

論文の内容の要旨

論文題目 : ヒト腸癌発症モデルマウスにおける遺伝子発現変化の解析
氏名 : 松永 章弘

癌（悪性新生物）による死亡は現在我が国の死亡要因の第一位を占めている。中でも腸癌の死亡者数は肺癌・胃癌に次いで三番目に多く、さらに近年、食生活の欧米化に伴い我が国では増加傾向を示してきた。そのため、腸癌発生・進行メカニズムの研究・解明は多大な期待を担うものである。腸癌は複数の遺伝子変異の蓄積により多段階に進行すると考えられているが、中でも腫瘍抑制遺伝子である APC 遺伝子の両対立遺伝子の不活化変異は腸癌の発生起因イベントとして、家族性大腸腺腫症並びに散发性腸癌においても重要である。このことから APC 遺伝子の変異により生じる様々な変化を明らかにすることは、腸癌形成早期のメカニズムの解明につながると考えられる。以前我々の研究室で作出された家族性大腸腺腫症モデルマウスである *Apc* 遺伝子ノックアウトマウス（以下 *Apc*^{Δ716} マウス）は、ヘテロ接合性の欠失により *Apc* 遺伝子の両対立遺伝子に機能欠失型変異を起こし、腸全体にポリプを形成する。そこで、我々は腸癌早期発生メカニズムの解明を目的として、*Apc* 遺伝子の片対立遺伝子に変異が生じた *Apc*^{Δ716} マウス腸管正常組織並びに *Apc* 遺伝子の両対立遺伝子に変異が生じたポリプ組織での遺伝子発現変化の解析を、多遺伝子発現同時解析法であるマイクロアレイ法・DNA チップ法を用いて行った。

III ヒト腸癌発症モデル *Apc*^{Δ716} マウスポリプにおける遺伝子発現プロファイル解析

3匹の18週齢 *Apc*^{Δ716} マウス回腸に発生した直径1 mm以上のポリプ組織とポリプに隣接した正常絨毛組織より RNA を回収し、マイクロアレイ法・DNA チップ法により個々の組織での遺伝

子発現プロファイルを作成した。これらの遺伝子発現プロファイルをポリプ組織・正常絨毛組織間で比較した結果、両方法に共通して有意に発現変化を示した複数の遺伝子が得られた。このうち、隣接正常絨毛組織と比較してポリプ組織で発現低下が見られたのは 47 遺伝子 (Table 1.)、一方、発現亢進が見られたのは 9 遺伝子であった (Table 2.)。次に、これら発現変化が見られた 56 遺伝子中 8 遺伝子 (発現上昇 4 遺伝子、発現低下 4 遺伝子) について、異なる 3 匹の *Apc*^{Δ716} マウスポリプ組織由来 total RNA を用いて semi-quantitative RT-PCR 法により遺伝子発現量の比較を行った。その結果、いずれの遺伝子においてもその発現変化はマイクロアレイ法・DNA チップ法で得られた結果と合致した。このことから、これらの多遺伝子発現同時解析法より得られる遺伝子発現プロファイルは、*Apc* 遺伝子の変異から生じた普遍的变化であると結論付けることが出来た。

