

---



---

 原 著
 

---



---

## *Bcl11b* は Min マウスの腸管腫瘍の発症を促進させる ハプロ不全型癌抑制遺伝子である

岩 崎 友 洋

新潟大学大学院医歯学総合研究科

分子細胞医学専攻細胞機能講座消化器内科学分野

(指導：青柳 豊教授)

*Bcl11b* is a Haploinsufficient Tumor Suppressor in Adenoma Development in Min mice

Tomohiro IWASAKI

Department of Cellular Function of Gastroenterology and Hepatology,

Niigata University School of Medicine

(Prof. Yutaka AOYAGI)

### 要 旨

大腸がんは日本において急速に増加してきている。大腸がんの発症・進展に *Apc*, *DCC*, *K-ras*, *p53* などの関与が報告されているが、いまだ不明な点が多い。*Bcl11b* はヒト 14 番染色体長腕に位置し、マウス胸腺リンパ腫でハプロ不全型がん抑制遺伝子として機能するとともに T リンパ球の分化に関与していることが示されている。ヒト大腸がんでは *Bcl11b* 遺伝子座近傍に高頻度に対立遺伝子欠損を認めることやヒト大腸がんの全ゲノムシーケンス解析において *Bcl11b* 変異の存在することが報告されており、*Bcl11b* が大腸がんの発症に関与している可能性があると考え、*Bcl11b*<sup>+/-</sup>マウスと Min マウス (*Apc*<sup>Min/+</sup>) を使った腸管発がん実験を行った。またマウス腸管とヒト大腸での *Bcl11b* の発現も調べた。*Bcl11b*<sup>+/-</sup>マウスと *Apc*<sup>Min/+</sup> マウスから *Bcl11b*<sup>+/-</sup>/*Apc*<sup>Min/+</sup> マウスと *Bcl11b*<sup>+/+</sup>/*Apc*<sup>Min/+</sup> マウスを作製し、両マウスの小腸腫瘍数と腫瘍サイズを調べ、腫瘍部における *Bcl11b* 領域の LOH 解析を行った。結果は、*Bcl11b*<sup>+/-</sup>/*Apc*<sup>Min/+</sup> マウスに比べ *Bcl11b*<sup>+/+</sup>/*Apc*<sup>Min/+</sup> マウスで腫瘍数が有意に増加し、腫瘍サイズは増大傾向であった。腫瘍部での *Bcl11b* 領域の LOH 解析では、*Bcl11b*<sup>+/-</sup>/*Apc*<sup>Min/+</sup> マウスの腫瘍部では *Bcl11b* 野生型アリルが 40% (8/20) の頻度でみられたが、*Bcl11b*<sup>+/+</sup>/*Apc*<sup>Min/+</sup> マウスの腫瘍部では *Bcl11b* 野生型アリルの欠失は認めなかった。これらの結果から、*Bcl11b* は Min マウスの腸管腫瘍の発症を促進させるハプロ不全型がん抑制遺伝子であることが示された。その機序は不明で

Reprint requests to: Tomohiro IWASAKI  
Division of Gastroenterology and Hepatology  
Niigata University Graduate School of Medical  
and Denral Sciences  
1 - 757 Asahimachi - dori Chuo - ku,  
Niigata 951 - 8510 Japan

別刷請求先：〒951 - 8510 新潟市中央区旭町通 1 - 757  
新潟大学大学院医歯学総合研究科消化器内科学分野  
岩崎友洋

あるが、*Apc*<sup>+/+</sup> マウスでは腸管腫瘍の形成はなく、*Apc*<sup>Min/+</sup> マウスで腸管腫瘍の発生を促進していることから、*Wnt/β* カテニン系シグナルとの関与が示唆される。一方、腸管での *Bcl11b* の発現を調べてみると、マウス小腸では *Bcl11b* は陰窩内に存在する細胞の核内に強い発現がみられ、絨毛に達すると小腸腔に近づくにつれその発現は減弱していた。陰窩内には幹細胞や *transit-amplifying* (TA) 細胞といった未分化な細胞が位置しており、その未分化性の維持には *Wnt/β* カテニン系シグナルが重要な役割を果たしていることが知られている。*Bcl11b* は  $\beta$  カテニンと同様に陰窩下部の細胞核内に強発現しており、*Bcl11b* は *Wnt/β* カテニン系に関与して幹細胞や TA 細胞の未分化性の維持、つまりは腸管上皮細胞の分化に関与している可能性がある。以上より、*Bcl11b* は *Wnt/β* カテニン系と関連して腸管腫瘍の発症や腸管上皮の分化に関与している可能性が示唆された。

キーワード： *Bcl11b*, ハプロ不全, 癌抑制遺伝子,  $\beta$  カテニン, 大腸がん

## はじめに

大腸がんは日本において急速に増加してきており、大腸がんの死亡者数はこの20年で2倍以上に増え、日本女性のがん死亡原因の1位、男性では4位となっている<sup>1)</sup>。2020年には、男女あわせたがん罹患数・罹患率ともに胃がん、肺がんを抜き1位になると予測されている<sup>1)</sup>。疫学的にみると大腸がんの少なくとも15%に遺伝性が認められる<sup>2)3)</sup>。遺伝性大腸がんの代表的な疾患として、家族性大腸腺腫症 (familial adenomatous polyposis; FAP) と遺伝性非ポリポーシス大腸がん (hereditary non-polyposis colorectal cancer; HNPCC) が挙げられるが、大腸がんにおける FAP, HNPCC の占める割合は、それぞれ1%未満<sup>2)</sup>、2-4%<sup>4)</sup> に過ぎない。FAPの原因遺伝子としては *Apc*<sup>5)</sup> が、HNPCCの原因遺伝子としては *hMSH2*, *hMLH1*, *hPMS1*, *hPMS2*, *hMSH6*<sup>4)</sup> などが同定されているが、更なる遺伝子が大腸がんの発症に関与していることが示唆される。一方、散发性大腸がんでも *Apc* 異常がおよそ80%の頻度で見られることが分かっている<sup>2)</sup>。大腸がんは複数の遺伝子異常が段階的に起こり発症・進行することが広く知られている (多段階発がん説)<sup>6)</sup>。 *Apc* は腫瘍発症の初期に関与しており、その他にも *DCC* や *K-ras*, *p53* などの関与が判明しているが、いまだ全ての癌の発症や進行を説明できるまでには至っておらず、更なる遺伝子の関与が考えられている。

