

# マウスモデルを用いた皮膚発がん感受性遺伝子座の探索

若林 雄一

千葉県がんセンター研究所実験動物研究室

## Genetic Screening of Skin Tumor Modifier Loci using Mouse Models

Yuichi WAKABAYASHI

*Division of Experimental Animal Research,  
Chiba Cancer Center Research Institute*

### 要 旨

日本産野生マウス、モロシヌスは比較的最近、近交系化されたマウス系統であり、従来用いられてきた C57BL6 などの近交系マウスと遺伝的に遠く離れていることがわかっている。また、いくつかの種類腫瘍に対しては強い抵抗性を示すことが既に示されており、他にも聴力が高いことや、糖尿病性に対して抵抗性を示すことや、いくつかのノックアウトマウスと交配するとその形質を完全、あるいは部分的に抑制してしまうことが知られており、従来の近交系マウスが保持していないアレルを保有していることが想像される。我々はこのモロシヌスに属するマウスの中でも代表的な系統である MSM/Ms を用いて、皮膚腫瘍に対して抵抗性を与える抵抗性遺伝子座のスクリーニングを行った。その結果、7 番染色体上にマスター遺伝座的な強い抵抗性を与える遺伝子座の存在を確認し、また 4 番染色体上は微小腫瘍に対しては抵抗性を与えないが、ある一定サイズ以上には腫瘍を大きくさせない、おそらく腫瘍発生の比較的、後期に働くと思われる遺伝子座の存在を確認した。

キーワード：化学発がん、モロシヌス、発がん感受性

### はじめに

一時間程度の比較的、長い時間話をさせていただく時に、私がイントロダクションとしてよく使うスライドがある。そのスライドはアメリカでのデータであるが、1950 年と 2000 年とで心疾患、感染症などの主要な疾患の死亡率を縦軸にプロットして比較したものである。そのグラフは、心疾

患、感染症などの疾患は 1950 年から 50 年経過すると死亡者数が飛躍的に減少しているのに対し、がんだけは 50 年経過しても死亡者数がほとんど変化していないことを示している。50 年経過して外科的手術、化学療法、放射線療法などいずれの面においても新しい治療法が確立されてきているとは思いますが、絶対的に死亡者数を減少させるところまでは到達していないということを意味する。

Reprint requests to: Yuichi WAKABAYASHI  
Division of Experimental Animal Research  
Chiba Cancer Center Research Institute  
666-2 Nitonamachi Chuo-ku,  
Chiba 260-8717 Japan

別刷請求先：〒260-8717 千葉市中央区仁戸名町  
666-2  
千葉県がんセンター研究所実験動物研究室  
若林 雄一

もちろん、50年経過して平均寿命が伸びたためにお年寄りが多くなり、必然的にがんを発症する人自体が増えているということも要因としてあげられるだろう。また、その統計はがんとしてすべての臓器のがんをまとめて集計しているのだから、食道がん罹患者が減少して大腸がん罹患者が増えるなどの生活習慣の変化による腫瘍スペクトラムの変化までは反映しておらず、がん以外の他の疾患が単独の臓器の疾患であるのに対して、データとして若干、公正さを欠くようにも感じられる。しかし、若干の問題点はあるものの、がんの複雑さ、がん治療の難しさを明瞭に示すデータであることには変わりはない。

我々の研究室ではその複雑で手ごわいがんに焦点を当て、特に遺伝的にがんに対する感受性をあげたり、逆に抵抗性を強めたりすることによりがんに関わってくる遺伝子群の同定を目指している。もちろん最終的にはヒトゲノムDNAを用いて直接的にがんに対する感受性を規定しているこれらの遺伝子群を検証してみたいとは考えてはいるが、一見遠回りに見えるかもしれないが、我々はマウスからヒトへと攻めていくことを考えている。ヒトゲノムプロジェクトが完成して何年も経過しSNP（1塩基多型）アレイが登場したかと思いきや、今や次世代シーケンサーの時代になり、遺伝子型を決定するにはとにかく各個人の全ゲノム配列を決定してしまえばよいという時代がすぐそこにまで迫っている昨今である。そんな時代にマウスを使ってヒトへ向かってというのはあまりにも前時代的なのではないか、という意見も正直なところ、しばしば頂戴する。現実的な問題から言ってしまうと、マウスのほうがサンプル収集が容易であったり、なかなか手が届かない高価なヒトゲノム解析ツールを用いなくてもマウスだったら解析可能であったりと、研究し易いという点はメリットと言えばメリットである。それ以外にも従来用いられてきたラボマウスがモデルとして用いるのにふさわしいのかどうかという疑問は長い間、論じられてきたことであり、我々はこの疑問に一石を投じるべく従来のマウスとは若干、異なるマウスを用いることを考えている。

