

称号及び氏名	博士（獣医学）梅迫 誠一		
学位授与の日付	平成 17 年 3 月 31 日		
論文名	「p53 ヘテロ欠損マウスにおける Atm ヘテロ欠損の乳がん感受性の修飾および発生した乳がんにおけるアレル消失領域の解析」		
論文審査委員	主査 教授	奥本 正昭	
	副査 教授	久保 喜平	
	副査 教授	岡田 利也	

論文要旨

緒 言

がんは我が国において 1981 年以来死亡原因の第 1 位である。乳がんの年齢調整死亡率は 1975 年の人口 10 万対 6.5 人から 2002 年には人口 10 万対 10.8 人に増加し、疾病対策上重要な課題の一つである。そのためには、がんは遺伝子病であるという観点から分子生物学的研究の成果による効果的な診断・治療法の確立が求められている。

正常細胞のがん化のプロセスは、様々ながん抑制遺伝子の機能喪失とがん遺伝子の活性化とが重なり合い、さらに、がん化の過程を修飾する多数のがん関連遺伝子群が加わり、多段階に進行する複雑な過程であると考えられている。

がん抑制遺伝子は、不活化することで細胞をがん化に導く遺伝子群である。がん抑制遺伝子の一つである p53 は乳がんをはじめ多くのがんで高頻度に変異及び欠失している。DNA 損傷の感知などに関わる Atm 遺伝子は、電離放射線によって DNA 鎖が切断された時に p53 を安定化し蓄積する機構に関与する。さら

に、Atm 遺伝子は乳がん感受性に関連するという報告がある。p53 ヘテロ欠損と Atm ヘテロ欠損を併せ持つマウスにおける乳がんの研究報告は今迄になされていない。

動物実験はヒト及び脊椎動物のがん研究の領域に於いて、発がんの原因となる諸因子をコントロール出来ることから有用である。マウスは近交系を組み合わせることで遺伝的背景の異なる種々の雑種第1代 (F1) をつくりだすことができる。さらに、遺伝子改変マウスを用いて、発がん過程における遺伝子間の相互作用を解析することも可能である。正常な対立遺伝子座が消失しがん抑制遺伝子の機能が失われる変化がヘテロ接合性の消失 (loss of heterozygosity: LOH) として検出されることから、今までにいくつかのがん抑制遺伝子が同定されてきた。しかし、まだ明らかにされていないがん抑制遺伝子は少なくないと考えられる。

本研究では、Atm 遺伝子と p53 遺伝子をヘテロ欠損した近交系マウスを交配して得られた F1 マウスを用いて、先ず両遺伝子のヘテロ欠損が、X 線照射による乳がんの発症にどのように影響するかを調べた。次に、LOH 解析によって乳がんの発症の原因と推定される染色体上の領域をゲノムワイドに探索し、この LOH 領域を解析する事により、Atm と p53 の両遺伝子と協調してがん化に寄与するがん抑制遺伝子の究明を行った。

第1章 Atm 遺伝子と p53 遺伝子のヘテロ欠損マウスにおける乳がんの発生

第一節 乳がんの発生と p53 遺伝子の関与

BALB/cHeA-p53 KO/+マウスと MSM/Ms-Atm KO/+マウスを交配して得られた F1 マウスの雌 216 頭を用い、生後 5 週齢の時点で 5Gy の X 線を全身照射した。

乳腺の腫瘍は病理組織検査によってすべて乳腺の腺がん (adenocarcinoma of mammary gland) と診断された。これらの乳がんは放射線照射後、20 週から 38 週 (生後 161 日目から 299 日目) の期間に発生し、特に照射後 23 週から 28 週の時期に集中した。各遺伝子型の乳がん発生率は、p53 ko/+ Atmko/+マウスでは 55 頭中 32 頭 (58%)、p53 ko/+Atm+/+ マウスでは 61 頭中 19 頭 (31%) であった。しかし、p53 +/+Atm+/+ マウスでは 1 例のみ(2%)、p53 +/+Atmko/+ マウスでは発生が見られず、遺伝子型で顕著な差異が認められた。さらに、p53 ko/+ マウスに発生した乳がん 41 例中 40 例 (98%) において、p53 の野生型アリルが消失しており、p53 の機能喪失が乳がん発生に貢献していることを明らかにした。

