

論文の内容の要旨

論文題目 β -カテニン遺伝子変異の導入によるマウス発癌機構の解析

氏名 原田 直幹

近年大腸癌・肝細胞癌・メラノーマなどのヒトの多くの癌で β -カテニンの変異が報告されている。 β -カテニンはE-カドヘリンと結合する分子として同定され、細胞接着や細胞間相互作用に重要な働きをしていると考えられていたが、最近Wntシグナル系においても中心的な役割を果たし、細胞の増殖・分化にも関わっていることが明らかになっている。Wntシグナル系における β -カテニンの機能については現在次のようなモデルが提唱されている (Fig. 1)。定常状態では β -カテニンのN-末端に存在するセリン・スレオニン残基はGSK-3 β によりリン酸化され、APCやAXIN等と複合体を形成し、ユビキチン化されることによりプロテオソームで分解され、細胞内の β -カテニンの量は一定に保たれている。Wntシグナルが活性化されるとGSK-3 β によるリン酸化が抑制されるため β -カテニンの分解も抑制される。安定化した β -カテニンは核内に移行後、TCF/LEFとともに転写因子として働き、*c-myc*、*cyclin-D1*などの遺伝子発現を活性化することにより細胞の分化・増殖を引き起こす。 β -catenin、*Apc*、*Axin*等が変異した場合も β -カテニンが安定化し、同様のメカニズムで癌化を引き起こすと考えられているが、*in vivo*において β -カテニンの変異が癌化を引き起こすことは未だ直接証明されていない。そこで我々は遺伝子ターゲティングの手法を用いて、ヒトの癌で見つかった変異と同等の β -カテニン変異を組織特異的に導入できるようなコンディショナル・ノックアウトマウスを作製し、腸管および肝臓における β -カテニン変異の発癌過程における意義を解析した。

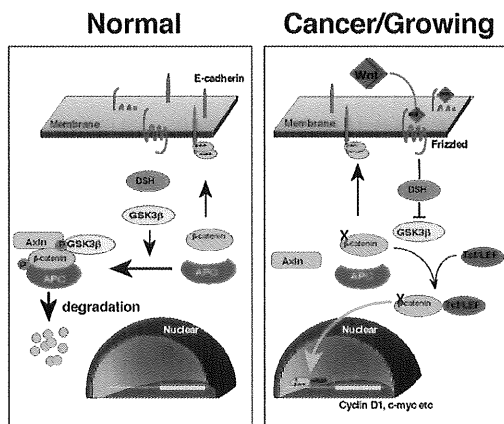


Fig.1 Wnt シグナル系における β -カテニンの役割

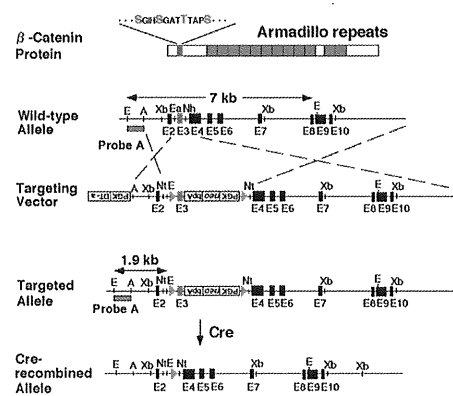


Fig.2 ターゲティングベクターの作製

1. β -catenin^{lox(ex3)}マウスの作製

マウス β -カテニンのGSK-3 β によるリン酸化領域をコードする第3エクソンとPGK-neo-bpAカセットが、2つのloxP配列で挟まれた構造を持つターゲティングベクターを作製した (Fig. 2)。ターゲットされたアレルからは正常な β -カテニンmRNAが発現するが、Cre存在下では2ヶ所のloxP配列間で組み換えが起こり、第3エクソンとPGK-neo-bpAカセットが切り出される。このアレルからは第3エクソンを含まない変異mRNAが発現するが、コーディング・フレームは一致しているのでN末端の76アミノ酸が欠失した変異 β -カテニン蛋白質が発現する。このターゲティングベクターを用いて相同組み換え体ES細胞を樹立した。相同組み換え体ES細胞のマウス胚盤胞へのインジェクションにより、ホモ・ノックアウトマウスは正常に生まれ、腫瘍の発生などの異常は見られなかった。

