

論文の内容の要旨

論文題目 **Gastrointestinal Tumorigenesis in *Smad4* Mutant Mice**
(*Smad4* ノックアウトマウスにおける消化器癌の解析)

氏名 高 久 和 明

[序論]

ヒト第18番染色体長腕の欠損は膵臓癌の約90%で、また大腸癌の約30%で認められる現象であり、*DCC* 遺伝子の欠損がその原因とされてきた。しかし近年、膵臓癌において *SMAD4* (*DPC4*) 遺伝子が原因遺伝子として単離され、*DCC* 遺伝子座の近傍に存在することが明らかにされた。*Smad4* 遺伝子はショウジョウバエの *Mad* 遺伝子と相同性を示し、TGF- β スーパーファミリーの情報伝達経路に関与していることが知られている。

TGF- β スーパーファミリーは、様々な機能を有するポリペプチドとして知られているが、特に TGF- β の主な作用として、正常上皮細胞の増殖抑制効果が知られている。しかし TGF- β の増殖抑制作用に対する抵抗性は、浸潤、転移といった悪性化進行癌で多く見られる現象である。さらに、この情報伝達経路に関わる遺伝子の変異および不活性化が多数報告され、またトランスジェニックマウスの解析からも、TGF- β 情報伝達経路の遮断と悪性化進展の関連を示す状況証拠が蓄積している。癌の悪性化進行の機序を探索する上で、TGF- β 情報伝達経路において中心的な役割をしている *SMAD4* 遺伝子を解析することは極めて重要なものと考えられた。そこで我々は、癌形成における *SMAD4* 遺伝子の役割を解析するために、*Smad4* 遺伝子ノックアウトマウスの作出を試みた。

[本論]

1. *Smad4* 遺伝子ターゲティングベクターの構築とノックアウトマウスの作出

Smad4 遺伝子のエキソン 1 から 4 までを含む 10.8 kb 鎖長のゲノム DNA を単離し、このゲノム DNA を用いて、ターゲティングベクターを構築した(図 1)。このベクターを ES 細胞 D3a2 に導入した後、192 個の G418 耐性コロニーのうち 7 個の相同性組み換えクローンを同定した。3 個の相同組替えクローンを C57BL/6 由来の 3.5 日胚へ移植した後、キメラマウスを作出し、*Smad4* 遺伝子ノックアウトマウスを獲得した。

1-1. *Smad4* ^{-/-}マウスの解析

ホモ接合体マウスは胎生 7.0 日で致死であり、原条形成と中胚葉が形成不全で、BMP 受容体 (*Bmpr*) のノックアウトマウスで観察された表現型と類似していた(表 1、図 2)。

1-2. *Smad4* ^{+/-}マウスの解析

Smad4 ^{+/-}マウスは、少なくとも 1 年齢まで生育および繁殖能力は正常で、外見および行動にも異常は認められず、各種臓器、特に脾臓や消化器においても、異常は認められなかった。しかし、1 年齢を過ぎた *Smad4* ^{+/-}マウスでは、胃の幽門部および十二指腸にポリープが観察された(表 2、図 3、図 4)。

幽門部のポリープの腺腔の形状は、間質細胞の増殖に伴い様々な分様をみせている。腺腔を構成している細胞は過形成を示しており、均一な細胞であった(図 3C, D)。中には異形成を示す腺腔細胞が認められた(図 3E)。間質には形質細胞や好酸球などが多数浸潤しており、炎症性ポリープ様を呈しており、ヒト家族性若年ポリープの特徴と近似していることが判明した。

このポリープ細胞で *Smad4* 遺伝子のヘテロ接合性の消失(LOH)が誘発されているかを解析した結果、野生型染色体を示すバンドが検出できなかった(図 5A)。さらに、ポリープ細胞では *Smad4* タンパク質が発現していないことも確認できた(図 5B, C)。また、十二指腸の初期ポリープにおいても同様な結果が得られた。以上の結果から、*Smad4* 遺伝子の LOH が、ポリープ発生初期段階でおこる現象の一つであることが示唆された。

次に *Smad4* 遺伝子以外の遺伝子に変異を解析した。まず、Wnt 情報伝達経路の異常によりβ-カテニンが核へ移行することが知られている。本マウスのポリープにおいては、β-カテニンは細胞膜に局在し、核移行は認められなかったことから(図 5D, E)、少なくとも Wnt 情報伝達経路に関与する遺伝子群には変異が導入されていないことが示唆された。現在、一部の家族性若年ポリープ症や Cowden 病の責任遺伝子として知られている *PTEN* 遺伝子にも変異は認められなかった。さらに、消化器癌の悪性化進展に関与すると報告されている *K-ras2* 遺伝子およ

び p53(Trp53)遺伝子にも変異導入は確認できなかった。

1-3. *Smad4* +/- の総括

Smad4 +/- マウスの加齢に伴い発生する幽門部や十二指腸のポリープ形成において、少なくとも *Smad4* 遺伝子の LOH がひとつの原因であることが示唆された。このポリープは、ヒトの過誤腫である家族性若年ポリープの特徴を備えていた。今後、さらにポリープの発生機序を解明していく予定である。

