
原 著

Rit1/Bcl11b がん抑制遺伝子とリンパ腫発症

小 杉 日登美

新潟大学大学院医学研究科生理系専攻

(主任：木南 凌教授)

The *Rit1/Bcl11b* Tumor Suppressor Gene and Lymphomagenesis

Hitomi KOSUGI

Department of Physiology,

Graduate School of Medicine, Niigata University

(Director: Prof. Ryo KOMINAMI)

要 旨

マウス胸腺リンパ腫発症に関与する *Rit1/Bcl11b* がん抑制遺伝子はポジショナルクローニング法により単離され、146例のリンパ腫から11例にホモ欠失を、2例にマイクロ欠損を、4例に塩基置換が検出されている。この *Rit1* 遺伝子のがん抑制遺伝子として働くことを確定するために、*Rit1* のヌル型ノックアウトマウスを作製し、解析した。*Rit1* (KO/+) マウスに放射線を照射すると、*Rit1* (+/+) マウスに照射した場合と比べて、明らかに高い頻度で胸腺リンパ腫が発症した。この結果は、*Rit1* 遺伝子が予想通り、がん抑制遺伝子であることを示している。しかし、もう一方の野生型 *Rit1* アレルの脱落・変異を検討すると、LOHによるアレルの消失は観察できず、今回用いたマウスとバックグラウンドが異なるが、*Rit1* については野生型のマウスのリンパ腫に高頻度に検出された内部欠失も検出できなかった。すなわち、DNAレベルでの変異を検出することができなかった。従って、*Rit1* 遺伝子が Knudson の2ヒット説にかなったがん抑制遺伝子として働くことを証明するには至らなかった。野生型 *Rit1* アレルの機能消失にはメチル化などのエピジェネティックな不活性化機構が考えられるが、この点に関しては今後の検討が必要である。

キーワード： *Rit1/Bcl11b*, がん抑制遺伝子, 胸腺リンパ腫, 放射線の間接作用

Reprint requests to: Hitomi KOSUGI
Department of Molecular Genetics
Niigata University Graduate School of
Medical and Dental Sciences
1-757 Asahimachi-dori,
Niigata 951-8510 Japan

別刷請求先： 〒951-8510 新潟市旭町通り1-757
新潟大学大学院医歯学総合研究科遺伝子制御講座
小杉日登美

緒 言

対象と方法

ヒトを対象としたがん関連遺伝子の探索は多くの貢献をもたらしてきたが、現在解析対象家系が限界に近づきつつある。そこで、今後は動物モデルの利用系が重要と考えられる。放射線で誘発されるマウス胸腺リンパ腫は、古典的な放射線発がん研究モデルである。遺伝子研究、細胞間相互作用の研究、リンパ腫発症頻度に影響を及ぼす生物学的研究から、放射線は骨髄に存在するリンパ球前駆体細胞と、その細胞の増殖・細胞死を調節する胸腺の双方に作用し、発がんをもたらすことが明らかとなっている。すなわち、がん細胞と宿主組織、両方の要因が発がんに関与することが明らか系であり、複雑なヒト発がんのよい実験モデルと考えられる^{1)–4)}。しかし、このモデルの遺伝的な解析はゲノム時代の今日大幅に遅れており、ヒトですでに発見されたがん遺伝子やがん抑制遺伝子を対象にそれらの活性化、不活性化を追実験したものがその大半である。その結果、*ras* 遺伝子、*p16/p19* 遺伝子、*p53* 遺伝子、*Notch1* 遺伝子の発がんへの関与などがすでに報告されているが、この放射線発がんモデルが提示する本質的な問題を明らかにするにはほど遠い⁵⁾⁶⁾。