*Bcl11b* は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うことで同定されたがん抑制遺伝子である<sup>7)</sup>。 *Bcl11b* は zinc finger 型転写因子をコードし、T細胞の分化を調節し、マウス胸腺リンパ腫ではハプロ不全型がん抑制遺伝子として機能する<sup>8)9)</sup>。 *Bcl11b* はヒト14番染色体長腕 (14q13.32) に位置しており、同領域はヒト大腸がんで高頻度に対立遺伝子欠損を認めることが報告されている<sup>10)-12)</sup>。これらの報告に加え、ヒト大腸がんの全ゲノムシークエンス解析において *Bcl11b* 変異の存在も報告されている<sup>13)</sup>。以上のことから、*Bcl11b* が腸管腫瘍の発生に関与している可能性があると考え、*Bcl11b* ヘテロマウスと腸管腫瘍のモデルマウスである *Min* マウスを用いての発がん実験を行い、*Bcl11b* の腸管腫瘍における影響を検討した。また、マウスとヒトの腸管における *Bcl11b* の発現も確認した。

## 方 法

### 1. マウス腸管発がん実験

今回 C57BL/6J バックグラウンドの *Apc*<sup>Min/+</sup> マウスと BALB/c バックグラウンドの *Bcl11b*<sup>+/-</sup> マウスを使用した。 *Apc*<sup>Min/+</sup> マウスは、*Apc* の 850 番目のコドンにナンセンス突然変異を有し、腸管腫瘍が多発する FAP のモデルマウスである<sup>14)15)</sup>。 *Apc*<sup>Min/+</sup> マウスは The Jackson laboratory から購入し新潟大学の動物管理施設で繁殖・維持した。 *Bcl11b*<sup>+/-</sup> マウスは木南ら<sup>8)</sup> が作製し、同じく新潟大学の動物管理施設で繁殖・維持していたマウスを使用

表 1 マウス腸管発がん実験 概要

	マウス頭数	屠殺週齢
第1回	<i>Bcl11b</i> <sup>+/+</sup> / <i>Apc</i> <sup>Min/+</sup> マウス 11頭	19週齢
	<i>Bcl11b</i> <sup>+/-</sup> / <i>Apc</i> <sup>Min/+</sup> マウス 13頭	19週齢
第2回	<i>Bcl11b</i> <sup>+/+</sup> / <i>Apc</i> <sup>Min/+</sup> マウス 13頭	20週齢
	<i>Bcl11b</i> <sup>+/-</sup> / <i>Apc</i> <sup>Min/+</sup> マウス 10頭	20週齢

↓

小腸腫瘍数カウント、腫瘍サイズ計測

↓

腫瘍部LOH解析

① *Apc*  
② *Bcl11b*

2回に分けてマウス腸管発がん実験を行った。

*Bcl11b*<sup>+/+</sup>/*Apc*<sup>Min/+</sup> マウスと *Bcl11b*<sup>+/-</sup>/*Apc*<sup>Min/+</sup> マウスを19週または20週で屠殺し、小腸腫瘍数と腫瘍サイズを調べ、各ジェノタイプの腫瘍部におけるLOH解析を行った。

した。*Bcl11b* ヌルマウスは生後すぐに死んでしまうが、*Bcl11b*<sup>+/-</sup>マウスは *Bcl11b*<sup>+/+</sup> マウスと大きな違いはなく成長し、腸管腫瘍の発生もみられない。

*Apc*<sup>Min/+</sup> マウスと *Bcl11b*<sup>+/-</sup> マウスを交配させ、*Bcl11b*<sup>+/-</sup>/*Apc*<sup>Min/+</sup> マウスと *Bcl11b*<sup>+/+</sup>/*Apc*<sup>Min/+</sup> マウスを作製した。両マウスを用いた腸管発がん実験を表1のように計2回行った(表1)。19週齢または20週齢でマウスを麻酔下で頸椎脱臼にて安楽死させ、小腸腫瘍数とサイズを調べ、腫瘍部での *Bcl11b* 領域の loss of heterozygosity (LOH) 解析を行った。

## 2. 腫瘍カウント

摘出した小腸を長軸方向に開いてPBSで洗浄し、4% PFA-PBSに浸し4℃で一晩固定し、実体顕微鏡を用いて腺腫数とサイズを一般的な方法<sup>16)</sup>で調べた。

## 3. 腫瘍DNA抽出

上記のように腫瘍数、サイズを調べたのちに、小腸腫瘍を肉眼的に切り出しO.C.T. compound

に入れて凍結させクリオスタットで15μmの厚さに切り出した。切片をメチレングリーンで染色し実体顕微鏡下で正常組織を含まないように腫瘍組織のみを核出し、DNAを抽出した。

## 4. 腫瘍部におけるLOH解析

腫瘍部からDNAを抽出する際には、正常組織の混入を完全に防ぐことは困難であった。腫瘍部における *Bcl11b* 遺伝子座のLOH解析を行う前に、まずは抽出したDNAがLOH解析に適しているか、つまりは正常組織の混入が許容範囲内かどうかを評価する必要があった。*Min* マウスに発症したほとんど全ての腸管腫瘍で *Apc* 野生型アリルが欠失する<sup>16)</sup>。まずは、抽出したDNAにおいて *Apc* 野生型アリル欠失を確認することで、その検体の適正を評価した。