我々は日本産野生マウスであるモロシヌスをモデルとして用いて発がん感受性遺伝子座の探索を行おうと考えている。現在のラボマウスの多くは *Mus musculus domesticus* を中心とした愛玩用マウスに由来することが遺伝学的解析から明らかとなっている。また、ラボマウスは発がん感受性が高い系統が多く、その一因として遺伝学的ツールとして用いるようになった初期に発がん研究者が多く関わったために選択的な系統造成が行われたことなどが推測されている。それに対し日本産野生マウス由来の近交系であるモロシヌスの代表的系統である MSM/Ms (*Mus musculus molossinus*) は国立遺伝学研究所・森脇和朗 博士らにより近年近交化されたマウスである。

日本におけるマウス飼育の歴史は意外に古く、18世紀に描かれたマウスの絵が数多く現存している。おそらく当時、飼育されていたマウスは現在のこのモロシヌスに属するマウスと思われる。当時の日本人が既に愛玩動物としてマウスを飼育する習慣を持っていたことを表している。

このマウスは、従来のラボマウスとは分子系統学的に大きく離れているだけでなく、意図的な人為的選択を受けていないことから、他のラボマウスの持たない野生マウス由来の遺伝的特徴を多く持つことが報告されており、加齢性難聴、糖尿病および様々な発がんに対して抵抗性を示すことから遺伝学的研究に利用されている。例えば、アトピー性皮膚炎などの疾患原因遺伝子における多因子性ヒト疾患マウスモデルを用いた研究<sup>1)</sup>、インフルエンザウイルスなどのオルソミクソウイルス感染に対する抵抗性を付与する *Mx1* および *Oasl1* に関するウイルス感染症の発症メカニズムやウイルスに対する宿主防御機構などの研究<sup>2)</sup>、*ddY* 系を用いた新しい遺伝性白内障に関する研究<sup>3)</sup> などの報告がある。特に発がん実験においては化学発がん剤である PhIP と DSS の複合投与による、大腸がん誘発処理において C57BL/6 系統と比較して、発症率が低下すること<sup>4)</sup> や X 線の照射によるリンパ腫の誘発処理において、発症率が、BALB/c 系統と比較して有意に低いことなどが報告されている<sup>5)</sup>。

発がん刺激としては我々は主としてDMBAおよびTPAの二種類の化学発がん剤を用いた多段階発がんモデルを用いている。このDMBAとTPAの二種類の化学発がん剤を用いた多段階発がんのモデルは実験系としてAllan Balmainらにより確立され広く用いられている手法であり<sup>6)</sup>、DMBAはinitiatorとして働きゲノムDNAにランダムに傷をつけ、その際に*Hras*に変異が入るとされているが、腫瘍発生にはそれだけでは不十分でTPAがpromoterとして働いて初めて良性腫瘍が観察され、そのうち10-20%程度が扁平上皮がんに進展する。

MSMはこれまでの様々な発がん実験において抵抗性を示していることから、本研究に用いたDMBA/TPA処理においても、まずMSMの抵抗性が遺伝するかを調査するために、MSMとFVB間のF<sub>1</sub>マウスを作製し、MSMおよびFBVとともにDMBA/TPA処理を行った。その結果、MSM(n=8)ではTPA処理を開始してから20週目までに良性腫瘍は1つも形成されず、30週目までに扁平上皮がんにおいても形成しなかった。またがん感受性の高い系統であるFVBでは9週目ですべての個体(n=11)が良性腫瘍を形成し、20週目における良性腫瘍の出現率は100%であり、一頭あたりの良性腫瘍の個数は平均30.7±0.9個であった。F<sub>1</sub>(n=12)においては、10週目に良性腫瘍を形成する個体が16.6%現れ、20週目における良性腫瘍の出現率は50%、一頭あたりの良性腫瘍の個数は平均0.9±1.2個であった。これらのことから、MSMはDMBA/TPA処理による皮膚発がん誘導において優性抵抗性を示すことが明らかとなった。

そこで、我々特に皮膚発がん感受性が高いFVB/NとMSM/Msとの戻し交配分離個体(N<sub>2</sub>)を作製し、それらをDMBA/TPAの二種類の化学発がん剤を用いた皮膚多段階発がんのプロトコルを用いて処理し、皮膚発がん抵抗性/感受性遺伝子座を連鎖解析によりスクリーニングした。