木南らのグループは7–8年前からこのモデルの体系的な遺伝解析を行ってきた。すなわち、マウス胸腺リンパ腫 DNA の LOH 解析からポジショナルクローニングを行い、*Ikaros* 遺伝子の同定⁷⁾と新規遺伝子 *Rit1/Bcl11b* の単離・同定を行った⁸⁾。146 例のリンパ腫について *Rit1/Bcl11b* 遺伝子の変異の検索を行うと、11 例にホモ欠失を、2 例にマイクロ欠損を、4 例に塩基置換を検出することができた⁸⁾。従って、本遺伝子はがん抑制遺伝子として働くと考えられるが、そのことを確定するには、ノックアウトマウスを作製し解析する必要がある。そこで、*Rit1* のヌル型ノックアウトマウスを作製した⁹⁾。*Rit1/Bcl11b* (KO/–) ホモ個体は正常に誕生するが、生後 1 日程度で死亡する。本論文では、*Rit1/Bcl11b* ノックアウトマウスに放射線を照射し、リンパ腫発症頻度への遺伝子型の影響を検討した。

1. 胸腺リンパ腫の誘発

Rit1/Bcl11b-KO マウスと BALB/c マウスを交配して F1 マウスを作製した。生後 4 週齢の F1 マウスに γ 線 2.5Gy を週一回、4 回の分割照射を行い、合計 10Gy の放射線を照射した⁷⁾。以後 300 日間観察し、努力呼吸の症状をもってリンパ腫の有無を診断した。リンパ腫発症と診断したマウスは、解剖により各臓器とリンパ腫を摘出し、その一部を切り取ってゲノム DNA を抽出した。このゲノム DNA を用いて以下の実験を行った。

2. 遺伝子型の決定

PCR (Polymerase chain reaction) 法により遺伝子型を決定した。PCR は $1\mu\text{l}$ (50ng/ μl)、2 X GC Buffer (TAKARA) $5\mu\text{l}$ 、各プライマー $0.2\mu\text{l}$ ($10\mu\text{M}$)、2.5mM dNTP mix $1.6\mu\text{l}$ 、TAKARA LA Taq 0.5U を含む $10\mu\text{l}$ の系で、Gene Amp 9700 PCR system (Applied Biosystems) で行った。プライマーの配列は、FW-Neo: CCTGCTTGCCGAATATCATGGTGG, F-W106: TTAAGCTTTC-CGGGCGATGCCA, R1-Rit1: ACTTTCACAGAAC-CCCACGC である。PCR の条件は、 94°C 1 分、 94°C 30 秒– 55°C 1 分– 72°C 30 秒を 45 回、 72°C 5 分とした。PCR 産物は 2% アガロースゲル電気泳動で分離後、エチジウムブロマイド染色により検出した。

3. 統計学的検定

統計学的有意差検定は χ^2 検定、生存曲線は Kaplan-Meier 法を用い、その生存率解析には Logrank 検定を用いた。

4. LOH 解析

PCR (Polymerase chain reaction) 法により LOH (loss of heterozygosity) を決定した。PCR はゲノム DNA $1\mu\text{l}$ (50ng/ μl)、10 X PCR Buffer (Applied Biosystems) $1\mu\text{l}$ 、各プライマー $0.2\mu\text{l}$ ($10\mu\text{M}$)、25mM MgCl_2 $0.6\mu\text{l}$ 、2mM dNTP mix $0.8\mu\text{l}$ 、AmpliTaq Gold o.25U を含む $10\mu\text{l}$ の系で、Gene Amp 9700 PCR system で行った。PCR の条件は、 95°C 10 分、 95°C 30 秒– 55°C 30 秒– 72°C 30 秒を 35 回、 72°C 10 分とした。PCR 産物は