### ・ *Apc* のLOH解析

Hind IIIを用いたRFLP (restriction fragment length polymorphism) により腫瘍部における *Apc* 野生型アリル領域のLOHを決定した。基本的にはCindyらが報告している *APC*<sup>Min</sup> 点変異を利用したRFLPを施行した(図2A)<sup>17)</sup>。簡単に述

べると、Min-Fプライマー (TCTCGTTCTGAGA AAGACAGAAGCT) と Min-Rプライマー (TGA TACTTCTTCCAAAGCTTTGGCTAT) で PCR をかけ、その PCR 産物を Hind III で切断すると、APC<sup>+</sup>アリルは123塩基対、APC<sup>Min</sup>アリルは144塩基対となり、それぞれを認識することができる。ただし今回は PCR の特異性を高くするために Nested PCR を行った。Min-Rプライマーより外側に Min-R2プライマー (AACTTCTGTCGTC CTGGGAG) を設計し、Min-Fプライマーと Min-R2プライマーで1段階目の PCR を行い、ついで Min-Fプライマーと Min-Rプライマーで2段階目の PCR を行った。2段階目の PCR 産物を制限酵素 (Hind III) 処理し、10% PAGE により分離し、エチジウムブロマイド染色により検出した。

#### ・ *Bcl11b* の LOH 解析

*Bcl11b*<sup>+/-</sup>マウス (BALB/c 由来) と *APC*<sup>Min/+</sup>マウス (C57BL/6J 由来) の F1 マウスは当然の事ながら片アリルは BALB/c 由来、もう一方が C57BL/6J 由来となる。*Bcl11b*<sup>+/-</sup>/*Apc*<sup>Min/+</sup>マウスでは BALB/c 由来の *Bcl11b* は neo カセットの挿入により機能しなくなっている。*Bcl11b* 領域の LOH 解析を行うために *Bcl11b* 近傍に存在し両マウスを鑑別できる SNP を検索し、その SNP を利用した RFLP を行った (図 2C)。こちらも nested PCR を行った。*Bcl11b*-Fプライマー (TGGAGA ACCAGAAGTGTGACC)、*Bcl11b*-Rプライマー (CTTCACCAGCCCTTCACATT)、*Bcl11b*-R2プライマー (GATTCAGCATGGCTCTGACA) を用いて、*Bcl11b*-Fプライマーと *Bcl11b*-R2プライマーで一段階目の PCR を行い、その PCR 産物を鋳型として *Bcl11b*-Fプライマーと *Bcl11b*-Rプライマーで2段階目の PCR を行った。PCR は DNA (100ng/ $\mu$ l) 0.5 $\mu$ l, 2 $\times$ G (I) 5.0 $\mu$ l, dNTPs 1.6 $\mu$ l, primer F (5mM) 0.3 $\mu$ l, primer R (5mM) 0.3 $\mu$ l, dH<sub>2</sub>O 2.2 $\mu$ l, LA-Taq 0.05 $\mu$ l で Gene Amp 9700 PCR system で行った。PCR 条件は、94 $^{\circ}$ C 2分, 94 $^{\circ}$ C 30秒-58 $^{\circ}$ C 30秒-72 $^{\circ}$ C-30秒を20回, 72 $^{\circ}$ C 5分とした。2段階目の PCR 産物を制限酵素 (Hind III) 処理した。PCR 産物 5.0

$\mu$ l, 10 $\times$ M Buffer 1.5 $\mu$ l, dH<sub>2</sub>O 8.0 $\mu$ l, Hind III (12U/ $\mu$ l) 0.5 $\mu$ l で 37 $^{\circ}$ C 2時間反応させた。制限酵素処理後、10% PAGE により分離し、エチジウムブロマイド染色により検出した。

#### 5. 統計学的検定

統計学的有意差検定は Mann-Whitney U-test を用いた。P値 < 0.05 を有意差有り と判定した。

#### 6. マウス腸管とヒト腸管の免疫化学組織染色

BALB/c マウスを麻酔下で頸椎脱臼にて安楽死させ、腸管を摘出、PBS で洗浄して長軸方向に開き、4% paraformaldehyde (PFA)-PBS で 4 $^{\circ}$ C 一晩固定し、パラフィンに包埋した。スライドガラス上に 4 $\mu$ m の切片を載せ、脱パラフィン処理を行ったのちにオートクレブ (121 $^{\circ}$ C 5分) による加熱処理で抗原の賦活化を行い、ついで内因性ペルオキシダーゼの不活化のため 0.3% 過酸化水素水に室温で 30 分間浸した。PBS で洗浄したのち、ブロッキングとして 1% skim milk で室温 60 分反応させた。Rat anti-*Bcl11b* (1:200, abcam ab18465) と室温 2 時間反応させ、0.5% Triton X-PBS で 3 回洗浄し、その後、rat N-histofine-R Smiple Stain MAX PO (Nichirei) に室温 60 分反応させる。DAB で発色させた後に、ヘマトキシリン染色で核染色を行い、脱水・透徹・封入を行い、顕微鏡で観察した。

ヒト大腸における *Bcl11b* の発現の有無を調べるために新潟大学医歯学総合病院第一外科で腸管切除術を施行予定の患者から同意の上、切除腸管の一部を提供して頂いた。腸管を 4% PFA-PBS で数日間固定し、パラフィン包埋した。抗原賦活化をオートクレブ (121 $^{\circ}$ C 10分) で行った以外は、マウス腸管の染色方法と同様である。

## 結 果

#### 1. マウス腸管発がん実験

表 1 のように *Bcl11b*<sup>+/-</sup>/*Apc*<sup>Min/+</sup>マウスと *Bcl11b*<sup>+/+</sup>/*Apc*<sup>Min/+</sup>マウスを用いて 2 回の発がん実験を行った。