第二節 p53 遺伝子欠損条件下での乳がん発生に対する Atm 遺伝子ヘテロ欠損の効果

Atm のヘテロ欠損が発がん感受性を高めるかどうかについては、発がん感受性に違いが認められないとの報告がある一方、がん感受性を高めるとの報告もなされている。本研究において p53 ko/+Atm ko/+マウスでは p53 ko/+Atm+/+ マウスに比べて明らかに乳がんの発生が多かったことから、p53 がヘテロ欠損した条件下で Atm のヘテロ欠損が乳がん発生を増加させることを明らかにした。

第三節 放射線誘発乳がんのモデル実験系としての評価

p53 ヘテロ欠損マウスは放射線照射によって乳がんを多発することが BALB/c の系において報告されている。p53 ヘテロ欠損 BALB/c マウスに 0.7Gy を 1 週間隔で 4 回放射線照射を行ったところ、胸腺リンパ腫よりも乳がんが多発した。さらに、アリル解析に有力な BALB/c マウスと MSM/Ms マウスとの垂種間交配 F1 マウスの遺伝的背景においても、p53 がヘテロ欠損している場合、

放射線照射により乳がんの発生時期が著しく早まることを観察した。このように乳がんが短い潜伏期間で多発することから、この系は放射線誘発乳がんのモデル実験系として有用であることを明らかにした。

第2章 p53 ヘテロ欠損と協調するアレル消失領域の解析

第一節 ゲノムワイドスクリーニング

正常細胞 DNA で認められているヘテロ接合性のがん細胞 DNA で消失していること(LOH)を手がかりとして、腫瘍で共通して欠損している染色体領域を見つけ出すことによりがん抑制遺伝子の座位(locus)を推定することが可能とされている。

乳がん組織の DNA23 検体について、1 番染色体から 19 番染色体まで、各染色体あたり 2~3 ローカスを選び、計 40 のマイクロサテライト・マーカーを用いて LOH 検索を行った。5 番染色体 (D5Mit81) では 30%、8 番染色体(D8Mit270)では 52%、11 番染色体(D11Mit12)では 57%、12 番染色体(D12Mit4)では 65%、14 番染色体(D14Mit7)では 35%の高頻度の LOH が認められ、これらの領域において乳がんに関与するがん抑制遺伝子の存在が推察された。

第二節 8 番染色体の LOH 解析

頻度の高い LOH が認められた染色体のうち、8 番染色体は他のマウス系統、(BALB/HeA-p53 KO/+ x 129/SvEv-Atm KO/+) F1 マウスの実験においても、同様に高い頻度の LOH が認められている。そこで、8 番染色体について 39 例の乳がん組織 DNA を用い、9 個のマイクロサテライト・ローカスにおける LOH を調べた。それぞれ、D8Mit4(14cM)38%、D8Mit6(30cM)33%、D8Mit11(46cM)41%、

D8Mit85(47cM)67%、D8Mit212(51cM)72%、D8Mit113(52cM)69%、
D8Mit12(53.3cM)62%、D8Mit319(58cM)54%、D8Mit120(61cM)36%であった。こ
のようにD8Mit85(47cM)からD8Mit319(58cM)の間において特に頻度の高いLOH
領域を発見した。