8% PAGE (Polyacrylamide gel electrophoresis) により分離後, エチジウムブロマイド染色により検出した。

5. 内部欠失解析

坂田らの方法¹⁰⁾に順じて行った。第一段階のスクリーニングとしてPCR法を用いた。Rit1遺伝子のイントロン1とイントロン3に任意に設定したプライマーを用いてPCRを行い, 増幅産物を認めるリンパ腫を検索した。すなわち, 内部欠失が存在しなければ, 増幅領域が大きすぎて, PCRによる増幅は認められないからである。次にダイレクトシーケンス法で, 塩基配列を決定し, 欠失部分を特定した。PCRは1 μ l (50ng/ μ l), 2X GC Buffer (TAKARA) 5 μ l, 各プライマー0.2 μ l (10 μ M), 2.5mM dNTP mix 1.6 μ l, TAKARA LA Taq 0.5Uを含む10 μ lの系で, Gene Amp 9700 PCR systemで行った。PCRの条件は, 94 $^{\circ}$ C 1分, 94 $^{\circ}$ C 30秒-58 $^{\circ}$ C 30秒-72 $^{\circ}$ C 1分 \times 40, 72度5分。PCR産物は2%アガロースゲル電気泳動により分離後, エチジウムブロマイド染色により検出した。残りのPCR産物をダイレクトシーケンス法に用いたが, 今回対象としたリンパ腫にはPCR法による増幅産物は認められなかった。

結 果

1. Rit1/Bcl11b ノックアウトマウスの解析

Rit1-KOマウスは胸腺T細胞の分化停止とアポトーシスを示したが, 発がん過程で確かにがん抑制遺伝子として働くかどうかの検討はされていない。そこで, Rit1/Bcl11b (KO/+)ヘテロマウスを用いて, 放射線を用いて発がん実験を行った。

放射線により誘発された腫瘍の内訳を表1A, 1Bにまとめた。照射したマウス35例のうち, リンパ腫は15例, その他の腫瘍が5例, 腫瘍を発症しなかったものが15例となった。

がん発症群, およびリンパ腫発症群と非発症群に分け統計学的検定を行った(図1A, B)。Rit1 (KO/+)マウスはRit1 (+/+)マウスに比べ, 発症頻度の上昇および潜伏期間の短小を示した。この結果から, Rit1遺伝子は発がん過程でがん抑

表1 解析対象とした腫瘍の内訳(A)と胸腺リンパ腫の遺伝子型(B)

A

thymic lymphomas	非発症	15
	発症	15
other tumors	systemic leukemia	1
	lung cancer	4
total		35

B

	発症	非発症
Rit1-wt	9	2
Rit1-(KO/+)	6	13
	15	15

(B): 胸腺リンパ腫のRit1遺伝子型について2 \times 2表で χ^2 乗検定を行った結果, P = 0.098, χ^2 = 2.72となった。

制遺伝子として働くことが示された。

2. Rit1 遺伝子座の LOH 解析

発症したリンパ腫15例について, LOH解析を行い, その結果の一部を示した(図2)。KOアレルはB6マウスに由来するため, 正常組織では, 野生型マウスはBALB/cパターンになり, KOアレルをもつマウスは+/-パターンとなる。すなわちLOHを示すと, 野生型マウスはBALB/cパターンのままでバンドの濃度が小さくなり, KOマウスの場合, BALB/c, 又はB6パターンとなる。今回用いたマウスとバックグラウンドが異なるが, Rit1については野生型のマウスに生じたリンパ腫では約70%という高い頻度のRit1遺伝子座のLOHを示していた。しかし, 今回ヘテロマウスに生じたリンパ腫では全くLOHは検出されなかった。このことはRit1遺伝子の不活性化にLOH以外の機構が関与することを示唆する。

3. Rit1 遺伝子内部欠失の解析

V(D)J組み換え活性の誤認識により, Rit1遺伝子のホモ欠失が高頻度に生じることを報告した¹⁰⁾。そのホモ欠失の多くはRit1遺伝子のエクソン2および3の20kb-50kb領域に局限される内部欠損(internal deletions)とLOHにより生