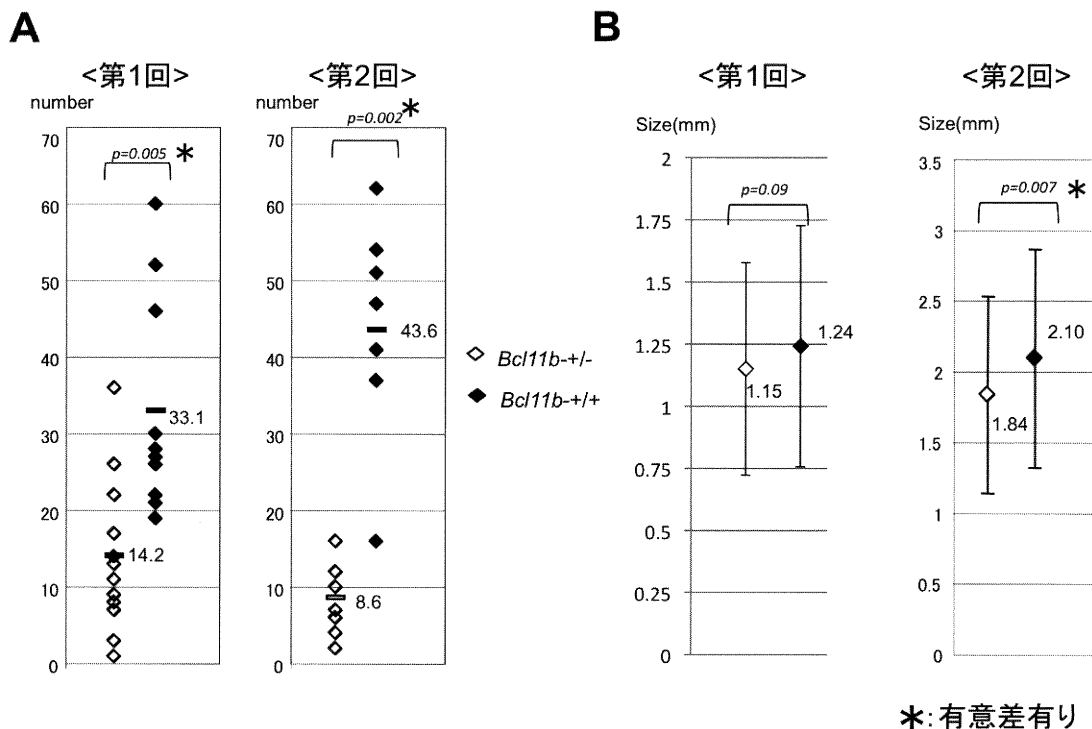


図1 マウス腸管発がん実験

A：腫瘍数。2回の実験ではともに *Bcl11b* ヘテロ遺伝子群で有意に腫瘍数が増加した。

B：腫瘍サイズ。2回の実験で、ともに *Bcl11b* ヘテロ遺伝子群で腫瘍サイズが増大する傾向がみられた。

腫瘍数に関しては、2回の実験ともに *Bcl11b*<sup>+/-</sup>/*Apc*<sup>Min/+</sup> マウスの方が *Bcl11b*<sup>+/+</sup>/*Apc*<sup>Min/+</sup> マウスと比べ有意に腫瘍数が増加した (図 1A)。

腫瘍サイズは、2回とも *Bcl11b*<sup>+/-</sup>/*Apc*<sup>Min/+</sup> マウスの方が *Bcl11b*<sup>+/+</sup>/*Apc*<sup>Min/+</sup> マウスと比べ有意差は認めないものの増大傾向を認めた (図 1B)。

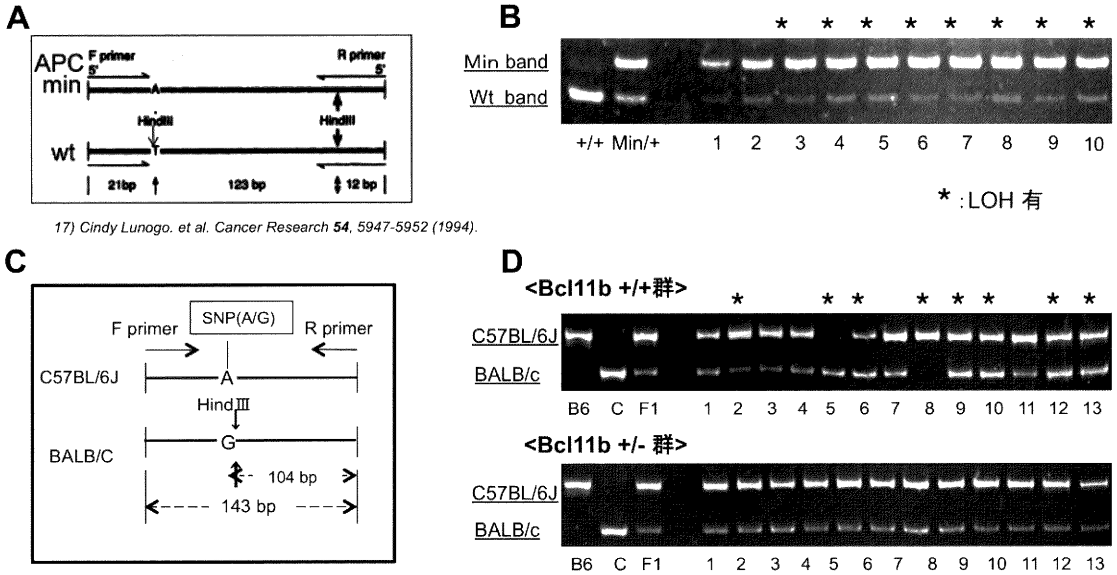
## 2. マウス小腸腫瘍における *Bcl11b* 遺伝子座の LOH 解析

まずは腫瘍部から抽出した検体が LOH 解析に適しているか否かを、*Apc* 領域の LOH を確かめることで判定した。上述のように *Apc* 野生型アリルは 122 塩基対、*Apc*<sup>Min</sup> アリルは 144 塩基対となる。コントロールの (*Apc* 野生型バンド濃度) / (*Apc*<sup>Min</sup> バンド濃度) を基準とし、腫瘍部検体の