Table 1. Genes down-regulated in *Apc*^{Δ716} mouse polyps

Category	Gene name	Fold decrease	
		DNA chip ^(a)	cDNA Microarray ^(b)
Tumor associated	Guanylate cyclase activator 2b (retina)	17.5	3.17
	Vitamin D receptor	5.18	2.20
	Trefoil factor 3, intestinal	6.28	2.85
	Kangai 1	7.28	1.97
	Max dimerization protein	7.57	1.93
	Cyclin G2	14.1	1.91
	Calmodulin	6.87	1.95
Immunity	Beta-2 microglobulin	11.0	3.96
	Histocompatibility 2, class II antigen E beta	13.9	3.56
	Immunoglobulin joining chain	21.9	3.06
	Ia-associated invariant chain	17.9	2.98
	Immunoglobulin kappa chain variable 28 (V28)	13.2	2.39
	Adenosine deaminase	39.8	2.09
	Cathepsin S	9.39	2.09
	Proteasome subunit, beta type 8	13.8	2.04
	ATP-binding cassette, subfamily B, member 1	10.8	1.77
	Vanin 1	26.1	2.82
	Small inducible cytokine A25	23.0	3.35
	Interferon consensus sequence binding protein	11.3	1.88
	Differentiation marker	Fatty acid binding protein, liver	20.5
Fatty acid binding protein, intestinal		7.99	3.98
Glutamyl aminopeptidase		24.1	3.16
Villin		8.89	2.26
Kruppel-like factor 4 (gut)		10.9	2.13
Intelectin		8.11	2.10
Solute carrier family 27, member 4		7.79	2.58
Miscellaneous	Angiotensin converting enzyme	15.0	2.78
	Villin 2	11.6	2.62
	Cysteine rich intestinal protein	9.11	3.21
	Solute carrier family 7, member 9	20.5	3.05
	Cytochrome P450, 2b10, phenobarbital inducible, type b	9.91	2.78
	Uridine phosphorylase	18.5	2.63
	Transcobalamin 2	90.1	2.53
	Cytochrome P450, subfamily IV B, polypeptide I	16.6	2.16
	Membrane protein, palmitoylated (55 kDa)	24.3	2.13
	Glutaredoxin 1	6.89	2.04
	Solute carrier family 7, member 7	10.8	2.02
	Sterol carrier protein 2, liver	12.1	2.01
	Sialyltransferase 4C	17.8	1.96
	Peptidase 4	22.7	1.88
	Cifrate synthase	7.77	1.86
ESTs	Hydroxyacyl-Coenzyme A dehydrogenase	12.0	1.78
	RIKEN cDNA 1110025H08 gene	8.61	2.56
	RIKEN cDNA 1810010M01 gene	6.61	2.41
	Expressed sequence AI428538	11.0	2.04
	DNA segment, Chr 1, University of California at Los Angeles 3	7.62	1.97
	RIKEN cDNA 1600012D06 gene	13.2	1.87

Table 2. Genes upregulated in *Apc*^{Δ716} mouse polyps

Category	Gene name	Fold increase	
		DNA chip ^(a)	cDNA Microarray ^(b)
Cell cycle	Calcium binding protein A6 (calcyclin)	1.53	5.53
Anti-apoptosis	Immediate early response 3	2.25	2.03
Inflammation	Lipocalin 2	2.88	3.35
Extracellular matrix	Phospholipase A2, group II A	2.12	2.27
	Procollagen, type I, alpha 1	1.40	1.88
	Cathepsin L	1.61	3.73
Miscellaneous	Chromobox homolog 3	7.07	1.89
EST	Keratin complex 1, acidic, gene 18	1.42	1.82
	EST A1426782	1.41	2.14

(a) DNAチップ法のFold increaseは、ポリプ組織average difference : 正常組織average difference ratioを示す。

(b) cDNA マイクロアレイ法のFold increaseは、ポリプ組織signal intensity : 正常組織signal intensity ratioを示す。

これらの遺伝子発現変化から、腸癌発生早期段階であるポリプ組織は次のような性質を持つ事が推察される。

Calcyclin 遺伝子は細胞周期S期に発現上昇が見られ、細胞増殖制御に関与すると考えられている。ポリプ組織内でこの遺伝子の発現亢進が認められたことは、ポリプ内では細胞増殖期にある細胞の数が増加している事実と一致する。

また、DNA 損傷や細胞内情報伝達異常などの刺激によるアポトーシス誘導に対する抗アポトーシス機構に関与する遺伝子として知られる immediate early response 3 遺伝子の発現亢進が見られたことから、ポリプ組織は腸癌早期段階で抗アポトーシス能を獲得しており、この性質はDNA に変異を持った細胞の生存に寄与していると考えられる。これら細胞増殖能・抗アポトーシス能といった性質の獲得によりポリプ組織での細胞数の増加が起こり、結果としてポリプ組織の増大が生じていると考えられる。

一方、好中球、リンパ球などの炎症反応の制御に関与する lipocalin 2 遺伝子のポリプ組織での発現亢進が見られた。また、以前我々は、アラキドン酸代謝酵素の1つとしてプロスタグランジン産生を行い、炎症反応に関与する cyclooxygenase-2 遺伝子がポリプ組織内の間質細胞で発現誘導されることを報告した。これらのことから、ポリプ組織の間質細胞では発生早期段階から炎症様反応が惹起されていると考えられる。

また、ポリプ形成過程において上皮細胞は間質細胞間に入り込む様に腺腔を構成する事から、この過程では細胞や基底膜の消化と生成が起こっていると考えられる。遺伝子発現変化解析の結果、細胞外基質消化に関与する cathepsin L 遺伝子や、間質基底膜構成成分である procollagen, type I, alpha I 遺伝子の発現亢進が見られた事から、ポリプ形成増大過程において、間質組織の再構成が起こっている事が示唆される。