ヒトの乳がん症例において染色体8p、11q、16q、17pの領域はLOHが高頻度
に認められ、がん抑制遺伝子の存在が強く示唆されているが、このマウス8番
染色体の領域は上記のヒトのLOH領域16q22-23に相当する。マウスでは53.3
cMにCdh1,Cdh3が、51cMにCdh5が、50cMにCdh16が、46.5cMにCdh8、Cdh11
が位置している。特に、D8Mit212(51cM)が72%と最高のLOH頻度であった。
D8Mit212はCdh5遺伝子内に位置することから、Cdh5ががん抑制遺伝子として
乳がんの発生に関与したことが推察された。

第3章 Cdh5の発現解析

第一節 RT-PCRによるカドヘリンファミリー遺伝子群の発現解析

RT-PCRによって乳がん組織における8番染色体の高頻度LOH領域に存在する
カドヘリンファミリー遺伝子群のmRNA発現解析を行った。乳がん組織45検体
についてCdh5のmRNAの発現を調べたところ、31%の症例において発現の低下
が認められた。さらに、Cdh1,Cdh3,Cdh8,Cdh11,Cdh16のmRNAの発現について
も調べたところ、がん抑制遺伝子として報告されているCdh1は58%に、Cdh3、
Cdh8においては、それぞれ15%、27%に発現低下が認められた。

第二節 遺伝子変異によるCdh5の発現低下の機構解析

Cdh5遺伝子は11のexonより構成されていることから、各1から11までの

個々の exon をそれぞれカバーする primer を作成し、Cdh5 遺伝子の発現低下の認められた腫瘍 8 例の DNA について PCR を実施し、各 exon の欠損を解析した。その結果、4 例において Cdh5 遺伝子の exon8、exon10 などが増幅されず、exon8 などの異常が発現低下の機構の一つであると推察された。

総括

1. 乳がん発生に p53 の機能喪失が貢献していることを観察した。
2. p53 ko/+Atmko/+マウスでは、p53 ko/+Atm+/+に比べて明らかに乳がんを多発しており、p53 ヘテロ欠損下では Atm ヘテロ欠損が乳がん発生を増加させることを明らかにした。
3. アリル解析に有力な BALB/c マウスと MSM/Ms マウスとの亜種間交配 F1 マウスの遺伝的背景においても、p53 がヘテロ欠損している場合には放射線誘発乳がんのモデル実験系として有用であることを明らかにした。
4. 5 番染色体 (D5Mit81) では 30%、8 番染色体(D8Mit270) では 52%、11 番染色体(D11Mit12)では 57%、12 番染色体(D12Mit4)では 65%、14 番染色体(D14Mit7)では 35%の高頻度の LOH が認められ、これらの領域において乳がんに関与するがん抑制遺伝子の存在が推察された。
5. D8Mit85(47cM)から D8Mit319(58cM)の間において頻度の高い LOH 領域を発見した。特に、D8Mit212(51cM)が 72%と最高の LOH 頻度であった。D8Mit212 は Cdh5 遺伝子内に位置することから、Cdh5 ががん抑制遺伝子として乳がんの発生に関与したことが推察された。
6. LOH 検索の結果からがん抑制遺伝子である可能性が示唆された Cdh5 では 31%の症例において発現の低下が認められ、両者の成績が一致した。また、がん抑制遺伝子として報告されている Cdh1 は 58%に、Cdh3、Cdh8 においては、そ