2. 腸管への β -カテニン変異の導入および解析

腸管でCreを発現させる為に、Ck19-creノックインマウスおよびFabpl-creトランスジェニックマウスを作製し (Fig. 3)、 β -catenin^{lox(ex3)}マウスとの交配により β -catenin^{lox(ex3)}:Ck19^{cre/+} および β -catenin^{lox(ex3)}:Fabpl-cre二重変異マウスを作製した。これらの二重変異マウスをそれぞれ7週齢および4週齢で調べたところ、腸管に多数のポリープが発生していることが確認された (Fig. 4)。PCR法およびウェスタン・ブロット法を用いて β -カテニン変異の有無を調べたところ、ポリープでのみ変異が検出され、周辺の正常部分では変異は検出されなかった。以上の結果から腸管における β -カテニンの変異がポリープ発生の原因と考えられた。

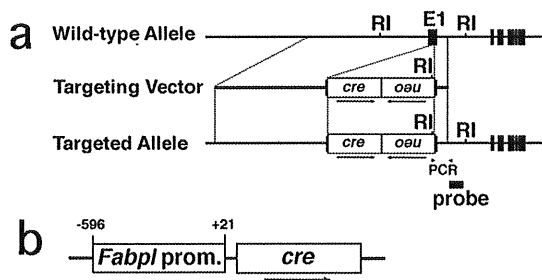


Fig. 3 腸管におけるCre発現マウスの作製

腸管でCreを発現させる為に、Ck(Cytokeratin)19-creノックインマウス(a)およびFabpl(liver fatty acid binding protein)-creトランスジェニックマウス(b)をそれぞれ作製した。

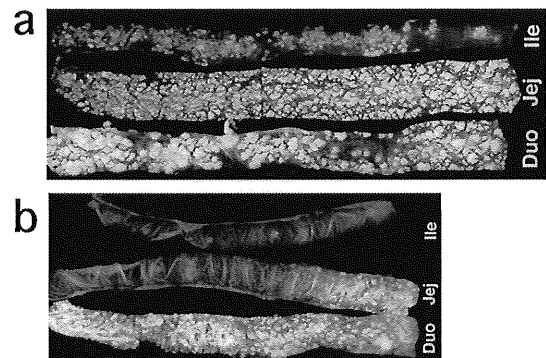


Fig. 4 二重変異マウスに発生した小腸ポリープ

a. β -catenin^{lox(ex3)}:Ck19^{cre}二重変異マウス (7週齢)

b. β -catenin^{lox(ex3)}:Fabpl-cre1二重変異マウス (4週齢)

H&E染色による組織学的な観察から、 β -カテニン変異により発生したポリープは、APC ^{Δ 716}変異マウスに発生するポリープと極めて類似していることが明らかとなった (Fig. 5a)。さらに、免疫染色により腫瘍細胞において β -カテニンの核移行が認められること、間質細胞においてCOX-2の発現が認められることなどから (Fig. 5b, c)、 β -カテニン変異マウスに発生したポリープは、発生原因は異なるが、APC変異マウスのポリープと同等の性質を有すると考えられた。初期のポリープでは正常な絨毛上皮細胞の中に、異常な核をもち、PCNA抗体で免疫染色される細胞が数カ所に見られた。さらに β -カテニンの免疫染色では核の染色は見られないが、正常上皮細胞で見られるような細胞膜の染色も失われていた (Fig. 5d)。これらの結果から、ポリープの発生初期では細胞膜における β -カテニンの局在が失われ、その後ポリープの成長とともに β -カテニンの核への局在が起こることが示唆された。