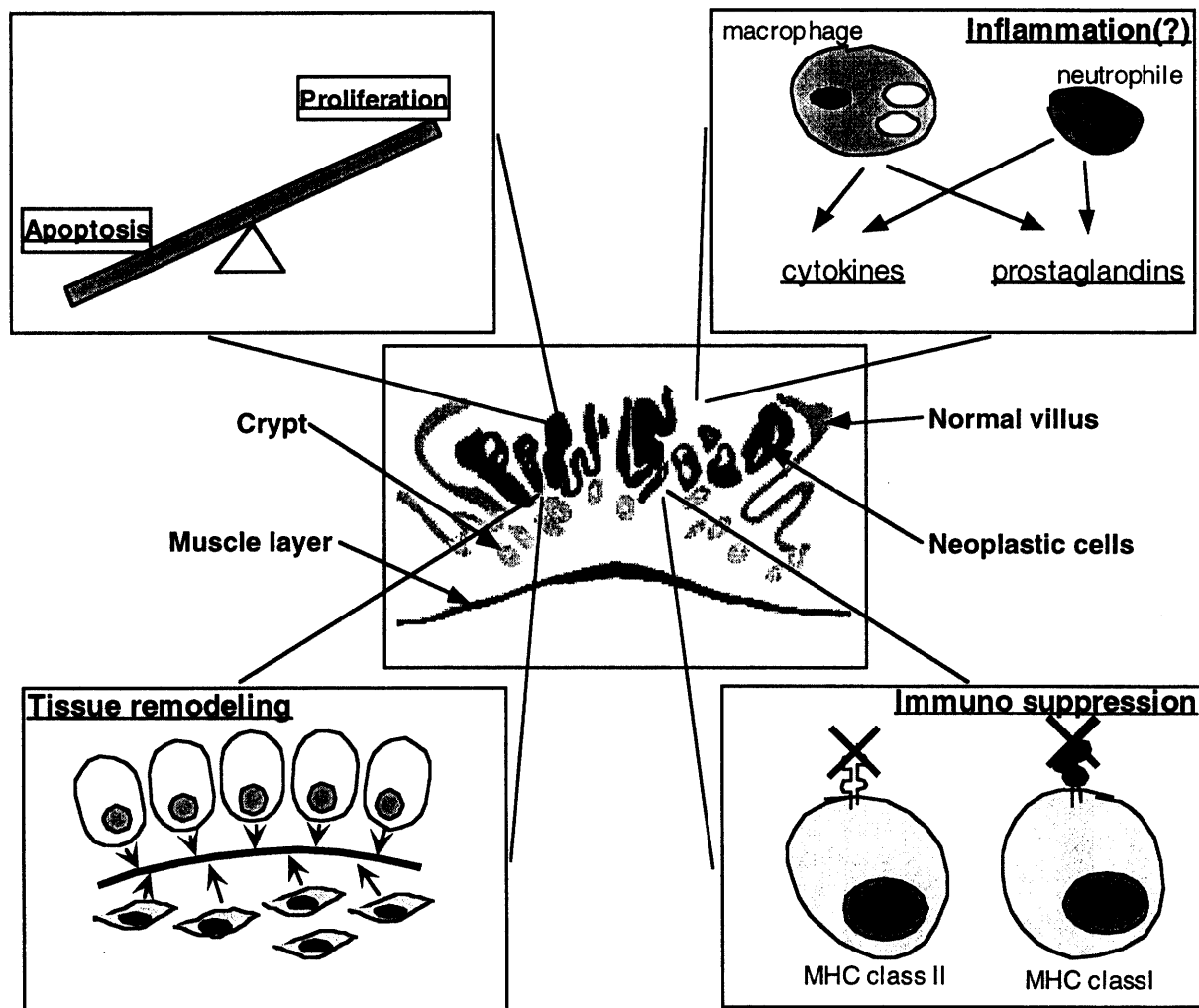
また、ポリプ組織内で腸管上皮細胞の分化マーカーとして知られる fatty acid binding protein 2, intestinal や villin といった多数の遺伝子の発現低下が見られた。これらのことから、より未分化な状態の上皮細胞によりポリプ組織が形成されていると考えられる。このことは、ポリプ組織内では上皮細胞の分化形体である杯細胞やパネート細胞が観察されないという事実とも合致する。