2. *Apc*^{Δ716} +/- *Smad4* +/- シス複合変異マウスの解析

背景： 家族性大腸ポリープ症や散発性の大腸癌では、Vogelstein らにより多段階発癌モデルが提唱され、早期の腺腫から癌化への進行過程で APC 遺伝子、K-ras 遺伝子、第 18 番染色体長腕領域の欠損、p53 遺伝子といった癌抑制遺伝子や癌遺伝子が多段階に変異を受けていることが示されている。ヒト第 18 番染色体欠損領域の DCC 遺伝子が、悪性化進行の鍵となる癌抑制遺伝子であると考えられていたが、*Dcc* 遺伝子と *Apc* 遺伝子との欠損マウスの解析結果より、*DCC* 遺伝子の欠損が癌の悪性化進展に直接関与していないことが報告された。

2-1. シス複合変異ヘテロマウスの作出と LOH の解析

ヒト APC 遺伝子は第 5 番染色体、ヒト SMAD4 遺伝子は第 18 番染色体に位置しているのに対し、マウスでは *Apc*、*Smad4* 両遺伝子とも第 18 番染色体上に存在しており、両遺伝子座の距離は 30 cM であることが判明した(図 6)。また *Apc*^{Δ716} マウスにおけるポリープ形成には、*Apc* 遺伝子の LOH による two hits が必要であり、野生型 *Apc* 遺伝子を持つ染色体全体の欠失によって起こると考えられていた。そこで我々は、*Apc* 変異遺伝子と *Smad4* 変異遺伝子を同一の染色体にもつマウス(シス複合変異ヘテロマウス)の作出を試みた。*Smad4* +/- マウスと *Apc*^{Δ716} +/- マウスを交配し、トランス複合変異ヘテロマウスを作出した(図 7)。次に、トランス複合変異ヘテロマウスを C57BL/6 に戻し交配することにより、シス複合変異ヘテロマウスを獲得した。実際、138 匹の子供のうち、野生型マウスが 23 匹、シス複合変異ヘテロマウスが 19 匹得られ、減数分裂時の組換え効率が 30.4% [(19+23) / 138 x 100] であり、両遺伝子座の距離 30cM に一致した。

本マウスのポリープ上皮細胞において、野生型 *Apc* 遺伝子だけでなく、野生型 *Smad4* 遺伝子の欠損を確認した(図 8A)。さらに継代培養可能な細胞を用いて FISH 法を行った結果、2 つのスポットが検出できた(図 8B)。以上の結果から、シス複合変異ヘテロマウスのポリープ細胞において、第 18 番染色体の LOH は、変異型染色体の再倍体化が起り、*Apc* 遺伝子に加えて *Smad4*

遺伝子もホモ接合体となることが明らかとなった。

2-2. シス複合変異マウスのポリープの組織病理学的解析と皮下移植実験

本マウスの腸管において、同じ遺伝的背景を持つ Apc^{A716} マウスと比較すると、ポリープの増殖亢進が認められ、加齢に伴いより大きなポリープ数の割合が亢進していた(図 9)。組織学的解析結果より、悪性化進展の一つの指標である腸管の粘膜下層への浸潤像(表 3)や著しい間質増生が観察された(図 10, 11)。 Apc^{A716} マウスにおいて腺腔を構成している細胞は、未分化で均一な細胞であるが、本マウスでは、特に浸潤している領域の腺腔構造は、かなり不規則で、微小腺腔構造などの形態を示し、均一でないヘテロな集団により構成されていた。浸潤領域の細胞は、酸性粘液を産生しており、予後不良な患者で散見する印環細胞も認められた。

また、ポリープ細胞の造腫瘍能を調べる為に、ヌードマウスへの皮下移植実験を行い、2ヶ月間の経過観察をした結果、 Apc^{A716} マウスの 12 塊のうち 1 つが、シス複合変異ヘテロマウスの 12 塊のうち 9 個が、皮下へ定着していた。従って、ヌードマウスへの移植といった *in vivo* における造腫瘍性の評価系においても、シス複合変異ヘテロマウスのポリープ細胞は、 Apc^{A716} マウスの細胞と異なることが明らかとなった。

以上の結果から、*Smad4* 遺伝子の欠損は、細胞の悪性化進展の獲得に関与していることが示唆された。

2-3. シス複合変異ヘテロマウスの腸管以外の表現型の解析

腸管以外の表現型としては、複数のマウスの十二指腸乳頭部の膵管開口部で癌が形成されており、これもまた悪性化進展した FAP 患者で散見する像である(図 12)。この癌細胞にも *Smad4* 蛋白質が発現していないことを免疫組織学的解析により確認している。

また、皮下組織において、多数のマウスにシスト(嚢)形成が認められた(図 12E, F)。これは、*Apc* 変異マウスにガン誘発剤を投与したときに観察されたものと同様であり、このシスト形成にも *Smad4* 遺伝子の欠損が関与していることが示唆された。

2-4. シス複合変異マウスの総括

シス複合変異ヘテロマウスにおけるポリープでは、筋層への浸潤亢進、著しい間質増生、腺腔形成細胞のヘテロ化といった組織病理学的な悪性度だけでなく、ヌードマウスへの皮下移植能の獲得といった細胞の造腫瘍性を示すことができた。従って、腸癌において *Smad4* 遺伝子の欠損が悪性化進展に深く関与していることが示されたのである。

今後本マウスを用いて浸潤や転移に関わる蛋白質などを詳細に解析するとともに、化学療法の高次評価系マウスとしての利用を考えている。