バンド濃度比を除した値が 0.5 以下となるものを *Apc* 野生型アリルが欠失していると判定し、つまりは LOH 解析に適した検体と判断した (図 2B)。

その検体を用いて *Bcl11b*<sup>+/-</sup>/*Apc*<sup>Min/+</sup> マウスと *Bcl11b*<sup>+/+</sup>/*Apc*<sup>Min/+</sup> マウスの腫瘍部の *Bcl11b* 遺伝子座の LOH 解析をそれぞれ 20 検体ずつ行った。コントロールの (C57BL/6J バンド濃度) / (BALB/c バンド濃度) の値を基準として、腫瘍部検体のバンド濃度比を除した値が 0.5 以下となるものを LOH 有り と判断した (図 2D)。

*Bcl11b*<sup>+/-</sup>/*Apc*<sup>Min/+</sup> マウスでは *Bcl11b* 野生型アリルの欠失は認めなかった。一方、*Bcl11b*<sup>+/+</sup>/*Apc*<sup>Min/+</sup> マウスでは、20 検体中 8 検体で *Bcl11b* 遺伝子座に LOH を認めた。



17) Cindy Lunogo. et al. Cancer Research 54, 5947-5952 (1994).

図2 LOH解析

- A : *Apc* の LOH 解析. *Apc*-Min 点変異を利用した RFLP を施行した.
- B : RFLP の結果. コントロールの wt バンド/Min バンド比を基準として, 腫瘍検体のバンド比を除いた値が <0.5 となるものを LOH ありと判定した. ★ : LOH 有.
- C : *Bcl11b* の LOH 解析. C57BL/6J マウスと BALB/c マウスを識別できる SNP を利用した RFLP.
- D : RFLP の結果. コントロールの (C57BL/6J バンド)/(BALB/c バンド) 比を基準として, 腫瘍検体のバンド比を除いた値が <0.5 となるものを LOH ありと判定した. ★ : LOH 有.

3. マウス腸管の *Bcl11b* 発現

マウス腸管での *Bcl11b* の発現の有無を調べた.

マウス小腸の構造について簡単に説明する. 小腸上皮幹細胞については position-4 細胞<sup>18)</sup> と crypt based columnar (CBC) 細胞<sup>19)</sup> の2つの説が報告されており, いずれも陰窩下部に存在すると考えられている. 幹細胞から transit-amplifying (TA) 細胞が分裂し, TA 細胞は小腸腔に向かって移動しながら4~5回の分裂を行い, 陰窩外へと出ていく<sup>20)</sup>. 陰窩を出て絨毛内に達したTA細胞は杯細胞や吸収細胞へと分化し, およそ5日間で小腸腔へ脱落する<sup>21)22)</sup>.

小腸上皮幹細胞はβカテニン経路の活性化によって未分化能を維持している<sup>23)</sup>. 正常腸管では, βカテニンは陰窩下1/3で核内に発現し, それよ

り上方になると核内の発現はみられなくなる<sup>24)</sup>.

*Bcl11b* はマウス小腸の陰窩内に存在する幹細胞とTA細胞の核内に強く発現し, 絨毛に達し小腸腔に近づくにつれその発現は弱くなっていた(図3A). 陰窩下部に位置するβカテニン核内発現細胞でも, *Bcl11b* は核内に強く発現していた. *Bcl11b* 強発現細胞はBrdUの取り込みが強く, 盛んに分裂していることが示された. Villinが発現している絨毛上皮細胞では核内に*Bcl11b*の発現は認められるもののその発現は弱く, 上方に移動するにつれさらに弱くなり, 絨毛半ばになると*Bcl11b*の発現はみられなくなった.

マウス大腸では小腸に比べ発現は弱いものの, やはり陰窩内の細胞核内に発現を認めた(図3B).