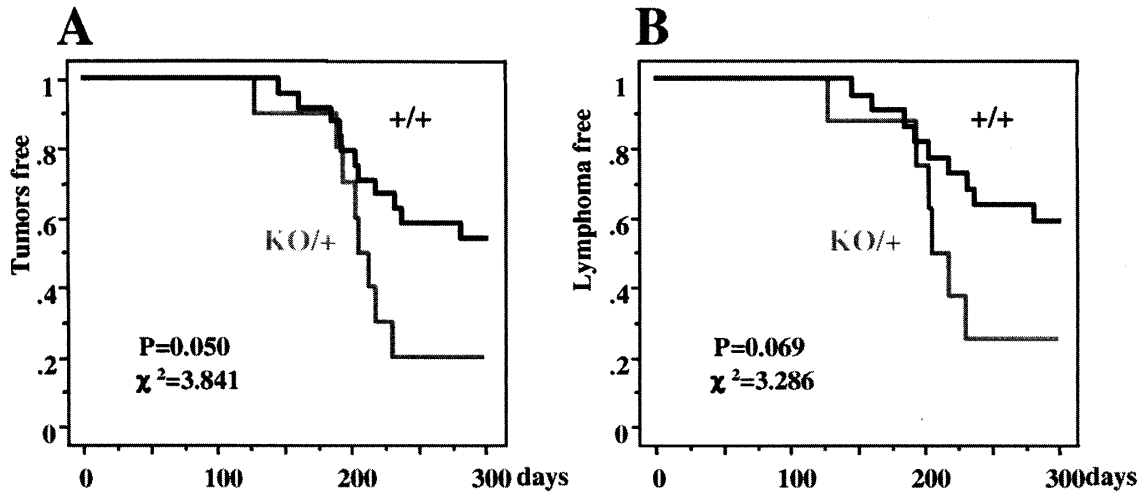


図1 腫瘍を発症した全マウスの生存曲線 (A) とリンパ腫を発症したマウスの生存曲線 (B)

