

[別紙 1]

論文の内容の要旨

Cre-loxP system を利用した活性化型 K-ras 発現系の構築

指導教官 山本一彦教授

東京大学大学院医学系研究科

平成 8 年 4 月入学

医学博士過程

内科学専攻

中山雅晴

K-ras は分子量 21000 (p21) の GTPase 活性を持つたんぱく質である。wild type の K-ras は癌抑制遺伝子である。逆に、突然変異を持った K-ras は癌遺伝子として機能する。ras 遺伝子の突然変異は、膵臓、大腸、肺の adenocarcinoma で高率に認められる。K-ras の突然変異は Exon 1 に集中しており、codon12、codon9-32、61 にも point mutation を認める。Codon 12 では G→T transversion が非常に多い。K-ras の突然変異がある腺癌では既に転移していることが多い。マウス肺では活性化型 K-ras の発現のみで 100%癌が生じる。このように肺癌を初めとする癌では、活性化型 K-ras が発癌の過程で重要な役割を果たしている。しかし、活性化型 K-ras の発現時期はコントロールできない。また、活性化型 K-ras の cDNA の transfection を用いた実験系では K-ras は強発現してしまう。

活性化型 K-ras の発現時期を外部からコントロールできれば、K-ras に mutation が起きてから発癌に至る time course が追えるし、また、k-ras 遺伝子の強発現が伴わずに genome 上の K-ras 遺伝子に point mutation のみが生じる方が現実の発癌過程に近い。特定の細胞や組織のみに遺伝子の突然変異が起きることが普通で、正常に機能する生物個体の中で突然変異が生じて癌が発生することを考えると、特定の

組織や細胞に意図的に遺伝子の変化を生じさせるコンディショナルジーンターゲットイングのマウスの実験系が最適と思われる。

活性化型 K-ras のコンディショナルジーンターゲットイングのマウスの実験系には Cre-loxP system を利用した。Cre-recombinase は、loxP 配列を認識し、組み換えを起こす。Cre-recombinase は、二つの loxP 配列が同じ向きに存在する場合は、loxP 配列に挟まれた DNA 配列が環状となって切り出され、一つの loxP 配列のみが残る形となる。また、loxP 配列が逆向きに存在する場合は、挟まれた DNA 配列の反転が起こる。ノックアウトマウスの作成技術を応用して loxP 配列がゲノムに入ったマウスを作成する手技が確立していること、Cre-recombinase を発現する手段として、組織特異的に発現する Cre-recombinase を持った transgenic mouse が多種存在して応用されていることや Cre-recombinase をのせたアデノウイルスベクターが存在して、組織特異的に、また、発現時期をコントロールできることなどから、コンディショナルジーンターゲットイングが容易に行うことができる。

このシステムを in vitro の系で、図のような tester plasmid を作成して検討した。また、Cre-recombinase としては AdexCre (AxCANCre) というアデノウイルスベクターを使用した。Cre-loxP system を用いた活性化型 K-ras の発現系を in vitro で検討する目的でテスタープラスミドを作成した。特徴としては、極力 genome 上の k-ras に近いよう設計し、1. rotation type と trap type 2. point mutation で G12V 3. 内因性の promoter、4. splicing acceptor も内因性 5. genome の DNA は全く削れていない、6. 活性化型 k-ras が発現しないときは GFP もしくは LacZ が発現する、などが挙げられる。

上記テスタープラスミドを NIH3T3 細胞に transfection して focus 形成を検討することにより、trap type で transform 能の出現が認められた。trap type については、Cre-recombinase が作用すると loxP 配列に挟まれた LacZ 遺伝子が欠失して活性化型 K-ras が発現するかを確認するために、K-rasZ が stable に integrate された NIH3T3 細胞を獲得することを試みた。

K-rasZ を neomycin 耐性遺伝子と co-transfection することによって取れた stable clone についての検討では、通常は LacZ 遺伝子が発現して活性化型 K-ras は発現していないが、Cre-recombinase が作用すると loxP 配列に挟まれた LacZ 遺伝子が切り出されて LacZ の発現が消失し、活性化型 K-ras が発現して transform 能が出現した。これにより trap type のシステムは十分機能することが証明された。

rotation type でも transform 能は出現すると思われるが、focus 形成数が少なかった。しかし、これらの focus を形成した細胞を subcloning して活性化型 K-ras の発現を RT-PCR と Aci I digest を組み合わせた方法で検討したところ、trap type でも rotation

type でも focus が形成された部位では G12V の point mutation の入った K-ras が発現していた。

FACS-gal による方法では、6 クローン得られたが、実際に活性化型 K-ras が企図通り発現しなかった。予定外に挿入される loxP 配列の問題を克服するには、特殊なベクターに組み込んで transfection するか、homologous recombination を利用した knock in のシステムにする方がよい。