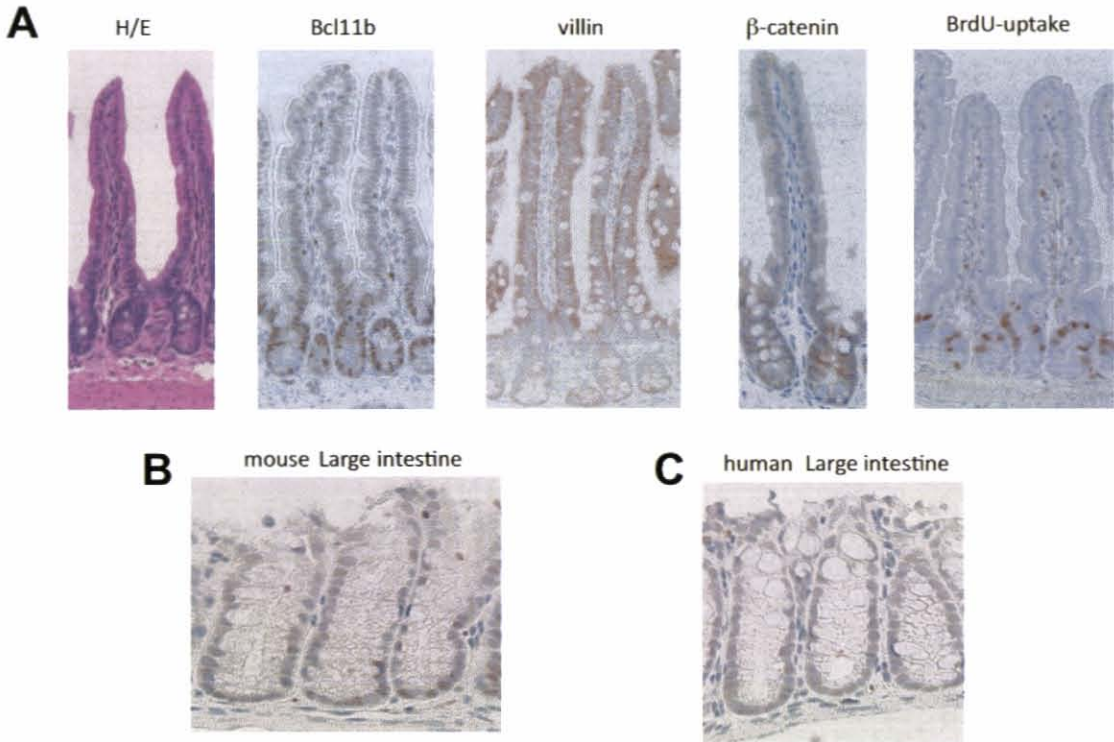


図3 マウスとヒト腸管における *Bcl11b* の発現

- A：マウス小腸における各種染色（×200）。*Bcl11b* は陰窩内の細胞核に強発現し、小腸腔に近づくにつれ、その発現は減弱している。  
 B：マウス大腸における *Bcl11b* 染色（×200）。*Bcl11b* は陰窩内下部の核内に発現を認める。  
 C：ヒト大腸における *Bcl11b* 染色（×200）。マウスと同様陰窩内の細胞核に *Bcl11b* を認める。

ヒト大腸でも陰窩内の細胞の核内に *Bcl11b* の発現がみられた（図3C）。

### 考 察

*Bcl11b*<sup>+/-</sup>/*Apc*<sup>Min/+</sup> マウスと *Bcl11b*<sup>+/-</sup>/*Apc*<sup>Min/+</sup> マウスを用いて発がん実験を行った。*Bcl11b*<sup>+/-</sup> 遺伝子型に比べ *Bcl11b*<sup>+/-</sup> 遺伝子型で有意に小腸腫瘍の発生頻度が増加することが示された。また、*Bcl11b*<sup>+/-</sup> 遺伝子型に発生した小腸腫瘍では *Bcl11b* 遺伝子の片アリル欠失を40%（8/20）の頻度で認めた。

また、マウス小腸・大腸、ヒト大腸で陰窩内に

*Bcl11b* 蛋白の発現を確認した。

#### 1. *Bcl11b* 遺伝子の欠損は *Min* マウスにおける腸管腫瘍の発症を促進する

大腸がんにおける多段階発がん説は広く知られている<sup>6)</sup>。正常上皮細胞に *Apc* の欠失または突然変異が起こると異常腺窩巣（aberrant crypt foci: ACF）へと進行し、その後 DNA 低メチル化、*K-ras* 変異、*DCC* 欠失、*p53* 欠失などを得るにつれ組織学的悪性度を増していくという多段階性の発がん機構である。*Apc* 異常は多段階発がんの初期に起こることが示されており、大腸がんのおよそ80%に *Apc* 変異を認める<sup>2)</sup>。*Apc* は Wnt シグナ

ル経路の $\beta$ カテニン-Axin-GSK3 $\beta$ 複合体と結合し、その分解を誘導する作用を有する<sup>25)–27)</sup>。変異ApcはAxinと結合することが出来なくなり、その結果 $\beta$ カテニンを効率よくリン酸化することが出来ずに $\beta$ カテニンが蓄積し、異常細胞増殖を誘導する<sup>28)29)</sup>。Wnt/ $\beta$ カテニン系の異常は大腸がんのみならず、肝臓がんや胃がんなど様々ながんの発症にも関与することが示されている。

今回の実験では、*Bcl11b*<sup>+/-</sup>/*Apc*<sup>+/+</sup>マウスでは腸管腫瘍の発症は見られず(データは提示せず)、*Bcl11b*<sup>+/+</sup>/*Apc*<sup>Min/+</sup>マウスと比べ*Bcl11b*<sup>+/-</sup>/*Apc*<sup>Min/+</sup>マウスで腸管腫瘍の発生頻度が増し、サイズが増大されていることから、*Bcl11b*<sup>+/-</sup>遺伝子型はApc異常による腫瘍発生作用を増強していると考えられる。その作用機序は不明であるが、*Bcl11b*が幹細胞またはTA細胞と考えられる $\beta$ カテニン核内発現細胞と同じ核内に強く発現していることから、*Bcl11b*はWnt/ $\beta$ カテニン系と関与し腸管腫瘍の発症を促進している可能性がある。

## 2. *Bcl11b*はMinマウスでの腸管腫瘍発症においてハプロ不全型がん抑制遺伝子として機能する。

通常、染色体同士のうち一方が欠失しても、もう一方の染色体に補われ機能的には異常を来さない。しかし、一部の遺伝子は片方の欠失のみで通常の機能を賄えなくなる。このような現象をハプロ不全という。一般的にがん抑制遺伝子はKnudsonのいわゆる“two hit theory”に基づき両アレルの不活化により発がんにいたると考えられている。一方で、p53やPten、p27などのがん抑制遺伝子はハプロ不全な遺伝子として発がんに関与することが知られている。

*Bcl11b*もハプロ不全ながん抑制遺伝子であることが報告されている<sup>9)</sup>。*Bcl11b*<sup>+/-</sup>/*p53*<sup>+/-</sup>マウスでは*Bcl11b*<sup>+/+</sup>/*p53*<sup>+/-</sup>マウスと比べ胸腺リンパ腫の発症を増加させる。 $\gamma$ 線照射後の*Bcl11b*<sup>+/-</sup>/*p53*<sup>+/-</sup>マウスのリンパ腫の54%で*Bcl11b*野生型アレルが欠失していた。一方、自然発症の*Bcl11b*<sup>+/-</sup>/*p53*<sup>+/-</sup>マウスのほとんどのリンパ腫では*Bcl11b*アレル欠失はみられず*Bcl11b*蛋白の存