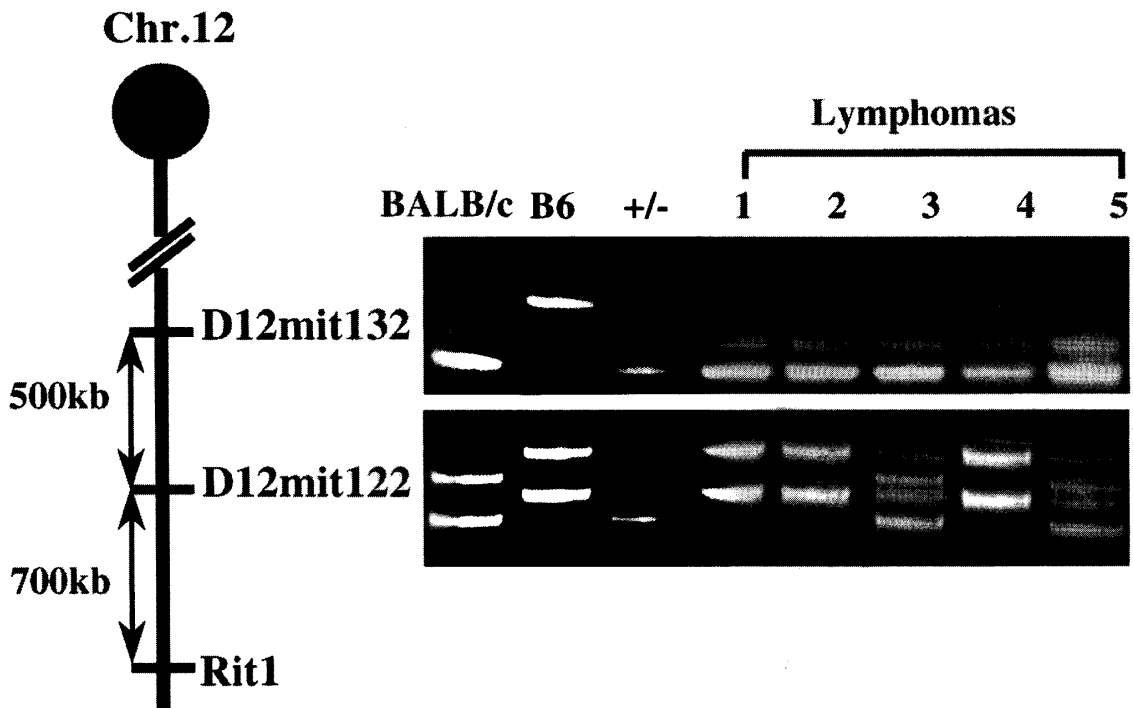


図2 LOH 解析

KO アレルは B6 マウスに由来するため、正常組織では、野生型マウスは BALB/c パターンになり、KO アレルをもつ *Rit1* (+/-) マウスは B6 と BALB/c の F1 パターンとなる。すなわち、*Rit1* (+/-) マウスの場合、LOH を示すと、BALB/c または B6 パターンとなる。

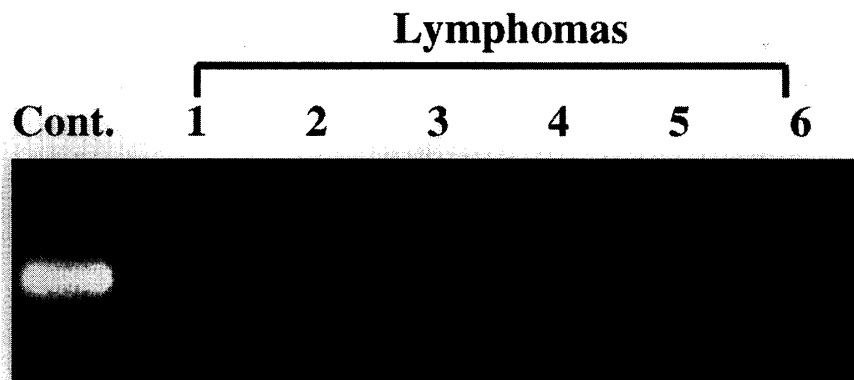


図 3 内部欠損解析

Rit1 遺伝子のイントロン 1 とイントロン 3 に設定したプライマーを用いて PCR を行い、増幅産物が認められるリンパ腫を検索した。これらのプライマー部位は正常ゲノムでは約 30kb 離れ、内部欠損がないと増幅されない。一方、内部欠損が存在すると、コントロールとして用いたリンパ腫 DNA と同じサイズ (約 500 塩基長) のバンドが検出される。

じる。また、その内部欠失にはホットスポットが 1 カ所存在する。LOH の結果と同様に、*Rit1* については野生型マウスのリンパ腫ではその約 20% に内部欠失が観察されたが、今回発症した *Rit1* (+/-) マウスのリンパ腫では全く観察されなかった (図 3)。

考 察

Rit1/Bcl11b ノックアウトマウスを作製し⁹⁾、このマウスを使って発がん実験を行った。*Rit1* (KO/+) マウスに放射線を照射すると、*Rit1* (+/-) マウスに照射した場合と比べて、明らかに高い頻度で胸腺リンパ腫を発症することが示された。言い換えると、片方の *Rit1* アレルが機能しないと、そのマウスは発がん感受性を示すと言える。この結果は、*Rit1* 遺伝子が予想通り、がん抑制遺伝子であることを示している。しかし、もう一方の野生型 *Rit1* アレルの脱落・変異を検討すると、LOH によるアレルの消失は観察できず、*Rit1* については野生型のマウスのリンパ腫で高頻度に検出された内部欠失も検出できなかった。すなわち、DNA レベルでの変異を検出することができな

かった。従って、*Rit1* 遺伝子が Knudson の 2 ヒット説にかなったがん抑制遺伝子として働くことを証明するにはまだ至っていない。野生型 *Rit1* アレルの機能消失にはメチル化などのエピジェネティックな不活性化機構が考えられるが、この点に関しては、今後の検討が必要である。