れぞれ 15%、27%に発現低下が認められた。

7. Cdh5 遺伝子の発現低下の認められた腫瘍 8 例中 4 例において Cdh5 遺伝子の exon8 などが増幅されず、exon8 などの異常が発現低下の機構の一つであると推察された。

審査結果の要旨

我が国において、がんは 1981 年から死因の第一位を占め、中でも乳がんは罹患率が急増し、2000 年には女性のがんの中では胃がんを抜いて第一位になっている。近年の分子生物学的解析法の進歩はがんに関わる多数の遺伝子の単離・同定を可能とした。正常細胞のがん化のプロセスは、様々ながん抑制遺伝子の機能喪失とがん遺伝子の活性化とが重なり合い、さらにこの過程を修飾する多数のがん関連遺伝子群が加わり、多段階に進行する複雑な過程であると考えられている。特に p53 遺伝子は乳がんをはじめ多くのがんで最も高頻度の変異が見られる。また、ATM 遺伝子は乳がん感受性に関与することが報告されている。そこで、まず両遺伝子の乳がんの発生に対する寄与について調べるために、p53 遺伝子ヘテロ欠損 BALB/cHeA マウス(BALB/c-p53 ko/+マウス)と Atm 遺伝子ヘテロ欠損 MSM/Ms マウス(MSM- Atm ko/+マウス)との F1 マウスを作成し、遺伝子型と乳がん発生の関係を解析した。次に p53 あるいは Atm の異常と協調してがん化に関与するがん抑制遺伝子を探索するため、発生した乳がんを用いてヘテロ接合性の消失 (LOH) の検索を行い、高頻度 LOH 領域に存在する遺伝子の発現解析を行った。得られた成果は以下の通りである。

第一章では上記の F1 マウスを用いて、まず両遺伝子のヘテロ欠損が、放射線照射による乳がんの発症にどのように関与するかを調べた。その結果、この系統における乳がん発生に p53 の機能喪失が貢献していることを観察した。さらに、p53 ko/+Atmko/+マウスでは、p53 ko/+Atm+/+に比べて明らかに乳がんを多発しており、p53 ヘテロ欠損下では Atm ヘテロ欠損が乳がん発生を増加させることを明らかにした。アレル解析に有力な BALB/c と MSM/Ms マウスとの垂種間交配 F1 マウスの遺伝的背景において、p53 がヘテロ欠損している場合には放射線誘発乳がんのモデル実験系として有用であることがわかった。

第二章では、発生した乳がん組織 DNA 中の LOH をゲノムワイドに検索し、乳がん発症の原因と推定される染色体領域を探索した。5 番染色体(D5Mit81)では 30%、8 番染色体(D8Mit270)では 52%、11 番染色体(D11Mit12)では 57%、12 番染色体(D12Mit4)では 65%、14 番染色体(D14Mit7)では 35%の高頻度の LOH が認められ、これらの領域において乳がんに関与するがん抑制遺伝子の存在が推察された。D8Mit85 (47cM)から D8Mit319(58cM)の間において頻度の高い LOH 領域を発見した。特に、Cdh5 遺伝子内に位置する D8Mit212(51cM)が 72%と最高の LOH 頻度であったことから、Cdh5 ががん抑制遺伝子として乳がんの発生に関与することが推察された。

第三章では、マウス 8 番染色体において、Atm と p53 の両遺伝子と協調してがん化に寄与する候補がん抑制遺伝子の究明を行った。LOH 検索の結果から、がん抑制遺伝子である可能性が示唆された Cdh5 では 46%の症例において発現の低下が認められた。また、がん抑制遺伝子として報告されている Cdh1 は 58%の症例に、Cdh3、Cdh8 は、それぞれ 15%、27%の症例において発現低下が認められた。Cdh5 の MSM/Ms 由来アレルが消失した腫瘍サンプルでは exon8、exon10 などが増幅されず、exon8 などの異常が発現低下の機構の一つである

と推察された。

審査委員会の所見

以上、本研究はアレル解析に有力な上記の亜種間交配 F1 マウスにおいても乳がん発生に p53 の機能喪失が貢献していること、および p53 ヘテロ欠損下では Atm ヘテロ欠損が乳がん発生を増加させることを明らかにした。さらに D8Mit212 において最高の LOH 頻度が観察され、Cdh5 ががん抑制遺伝子として乳がん発生に関与することが推察された。これらの成果は、獣医学、実験動物学の発展に寄与するものであり、最終試験の結果とあわせて博士（獣医学）の学位を授与することを適当と認める。