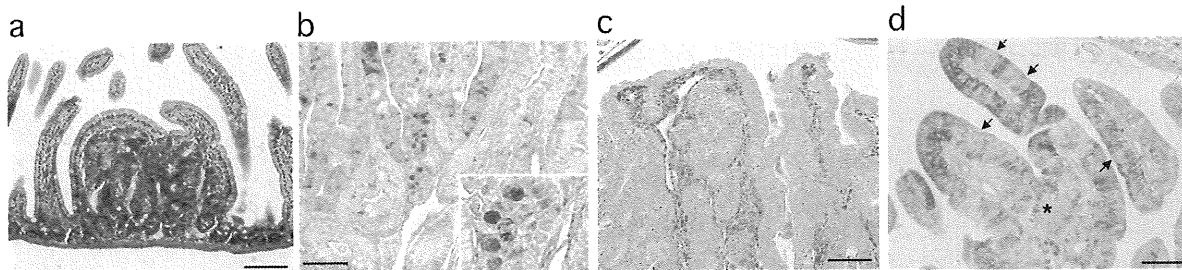


Fig. 5 ポリープの組織学的解析

- a. β -catenin^{lox(ex3)}: Fabpl-cre5 二重変異マウス (4 週齢) のポリープの H&E 染色像。
- b. ポリープの β -カテニン免疫染色。
- c. ポリープの COX-2 の免疫染色。
- d. 初期ポリープの β -カテニン免疫染色。

β -catenin^{lox(ex3)}: Ck19^{cre}/+ 二重変異マウスの大腸で β -カテニン変異が検出されるため、さらに詳細に観察したところ数個のマイクロアデノーマが発生していることが明らかとなった。しかしながら、APC変異マウスと異なり 4 ヶ月以上経過しても大腸ポリープは発生しないことから、大腸においては小腸と異なり、マイクロアデノーマからポリープへの成長には β -カテニン経路以外の何らかのシグナルが関与している可能性が示唆された。

3. 肝臓への β -カテニン変異の導入および解析

β -catenin^{lox(ex3)}: Fabpl-cre 二重変異マウスは生後 3 週から体重が減少し、生後 4-5 週の間死亡する。PCR法およびウェスタン・ブロット法を用いて β -カテニン変異を調べたところ、腸管以外に肝臓でも高頻度の変異が検出され、H&E 染色により肝細胞に顕著な空胞変性が見られた。

時期および肝臓特異的に β -カテニン変異を導入する為、7 週齢の β -catenin^{lox(ex3)} マウスの尾静脈から 10⁹pfu の AdCMV-cre を感染させた。感染後 12 日から 18 日の間に大部分のマウスが死亡し、これらのマウスで 2-3 倍の肝重量の増加が見られた (Fig. 6a-c)。

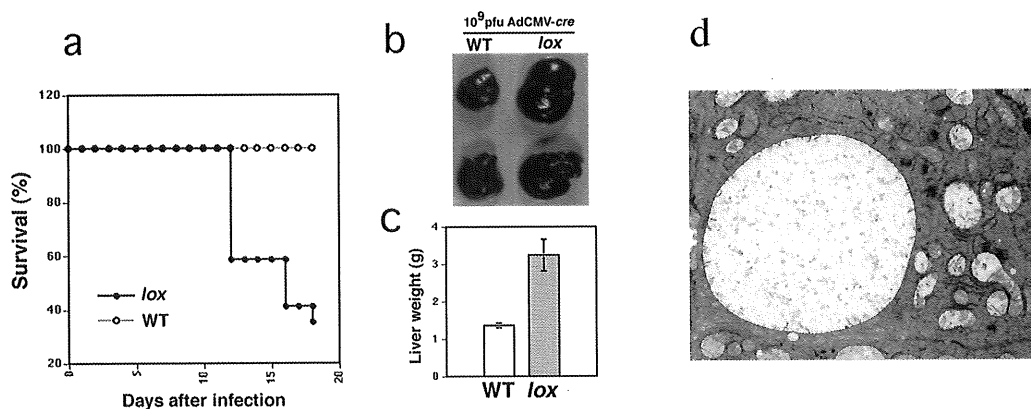


Fig. 6 AdCMV-cre 感染 β -catenin^{lox(ex3)} マウスにおける肝肥大

- a. β -catenin^{lox(ex3)} マウス および C57BL/6N マウスに 10⁹pfu の AdCMV-cre を尾静注し、生存率を調べた。
- b. 感染 18 日後に生き残った野生型 (左) および β -catenin^{lox(ex3)} マウス (右) の肝臓。
- c. 野生型 (左) および β -catenin^{lox(ex3)} マウス (右) の肝重量 (n=4, p<0.001)
- d. 10⁹pfu AdCMV-cre 感染 18 日後の β -catenin^{lox(ex3)} マウスの肝細胞の電子顕微鏡写真。