1. *Rit1/Bcl11b* 遺伝子と抗アポトーシス作用

Rit1 (KO/+) マウスのリンパ腫に LOH や内部欠失が観察できなかった理由は不明だが、それは *Rit1* 蛋白のもう一つの性質、抗アポトーシス作用との関連性が考えられる。*Rit1* ノックアウトマウスの解析から、*Rit1* 蛋白のもつ以下の性質が明らかになっている。*Rit1* (KO/-) マウスは正常に誕生するが、生後一日程度で死亡する。胸腺では皮質と髄質の境界が完全に消失し、比較的大きなリンパ球が胸腺全体に一樣に分布する外見を示す。胸腺内リンパ球の FACS 解析を行うと、 $\alpha\beta$ -T 細胞の分化の停止が観察されるが、B 細胞や $\gamma\delta$ -T 細胞の分化・細胞死には影響は見られない⁹⁾。胸腺細胞を Tunnel 染色すると、*Rit1* (KO/+) マウスよりも *Rit1* (KO/-) マウスではるかに多くの Tunnel 陽性細胞が認められる。これらの結果から、*Rit1* は T 細胞の増殖、分化とアポトーシスに

関連する遺伝子であると示唆されている。従って、放射線照射時に *Rit1* (KO/+) マウスに LOH や VDJ 組み換えによる *Rit1* 内部欠失が起こると、*Rit1*-null 胸腺細胞が出現するが、これらの細胞はがん化する前にアポトーシスに陥る可能性がある。*Rit1* 野生型および *Rit1* (KO/+) マウスに見られる胸腺リンパ腫の発がん過程で、*Rit1* 遺伝子の不活性化がいつ発生し、どのようにがん化に貢献するのかが今後の課題である¹¹⁾。

2. 放射線誘発胸腺リンパ腫発症と間接効果

Rit1/Bcl11b ノックアウトマウスの放射線照射による発がん実験から、*Rit1* 遺伝子の機能欠失がリンパ腫発症に貢献することが示されたが、照射が *Rit1* 遺伝子の変異、不活性化に直接作用したという結果は得られなかった。従って、放射線照射の作用点については不明である。文献上では、放射線が DNA に直接作用し、変異をもたらすという直接説と以下に示す間接説とが提案されている¹⁾⁻⁴⁾¹²⁾。

Kaplan らは系統的に放射線誘発胸腺リンパ腫の細胞生物学研究を行い、放射線の発がんへの間接効果を主張した¹³⁾¹⁴⁾。すなわち、発がんをもたらす放射線量には閾値があり、しかも得られたリンパ腫の組織像は、自然に起こるリンパ腫とほとんど区別がつかない。これらのことから、放射線はリンパ腫前駆細胞に変異を導入するのではなく、自然に起こる（他の原因で起こる）リンパ腫の発症頻度を促進する、と間接効果説を提案した。

Kaplan らの実験とその後の研究者による主な研究結果は以下のようなものである¹⁾⁻⁴⁾¹⁵⁾⁻¹⁷⁾。4 回分割 γ 線照射の過程で、照射したマウスから胸腺を取り除くと、胸腺リンパ腫 (T 細胞性リンパ腫を含む) は発症しない。興味深いことには、このとき、非照射のマウスから胸腺を取り出し、この照射したマウスの腎臓の皮膜下に移植すると、移植された胸腺からリンパ腫が比較的高頻度に発症する。これが放射線発がん間接説の主要な根拠となっている。一方、骨髄に注目した研究も進められている。放射線照射時に骨髄を放射線から遮断すると、リンパ腫発症は極端に抑えられる。さらに、放射線照射直後のマウスに、非照射のマ