3 回 FACS-gal を行っても濃縮できない理由としては、K-ras の promoter 自身の性質や K-rasZ が integrate された locus で、細胞の状態に LacZ の発現が左右されるものがあることや、このような細胞の方が LacZ を常に発現している細胞より増殖が速いことなどが原因として考えられる。これを改善するには、常に LacZ 遺伝子が発現するもの以外は細胞が死ぬようにしなければならない。LacZ 遺伝子に neomycin 遺伝子をさらにつなげて negative な細胞が死ぬように設計すべきであろう。FDG の毒性も考えられる。また、transfection した DNA が 24kb と非常に長く、LacZ 遺伝子だけの発現で細胞を取っても、完全長入っているとは限らないことから、特殊なベクターに組み込んで transfection するか、homologous recombination を利用した knock in のシステムにする方がよいと思われる。

rotation type では普段は EGFP が発現しているが、Cre-recombinase を作用させると EGFP の発現が消失すると考えられた。活性化型 K-ras の発現に関しては、focus の形成数が少なかったが、形成された focus では活性化型 K-ras が発現しており、システムが全く動かないとは断定できなかった。しかし、K-rasG の transfection で GFP が発現する数と同等数の focus ができてよいと思われる。rotation type で transform 能が十分得られない理由としては EGFP 遺伝子と loxP 配列の位置が原因と思われる。EGFP の発現のためには数 kb の fragment が連続して integrate されればよいのに対し、活性化型 K-ras が発現するには二十数 kb の fragment が連続して integrate されなければいけないという点も影響する。この allele 構造による活性化型 K-ras の発現を妨げという問題を断定するには homologous recombination を用いた実験系か integrate されるコピー数をコントロールできる vector を用いた transgenic の実験系で検討する必要がある。

今後 trap type のマウスを作る際に、FACS-gal を利用して ES 細胞の selection を行うことも考えられるが、細胞のダメージが大きいこと、細胞の濃縮がなかなかない事を考えると、実用は困難と思われる。染色操作の必要な LacZ 遺伝子ではなく EGFP 遺伝子で trap type を作るほうがより実用的であろう。

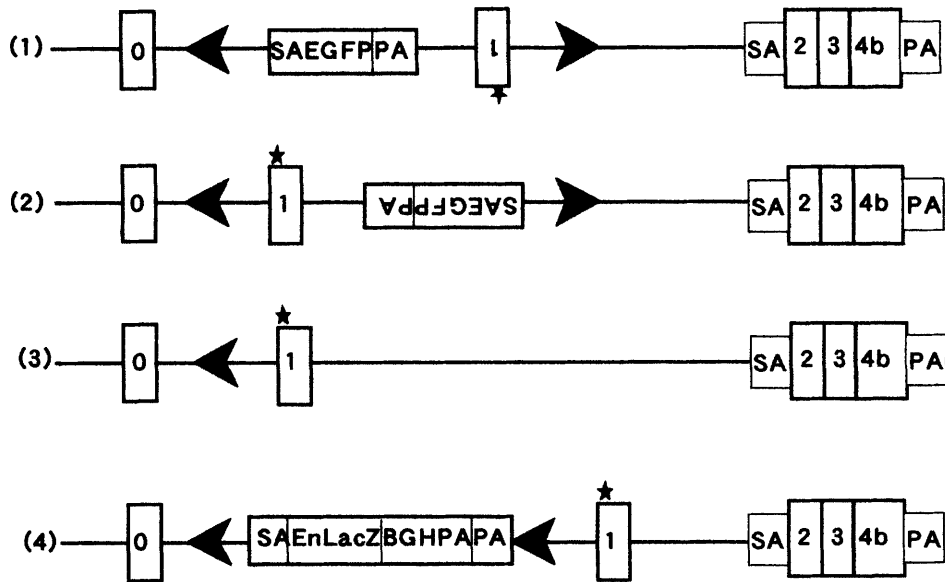


図 4 種類の tester plasmid. 1. K-ras G 2. K-rasG1 3. K-rasL 4. K-rasZ
 ★ : point mutation(G12V) 黒い三角: loxP 配列 SA: splicing acceptor EGFP:
 enhanced GFP 遺伝子 PA: poly A EnLacZ: enhancer+SV40T 抗原核移行シグナル
 +LacZ 遺伝子 BGHPA: bovine growth hormone poly A 数字の box は K-ras の exon

LacZ マウスの肺で LacZ 遺伝子が発現しているか X-gal 染色を行って確認した。その結果、血球を除く肺を構成するあらゆる細胞で発現していることが分かった。このことから、sLacZ マウスの肺で Cre-recombinase が働けば LacZ 遺伝子が発現するはずである。sLacZ マウスの鼻から AdexCre100 μ l を吸入させ、肺の X-gal 染色を行った。その結果、気管支上皮、肺胞上皮で青く染まる部分が認められ、LacZ 遺伝子の発現が確認された。Cre-loxP システムを利用した活性化型 K-ras の発現マウスの作成は可能で、マウス肺における conditional gene targeting は、AxCANCre の吸入によって行うことが可能である。