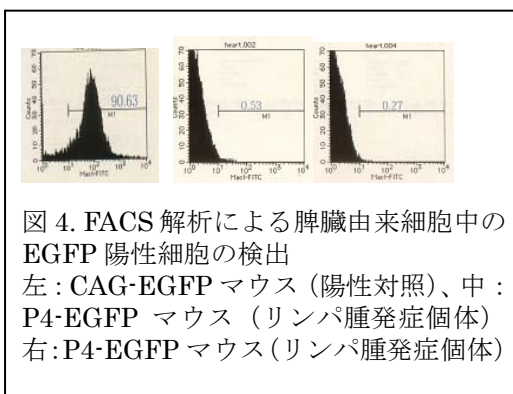


図 4. FACS 解析による脾臓由来細胞中の EGFP 陽性細胞の検出
左：CAG-EGFP マウス (陽性対照)、中：P4-EGFP マウス (リンパ腫発症個体)
右：P4-EGFP マウス (リンパ腫発症個体)

以上の結果より、P4-EGFP マウスは精母細胞特異的にレポーター遺伝子である EGFP を発現し、精母細胞にパルボウイルスの P4 プロモーターの活性を亢進させる何らかに宿主因子が存在することが示唆された。このマウスに実験的発癌を生じさせたが、腫瘍細胞で顕著な EGFP の発現は認められなかった。リンパ腫細胞で EGFP 陽性細胞が検出されたことから、P4 プロモーターがリンパ腫細胞で活性が亢進し EGFP を発現したことは確実であるが、それは組織レベルあるいは生体での *in vivo* イメージングで検出できるレベルではなかったと考えられる。今後、*in vivo* イメージングの条件を適正化するこ

とで、検出可能となるかどうかの検討が必要である。また、他の腫瘍組織で発癌過程を可視化するには、P4 プロモーターの活性をさらに高めるような導入遺伝子を検討する必要があると考えられた。一方で、精母細胞で特異的にEGFPを発現するP4-EGFPマウスは精子発生機構の研究に応用可能なバイオリソースとなり得ることが示唆された。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計1件)

① G. HASEGAWA, Y. DAITOKU, K. SEKIGUCHI, K. YAGAMI et. al., (査読あり、11名中11番目) Novel ROSA 26 Cre-receptor Knock in C57BL/6N mice exhibiting green emission before and red emission after Cre-mediated recombination. *Experimental Animals*, 2013 (in press)

〔学会発表〕(計2件)

①大徳陽子・長谷川賀一・八神健一ほか、血管内皮系譜細胞にCre酵素を発現するトランスジェニックマウスの開発、第59回日本実験動物学会総会、2012年5月24日、別府

②関口溪人・長谷川賀一・八神健一ほか、Rosa26遺伝子座へのCAG/EGFP-tds Red遺伝子挿入による新規Creレポーターマウスの開発、第59回日本実験動物学会総会、2012年5月24日、別府

6. 研究組織

(1) 研究代表者

八神 健一 (YAGAMI KENICHI)

筑波大学・医学医療系・教授

研究者番号：40166476