ウスから骨髄細胞を取り出し、この細胞を移植するとやはりリンパ腫発症が抑制される。すなわち、リンパ腫発症には骨髄の照射が必要であり、非照射の、障害を受けていない骨髄細胞が存在すると発症が抑えられる。骨髄細胞がリンパ腫発症の鍵となる働きをすることが示されているが、骨髄細胞の中のどの種の細胞がその抵抗性を担うかについては、その後様々な研究室で検討が行われているが結論には至っていない。

まとめると、放射線誘発マウス胸腺リンパ腫発症には *Rit1* 遺伝子が深く関わるのが、*Rit1/Bcl11b* ノックアウトマウスを用いた発がん実験から明らかとなった。しかし、その不活性化への放射線の関与機構は全く不明であった。少なくとも DNA の 2 重鎖切断によりもたらされる LOH は観察されなかった。これらの結果は、放射線照射の作用点が DNA ではないことを示唆し、放射線作用の間接説を支持するものである。

3. ヒト放射線誘発がんと間接作用

細胞ががんに至るには、細胞に複数の遺伝子の機能欠損、または異常機能獲得が蓄積する必要がある¹⁸⁾¹⁹⁾。もし 5 つの遺伝子変異が発がんに必要なであり、放射線がその内のいくつかの変異を照射直後に誘発するとすれば、放射線による突然変異の数に応じた発がん頻度の上昇と潜伏期間の短縮が期待できるはずである¹²⁾。しかし、広島の人被ばく者の固形がんでは、頻度の上昇は見られるが、潜伏期間の短縮は認められない²⁰⁾。これは放射線により誘発された突然変異が、成人被ばくでの固形がんの発症に直接関与する、という単純な機構だけでは説明しにくいことを示唆している。一方、被ばく者の白血病では被ばくから比較的短い一定の潜伏期間をもち、一般のがん年齢以前に発症することが多い。この 2 種類の異なる経過を示すがんへの放射線影響の相違点は興味深い。放射線発がんの研究は古い歴史をもつが、その機構は多様であり、不明確な点が多々残っている²¹⁾。

今後、この *Rit1/Bcl11b* ノックアウトマウスを用いて *Rit1* 遺伝子の不活性化の放射線関与機構について研究を進めていく事により、詳細が不明

である発がんに至る放射線の間接作用機序を明らかにできるのではないかと考えている。

謝 辞

本稿を終えるにあたり、終始御指導、御助言を賜りました新潟大学大学院医歯学総合研究科分子細胞学専攻遺伝子制御学講座分子生物学分野木南 凌教授、若林雄一助手に深謝申し上げます。ならびにまた、本研究に多くのご協力を頂きました医歯学研究科生の坂田 純先生、大井博之先生に深く感謝申し上げます。