さらに、免疫反応に関与する多数の遺伝子 (beta-2 microglobulin, Ia-associated invariant chain,

immunoglobulin joining chain, etc.) の発現低下がポリプ組織で見られた。この結果から、ポリプ組織を構成する細胞が未分化なため免疫関連遺伝子が発現していない可能性と、実際にポリプ組織内で免疫反応を抑制する機構が働いている可能性の 2 つが考えられる。いずれの場合も、ポリプ組織内での免疫反応は低下しており、その結果、異常な細胞の除去が行われず、ポリプ形成やポリプ増大につながっていると考えられる。

これらの結果から腸癌発生早期病変であるポリプ組織は、細胞増殖、抗アポトーシス、間質の再構成、炎症様反応惹起、免疫反応低下などの性質を既に獲得していることが示唆された (Fig. 1)。さらに、今回の結果とヒト腸癌で報告された遺伝子発現解析結果を比較した。その結果、複数の遺伝子が同傾向の発現変化を示し、本実験で得られた結果がヒト腸癌に応用可能である事が示唆された。

Fig. 1



III *Apc*^{A716} マウス正常腸管組織における遺伝子発現変化と腸癌発生への影響

Apc 遺伝子の片対立遺伝子の変異が腸癌形成に与える影響を調べる事を目的として、*Apc* 遺伝子がヘテロである *Apc*^{A716} マウス腸管正常組織 (回腸) と *Apc* 遺伝子が野生型である C57BL/6J マウ

ス腸管組織（回腸）より RNA を回収し、DNA チップ法により遺伝子発現プロファイルを作成、比較解析を行った。

Table. 3 Genes down-regulated in *Apc* +/- normal villi

GenBank accession no.	Gene description ^(a)	Intensity ^(b)		Fold decrease
		<i>Apc</i> +/+	<i>Apc</i> +/-	
AF006465	RAN binding protein 9	125.8	32.9	3.82
U51196	Microtubule-associated protein, RP/EB family, member 1	1004	478.1	2.09
U00937	Growth arrest and DNA-damage-inducible 45 alpha	200	97.9	2.04

(a) 遺伝子名はUniGene記載を用いた。(b) 値は各遺伝子のAverage intensity

その結果、*Apc* 遺伝子野生型腸管組織と比較して *Apc* 遺伝子ヘテロ型腸管組織で 920 個の遺伝子の発現亢進、並びに 87 個の遺伝子の発現低下が確認された。これら発現変化を示した遺伝子のうち、腸癌発生に影響を及ぼすと考えられる遺伝子として *Ranbp9*, *Eb1* 遺伝子の発現低下が挙げられる。これらの遺伝子産物は、微小管に結合する蛋白質であり、細胞分裂時の染色体の移動に関与することが知られている。*Ranbp9*, *Eb1* 遺伝子の発現低下が見られたことから *Apc* 遺伝子ヘテロ組織では細胞分裂時の染色体分離異常が生じる頻度が高くなっていると考えられる (Table 3.)。

さらに、細胞周期 G2 期のチェックポイントの機能を持ち、染色体分離異常が生じた細胞の除去を行う働きを持つ *Gadd45a* 遺伝子の発現低下も確認された。この *Gadd45a* 遺伝子の発現低下により *Apc* 遺伝子ヘテロ組織では染色体異常を起こした細胞が生存する結果となり、ポリプ形成につながっていると考えられる。

これら 3 個の遺伝子の発現低下により、*Apc* 遺伝子の片対立遺伝子に機能欠失変異が生じた細胞では染色体分離異常を起こす頻度が上昇しており、これが *Apc* 遺伝子の両対立遺伝子変異の獲得につながっていると考えられる。

まとめ

腸癌形成早期に起こる *Apc* 遺伝子の片対立遺伝子に機能欠失型変異により細胞分裂時の染色体分離に関与する遺伝子の発現低下が生じる。これにより、*Apc* 遺伝子ヘテロ細胞では染色体分離異常の頻度が上昇し、もう一方の正常な *Apc* 遺伝子対立遺伝子の変異につながっていると考えられる。その結果、*Apc* 遺伝子の両対立遺伝子に機能欠失型変異が生じポリプ発生が起こる。このポリプ組織ではさらに多くの遺伝子発現変化が生じており、細胞増殖、抗アポトーシス、間質の再構成、炎症様反応惹起、免疫反応抑制などの性質獲得につながっていると考えられる。このような腸癌形成早期過程で重要な機構をターゲットとした創薬を行うことが治療、又は予防に効果を発揮するものと考えられる。また、今回の解析で抽出された複数遺伝子の機能・発癌機構への関与を解明していくことは新たな創薬ターゲットの発見に繋がるものとして重要であると考えられる。