β -カテニン変異の有無をPCR法およびウェスタン・ブロット法を用いて調べたところ、感染5日後で既に β -カテニンの変異が導入されていることが明らかとなった。

肝臓をH&E染色により組織学的に解析したところ、腫瘍性の病変ではなく肝肥大であることが明らかとなった。さらに興味深いことに、 β -catenin^{lox(ex3)}:Fabpl-cre二重変異マウス同様、肝細胞の空胞変性が観察された。電子顕微鏡による解析の結果、これらの空胞は膨化したミトコンドリアであることが明らかとなった (Fig. 6d)。感染5日後の肝臓では空胞変性は見られないが、 β -カテニンの免疫染色により β -カテニンの核移行が観察されることから、 β -カテニン変異による核へのシグナル伝達の結果、ミトコンドリアの膨化が引き起こされることが示唆された。

肝臓における β -カテニン変異の影響を長期間調べるために、7週齢の β -catenin^{lox(ex3)}マウスに 10^8 pfuのAdCMV-creを尾静脈から感染させたところ、感染3日後および6ヶ月後の肝臓において、PCR法でのみ検出できる程度の低頻度の β -カテニン変異が検出された (Fig. 7)。さらに感染6ヶ月後の肝臓において β -カテニンの核移行を示す肝細胞が認められたが、これらの肝細胞で過増殖や腫瘍性の病変などの異常は認められなかった (Fig. 8)。以上の結果から、肝細胞における β -カテニン変異は肝発癌には不十分で、他の遺伝子変異が必要であることが示唆された。

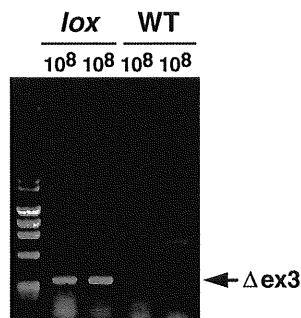


Fig. 7 低頻度の β -カテニン変異導入
 10^8 pfu AdCMV-cre感染6ヶ月後の β -catenin^{lox(ex3)}マウスの肝臓の β -カテニン変異をPCR法で調べた。

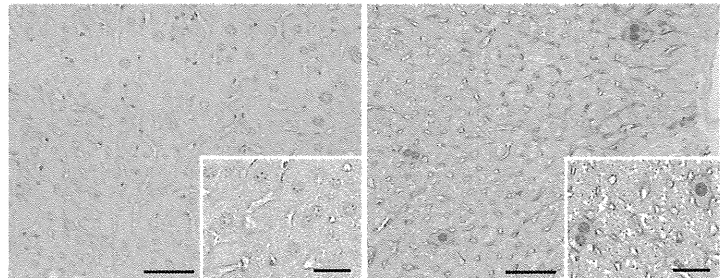


Fig. 8 肝細胞における β -カテニンの核移行
 10^9 pfu AdCMV-cre感染6ヶ月後の野生型(左)および β -catenin^{lox(ex3)}マウス(右)の肝臓の β -カテニンの免疫染色。

【結論】

遺伝子ターゲティングの手法を用いて、コンディショナルに β -カテニンを安定化する変異を導入することが可能な遺伝子改変マウスを作製した。腸管でCreを発現するトランスジェニックマウスとの交配により、腸上皮細胞における β -カテニン変異が良性腫瘍ポリープを発生させることを明らかにした。この結果は、Wntシグナル系が関与する腸管の発癌過程においては、 β -カテニンの安定化による核移行が重要であることを *in vivo*で直接証明したものと考えている。

さらに、アデノウイルスベクターを用いて肝臓特異的に β -カテニン変異を高頻度で導入すると、肝細胞ミトコンドリアの膨化を伴う肝肥大の発症が認められること、さらに低頻度の変異の導入により長期間の影響を調べた結果、 β -カテニン変異のみでは肝発癌には不十分であることが明らかとなった。

β -カテニンの変異は大腸癌・肝癌以外にも多くの癌で見つかっており、本マウスはWntシグナル系が関与する発癌機構の解明に重要なツールとなるばかりでなく、抗癌剤の開発に不可欠な種々の発癌モデルマウスの作製においても有用であると確信している。