在も確認された。以上のことから、*Bcl11b*はマウス胸腺リンパ腫においてハプロ不全型がん抑制遺伝子であることが示された<sup>9)</sup>。

本実験では、Minマウスに発症した腸管腫瘍の*Bcl11b*領域のLOH解析で、*Bcl11b*<sup>+/+</sup>群では40% (8/20)で*Bcl11b*の片アレル欠失が見られ、*Bcl11b*<sup>+/-</sup>群では*Bcl11b*野生型アレルの欠失は認めなかった。このことから*Bcl11b*はMinマウスの腸管腫瘍の発症に対してもハプロ不全型がん抑制遺伝子として機能することが示された。

## 3. *Bcl11b*は腸管上皮の増殖・分化に関与している可能性がある

*Bcl11b*はマウス小腸の陰窩内に存在する幹細胞やTA細胞の核内に強く発現し、小腸腔に近づくにつれその発現は弱くなる。つまり未分化な細胞に*Bcl11b*が強く発現している。TA細胞から分化した絨毛上皮細胞でも*Bcl11b*の発現は見られるが、経過とともにその発現量は減弱していることから、絨毛上皮細胞における*Bcl11b*はその時点で産生されているものではなく、幹細胞・TA細胞時に産生された*Bcl11b*の遺残であり、時間とともに分解されていると推測される。

*Bcl11b*はT細胞の分化に関与しているとの報告<sup>30)–33)</sup>がなされており、腸管においても腸管上皮の増殖・分化に関与している可能性がある。小腸上皮幹細胞がその未分化能を維持するためには $\beta$ カテニン経路の活性化が必要であることが示されている<sup>23)</sup>。幹細胞やTA細胞では*Bcl11b*と $\beta$ カテニンはともに核内に発現しており、前述のように今回の発がん実験で*Bcl11b*はMinマウスの腸管腫瘍の発症を促進することが示されたことから、*Bcl11b*とWnt/ $\beta$ カテニン系との関連性が推測される。以上のことから、*Bcl11b*はWNT/ $\beta$ カテニン系を介して腸管上皮の増殖・分化に関与している可能性がある。

## 結 論

*Bcl11b*はマウス・ヒトの腸管陰窩に発現していた。Minマウスを用いた発がん実験と腫瘍部



LOH 解析から, *Bcl11b* はハプロ不全ながん抑制遺伝子として Min マウスの腸管腫瘍の発症に関与していることが示された. その作用機序は不明であるが, Wnt/ $\beta$  カテニン系に関与している可能性がある.

#### 謝 辞

本研究においてご指導賜りました青柳豊教授, 木南凌教授 (分子細胞医学専攻遺伝子制御講座) に深謝いたします.

#### 参 考 文 献

- 1) 大島 明, 黒石哲生, 田島和雄: がん・統計白書 2004. 篠原出版新社.
- 2) Kinzler KW and Vogelstein B: Lessons form hereditary colorectal cancer. *Cell* 87: 159-170, 1996.
- 3) Ilyas M, Straub J, Tomlinson IP and Bodmer WF: Genetic pathways in colorectal and other cancers. *Eur. J Cancer* 35: 1986-2002, 1999.
- 4) Lynch HT, Smyrk T and Lynch JF: Overview of natural history, pathology, molecular genetics and management of HNPCC (Lynch Syndrome). *Int J Cancer* 69: 38-43, 1996.
- 5) Groden J, Thliveris A, Samowitz W, Carison M, Gelbert L, Albersen H, Joslyn G, Stevens J, Spirio L, Robertson M, Sargeant L, Krapcho K, Wolff E, Burt R, Hughes JP, Warrington J, McPerson J, Wasmuth J, Paslier DL, Abderrahim H, Cohen D, Leppert M and White R: Identification and characterization of the familial adenomatous polyposis. *Cell* 66: 589-600, 1991.
- 6) Fearon ER and Vogelstein B: A genetic model for colorectal tumorigenesis. *Cell* 61: 759-767, 1990.
- 7) 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  $\gamma$  ray induced mouse thymic lymphomas. *Biochem Biophys Res Comm* 301: 598-603, 2003.
- 8) Wakabayashi Y, Watababe 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. *Nat Immunol* 4: 533-539, 2003.
- 9) Kaminura K, Ohi H, Okazuka K, Yoshikai Y, Wakabayashi Y, Aoyagi Y, Mishima Y and Kominami R: Haploinsufficiency of *Bcl11b* for suppression of lymphomagenesis and thymocyte development. *Biochem. Biophys Res Commun* 355: 538-542, 2007.
- 10) Young J, Leggett B, Ward M, Thomas L, Buttenshaw R, Searle J and Chenevix-Trench G: Frequent loss of heterozygosity on chromosome 14 occurs in advanced colorectal carcinomas. *Oncogene* 8: 671-675, 1993.
- 11) Weber TK, Conroy J, Keitz B, Rodriguez-Bigas M, Petrelli NJ, Stoler DL, Anderson GR, Shows TB and Nowak NJ: Genome-wide allelotyping indicates increased loss of heterozygosity on 9p and 14q in early age of onset colorectal cancer. *Cytogenet Cell Genet* 86: 142-147, 1999.
- 12) Mao X, Hamoudi RA, Talbot IC and Baudis M: Allele-specific loss of heterozygosity in multiple colorectal adenomas: toward an integrated molecular cytogenetic map II. *Cancer Genet Cytogenet* 167: 1-14, 2006.
- 13) Wood LD, Parsons DW, Jones S, Lin J, Sjoblom T, Leary RJ, Shen D, Boca SM, Barber T, Ptak J, Silliman N, Szabo S, Dezso Z, Ustyanksky V, Nikolskaya T, Nikolsky Y, Karchin R, Wilson PA, Kaminker JS, Zhang Z, Croshaw R, Willis J, Dawson D, Shipitsin M, Willson JK, Sukumar S, Polyak K, Park BH, Pethiyagoda CL, Pant PV, Ballinger DG, Sparks AB, Hartigan J, Smith DR, Suh E, Papadopoulos N, Buckhaults P, Markowitz SD, Parmigiani G, Kinzler KW, Velculescu VE and Vogelstein B: The genomic landscapes of human breast and colorectal cancers. *Science* 318: 1108-1113, 2007.
- 14) Moser AR, Pitot HC and Dove WF: Adominant mutation that predisposes to multiple intestinal neoplasia in the mouse. *Science* 247: 322-324, 1990.
- 15) Moser AR, Luongo C, Gould KA, McNeley MK, Schoemaker AR and Dove WF: *ApcMin*: a mouse