その結果、2mm以下の良性腫瘍に対する一番強力な抵抗性遺伝子座の領域として7番染色体上(約53172720~126426677 bp)にマップし、Lod

スコア3.5を検出した。また4番および16番染色体上にもSuggestive(Lodスコア2.0)を超えるlodスコアを検出した。2~6mmの良性腫瘍においては3,6および12番染色体上にSuggestiveを超えるLodスコアを検出し、2mm以下の良性腫瘍に対する抵抗性遺伝子座の領域と同じ7番染色体にSignificant(Lodスコア4.0)を超えるLodスコア4.8を検出した。また6mm以上の良性腫瘍においては4番染色体上の(約36411566~85877570 bp)にのみSignificantを超えるLodスコア7.1を検出した。全サイズの良性腫瘍においては3,6および12番染色体にSuggestiveを超えるLodスコアが検出され、7番染色体でSignificantを超えるLodスコア5.6を検出した。

以上の結果、2mm以下、2~6mmおよびすべての良性腫瘍数において最も高いLodスコアを示したのは7番染色体であり、もっとも主要な候補遺伝子座が存在すると考えられた。またこの領域の近傍にはこれまでに皮膚がん感受性遺伝子座として*Skts1*および*Skts2*が存在することが報告されている<sup>6)</sup>。このことから、これらの遺伝子座も今後、候補遺伝子座になる可能性があるかと推測された。さらに、興味深いことに、6mm以上の良性腫瘍に対する抵抗性遺伝子座つまり、6mm以上に腫瘍を成長させない遺伝子座として4番染色体上に単一のLodスコア7を超える領域を検出した。このように、腫瘍のサイズ別にマッピングを行った結果、大きさによって関与する遺伝子座が全く別の染色体上にあると言う興味深い結果が得られた。まだまだ一次スクリーニングが終了したという段階であるが、今後はコンジェニック系統を作製するなどして候補領域を狭めることに取り組んでいきたい。

また、単一の遺伝子の同定を目指すだけでなく、情報工学系の先生方との共同研究も積極的に展開して、システム生物学的解析も進めていきたいと考えている。具体的には発がん感受性個体と、抵抗性個体との間の正常組織レベルでの遺伝子発現の違いを網羅的に調べ、eQTL(expression Quantitative Trait Loci)解析を行うことや、良性腫瘍、悪性腫瘍などの各ステージの腫瘍をサン

リングして、次世代シーケンサーを用いて変異解析や発現解析をこれも網羅的に行い、変異間のネットワークや転写物間のネットワーク解析へと進めていきたいと考えている。

#### 謝 辞

平成 22 年度までテニユアトラックの遺伝機構学研究室としてお世話になりました。平成 23 年度から千葉県がんセンターに異動しました。お近くにお越しの際は、お気軽にお声かけください。今後ともよろしく願い申し上げます。

#### 参 考 文 献

- 1) Kohara Y, Tanabe K, Matsuoka K, Kanda N, Matsuda H, Karasuyama H and Yonekawa H: A major determinant quantitative - trait locus responsible for atopic dermatitis - like skin lesions in NC/Nga mice is located on Chromosome 9. *Immunogenetics* 53: 15 - 21, 2001.
  - 2) Moritoh K, Yamauchi H, Asano A, Yoshii K, Kariwa H, Takashima I, Isoda N, Sakoda Y, Kida H, Sasaki N and Agui T: Generation of congenic mouse strains by introducing the virus - resistant genes, Mx1 and Oas1b, of feral mouse - derived inbred strain MSM/Ms into the common strain C57BL/6J. *Jpn J Vet Res* 57: 89 - 99, 2009.
  - 3) Kondo T, Nagai H, Morioka H, Kusakabe KT and Okada T: Novel cataract mouse model using ddY strain: hereditary and histological characteristics. *J Vet Med Sci* 72: 203 - 209, 2010.
  - 4) Nakanishi M, Tazawa H, Tsuchiya N, Sugimura T, Tanaka T and Nakagama H: Mouse strain differences in inflammatory responses of colonic mucosa induced by dextran sulfate sodium cause differential susceptibility to PhIP - induced large bowel carcinogenesis. *Cancer Sci* 98: 1157 - 1163, 2007.
  - 5) Okumoto M, Mori N, Miyashita N, Moriwaki K, Imai S, Haga S, Hiroishi S, Takamori Y and Esaki K: Radiation - induced lymphomas in MSM, (BALB/cHeA x MSM) F1 and (BALB/cHeA x STS/A) F1 hybrid mice. *Exp Anim* 44: 43 - 48, 1995.
  - 6) Nagase H, Mao JH and Balmain A: A subset of skin tumor modifier loci determines survival time of tumor - bearing mice. *Proc Natl Acad Sci USA* 96: 15032 - 15037, 1999.
-