参 考 論 文

- 1) Kaplan HS: The role of radiation in experimental leukemogenesis. *Natl Cancer Inst Monogr* 14: 207-217, 1964.
- 2) Ludwig FC, Elashoff RM and Wellington JS: Murine radiation leukemia and the preleukemic state. *Lab Invest* 19: 240-251, 1968.
- 3) Sado T, Kamisaku H and Kubo E: Bone marrow-thymus interactions during thymic lymphomagenesis induced by fractionated radiation exposure in B10 mice: analysis using bone marrow transplantation between Thy 1 congenic mice. *J Radiat Res (Tokyo)* 32, Suppl 2: 168-180, 1991.
- 4) Coggin JH Jr, Rohrer JW and Barsoum AL: A new immunobiological view of radiation-promoted lymphomagenesis. *Int J Radiat Biol* 71: 81-94, 1997.
- 5) Newcomb EW, Steinberg JJ and Pellicer A: *Ras* oncogenes and phenotypic staging in *N*-methyl-nitrosourea- and γ -radiation-induced thymic lymphomas in C57BL/6J mice. *Cancer Res* 48: 5541-5621, 1998.
- 6) Shimada Y, Nishimura M, Kakinuma S, Takeuchi T, Ogiu T, Suzuki G, Nakata Y, Sasanuma S, Mita K and Sado T: Characteristic association between *K-ras* gene mutation with loss of heterozygosity in X-ray-induced thymic lymphomas of the B6C3F1 mouse. *Int J Radiat Biol* 77: 465-473, 2001.
- 7) Okano H, Saito Y, Miyazawa T, Shinbo T, Chou D, Kosugi S, Takahashi Y, Odani S, Niwa O and Kominami R: Homozygous deletions and point mutations of the *Ikaros* gene in γ -ray-induced mouse thymic lymphomas. *Oncogene* 18: 6677-6683, 1999.
- 8) Wakabayashi Y, Inoue J, Takahashi Y, Matsuki A, Kosugi-Okano H, Shinbo T, Mishima Y, Niwa O and Kominami R: Homozygous deletions and point mutations of the *Rit1/Bcl11b* gene in γ ray induced mouse thymic lymphomas. *Biochem Biophys Res Comm* 301: 598-603, 2003.
- 9) Wakabayashi Y, Watanabe H, Inoue J, Takeda N, Sakata J, Mishima Y, Hitomi J, Yamamoto T, Utsuyama M, Niwa O, Aizawa S and Kominami R: *Bcl11b* is required for differentiation and survival of $\alpha\beta$ T lymphocytes. *Nature Immunology* 4: 533-539, 2003.
- 10) Sakata J, Inoue J, Ohi H, Kosugi-Okano H, Mishima Y, Hatakeyama K, Niwa O and Kominami R: Involvement of V(D)J recombinase in generation of intragenic deletions of *Rit1/Bcl11b* tumor suppressor gene in γ -ray induced mouse thymic lymphomas and in normal thymus of the mouse. *Carcinogenesis* (in press).
- 11) Plass C: Cancer epigenomics. *Human Mol Genet* 11: 2479-2488, 2002.
- 12) Little JB: Radiation carcinogenesis. *Carcinogenesis* 21: 397-404, 2000.
- 13) Kaplan HS: On the natural history of the murine leukemias: presidential address. *Cancer Res* 27: 1325-1340, 1967.
- 14) Kaplan HS, Carnes WH, Brown MB and Hiesch BB: Indirect induction of lymphomas in irradiated mice. I. Tumor incidence and morphology in mice bearing nonirradiated thymic grafts. *Cancer Res* 16: 422-425, 1956.
- 15) Humblet C, Defresne MP, Greimers R, Rongy AM and Boniver J: Further studies on the mechanism of radiation induced thymic lymphoma prevention by bone marrow transplantation in C57BL mice. *Leukemia* 3: 813-818, 1989.
- 16) Potworowski EF, Gagnon F, Beauchemin C and St Pierre Y: Dendritic cells prevent radiation-induced thymic lymphoma. *Leukemia* 10: 1639-1647, 1996.

- 17) Kamisaku H, Aizawa S, Kitagawa M, Ikarashi Y and Sado T: Limiting dilution analysis of T - cell progenitors in the bone marrow of thymic lymphoma - susceptible B10 and - resistant C3H mice after fractionated whole - body X - irradiation. *Int J Radiat Biol* 72: 191 - 199, 1997.
- 18) Weinberg RA: Tumor suppressor genes. *Science* 254: 1138 - 1146, 1991.
- 19) Ponder BAJ: Cancer genetics. *Nature* 411: 336 - 341, 2001.
- 20) Pierce D, Shimizu Y, Preston DL, Vaeth M and Mabuchi K: Studies of the mortality of atomic bomb survivors. *Radiation Res* 146: 1 - 27, 1996.
- 21) Barcellos-Hoff MH and Brooks AL: Extracellular signaling through the microenvironment: a hypothesis relating carcinogenesis, bystander effects, and genomic instability. *Radiat Res* 156: 618 - 627, 2001.

(平成 16 年 1 月 22 日受付)