- model for intestinal and mammary tumorigenesis. *Eur J Cancer* 31A: 1061 - 1064, 1995.
- 16) Boivin GP, Washington K, Yang K, Ward JM, Pretlow TP, Russell R, Besselsen DG, Godfrey VL, Doetschman T, Dove WF, Pitot HC, Halberg RB, Itzkowitz SH, Greden J and Coffey RJ: Pathology of mouse models of intestinal cancer: consensus report and recommendations. *Gastroenterology* 124: 762 - 777, 2003.
- 17) Lunogo C, Moser AR, Gledhill S and Dove WF: Loss of *APC*<sup>+</sup> in intestinal adenomas from Min Mice. *Cancer Research* 54: 5947 - 5952, 1994.
- 18) Petten CS, Gandara R, Mahida YR, Loeffler M and Wright NA: The stem cells of small intestinal crypts: where are they? *Cell Prolif.* 42: 731 - 750, 2009.
- 19) Barker N, van Es JH, Kuipers J, Kujala P, van den Born M, Cozijnsen M, Haegebarth A, Korving J, Begthel H, Peters PJ and Clevers H: Identification of stem cells in small intestine and colon by marker gene *Lgr5*. *Nature* 449: 1003 - 1007, 2007.
- 20) Marshman E, Booth C and Potten CS: The intestinal epithelial stem cell. *Bioessays* 24: 91 - 98, 2002.
- 21) Barker N, van de Wetering M and Clevers H: The intestinal stem cell. *Genes Dev* 22: 1856 - 1864, 2008.
- 22) Potten CS: Kinetics and possible regulation of crypt cell populations under normal and stress conditions. *Bull Cancer* 62: 419 - 430, 1975.
- 23) He XC, Zhang J, Tong WG, Tawfik O, Ross J, Scocville DH, Tian Q, Zeng X, He X, Wiedemann LM, Mishina Y and Li L: BMP signaling inhibits intestinal stem cell self-renewal through suppression of Wnt-beta-catenin signaling. *Nat Genet* 36: 1117 - 1121, 2004.
- 24) Batlle E, Henderson JT, Beghtel H, van den Born MM, Sancho E, Huls G, Meeldijk J, Robertson J, van de Wetering M, Pawson T and Clevers H:  $\beta$ -Catenin and TCF mediate cell positioning in the intestinal epithelium by controlling the expression of EphB/EphrinB. *Cell* 111: 251 - 263, 2002.
- 25) Rubinfeld B, Souza B, Albert I, Muller O, Chamberlain SH, Masiarz FR, Munemitsu S and Polakis P: Association of the APC gene product with beta-catenin. *Science* 262: 1731 - 1734, 1993.
- 26) Su LK, Vogelstein B and Kinzler KW: Association of the APC tumor suppressor protein with catenins. *Science* 262: 1734 - 1737, 1993.
- 27) Cadigan KM and Nusse R: Wnt signaling: a common theme in animal development. *Gene & Dev* 11: 3286 - 3305, 1997.
- 28) Kishida S, Yamamoto H, Ikeda S, Kishida M, Sakamoto I, Koyama S and Kikuchi A: Axin, a negative regulator of the wnt signaling pathway, directly interacts with adenomatous polyposis coli and regulates the stabilization of beta-catenin. *J Biol Chem* 273: 10823 - 10826, 1998.
- 29) Hinoi T, Yamamoto H, Kishida M, Takada S, Kishida S, Asashima M and Kikuchi A: Complex formation of adenomatous polyposis coli gene product and axin facilitates glycogen synthase kinase-3 beta-dependent phosphorylation of beta-catenin and downregulates beta-catenin. *J Biol Chem* 275: 34399 - 34406, 2000.
- 30) Albu DI, Feng D, Bhattacharya D, Jenkins NA, Copeland NG and Avram D: *BCL11B* is required for positive selection and survival of double-positive thymocytes. *J Exp Med* 204, 3003 - 3015, 2007.
- 31) Ikawa T, Hirose S, Masuda K, Kakugawa K, Satoh R, Shibano A, Kominami R, Katsura Y, and Kawamoto H: An essential developmental checkpoint for production of the T cell lineage. *Science* 329: 93 - 96, 2010.
- 32) Li L, Leid M and Rothenberg EV: An early T cell lineage commitment checkpoint dependent on the transcription factor *Bcl11b*. *Science* 329: 89 - 93, 2010.
- 33) Li P, Burke S, Wang J, Chen X, Ortiz M, Lee SC, Lu D, Campos L, Goulding D, Ng BL, Dougan G, Huntly B, Gottgens B, Jenkins NA, Copeland NG, Colucci F and Liu P: Reprogramming of T cells to natural killer-like cells upon *Bcl11b* deletion. *Science* 329: 85 - 89, 2010.

(平成22年12月20日受付)