

氏 名 (本籍)	たか 高	はし 橋	せい 成	いち 一
学位の種類	博 士 (医 学)			
学位記番号	医 博 第 1 4 4 7 号			
学位授与年月日	平 成 10 年 3 月 25 日			
学位授与の条件	学位規則第 4 条第 1 項該当			
研究科専攻	東北大学大学院医学系研究科 (博士課程) 内科学系専攻			
学位論文題目	遺伝性非ポリポーシス大腸癌のモデルマウス作成 と解析			

(主 査)

論文審査委員	教授 豊田 隆 謙	教授 金丸 龍之介
	教授 堀井 明	

# 論文内容要旨

## 【研究目的】

遺伝性非ポリポージス大腸癌 (hereditary non-polyposis colorectal cancer 以下 HNPCC と略す) は、欧米諸国において 200 人に 1 人が罹患していると考えられる常染色体優性の遺伝性疾患である。現在まで 4 つの原因遺伝子 (*hMLH1*, *hMSH2*, *hPMS1*, *hPMS2*) が同定され、それらは大腸菌のミスマッチ修復遺伝子のホモログであることが判明した。またいずれかの遺伝子に生殖細胞変異を持つ HNPCC 保因者は、50 歳未満で大腸癌や子宮体癌を高率に発症し、その腫瘍 DNA には特徴的なマイクロサテライトの不安定性が認められる。そこで、ミスマッチ修復機構とゲノムの不安定性及び発癌過程との関連を解明するため、ジーンターゲティング法により *Mlh1* 遺伝子欠損マウスを樹立し、その表現型を解析した。

## 【研究方法・結果】

*hMLH1* cDNA をプローブとし、マウスジェノミックライブラリーをスクリーニングして、*Mlh1* ジェノミッククローンを単離、制限酵素地図を作成した。次に *Mlh1* 遺伝子エクソン 16 を、選択マーカーの PGK-NEO-PolyA カセットで置き換え、選択マーカーの方向がセンス方向かアンチセンス方向かにより 2 種類のターゲティングベクターを構築し、電気穿孔法で ES 細胞へ導入後、サザンハイブリダイゼーションにて相同組み換え体を計 7 クローン同定した。さらに得られた相同組み換え体 ES 細胞を、microinjection 法で胚盤胞内へ注入しキメラマウスを作成、germline transmission を確認して、独立した 3 ラインの HNPCC モデルマウスを樹立した。また、*Mlh1* F1 ヘテロ接合変異体どうしの交配で、メンデルの法則に従って F2 が生まれ、発育・行動に差を認めなかったことから、*Mlh1* 遺伝子が発生・発達に必須ではないことが明らかにされた。一方、マウス胎仔由来繊維芽細胞株を用いた実験から、ホモ接合変異体では代謝阻害剤の 6-チオグアニンやアルキル化剤の MNNG に耐性を認め、ミスマッチ修復能が消失したヒト培養細胞で認める現象と同一であり、*Mlh1* 遺伝子ノックアウトによるミスマッチ修復能の欠損が強く示唆された。またマウスにおいて、*Mlh1* 欠損が造腫瘍性に関わるか否か、野生型・ヘテロ接合変異体・ホモ接合変異体を同一条件下に飼育し検討を行った。一年間の経過観察で、死亡あるいは危篤状態となり解剖を施行したマウスは、ホモ接合変異体 41 匹中 30 匹・73.2%であった。その内訳は重複した腫瘍もあるが、胸腺等のリンパ腫が 23 例・56.1%、消化管腫瘍が 11 例・26.8%、皮膚腫瘍が 6 例・14.7%であり、HNPCC の特徴である大腸腫瘍は 2 例認め、子宮体癌は観察されなかった。またこれらの腫瘍には、HNPCC と同様のマイクロサテライトの

不安定性が認められた。さらに *Mlh1* ホモ接合変異体は雌雄とも不妊であるが、共に配偶子形成過程の第一減数分裂中期において、ほとんどの染色体がキアズマを形成せず染色体数の異常が認められ、*Mlh1* 遺伝子が遺伝的組み換えに関与することが判明した。また、精子形成過程が第一減数分裂期で停止・変性していくのに対し、異常染色体を持つ卵子は受精可能で、2細胞期までは明らかな異常を指摘できなかった。しかし、4細胞期以後は極端に胞体のサイズが異なったり顆粒状に変性した細胞像が観察され、正常な形態の細胞は全く認めなかった。よって今後、雌雄の配偶子形成過程の違いについて更に研究が必要と考えられた。

## 【結 論】

*Mlh1* 遺伝子のターゲティングによって HNPCC のモデルマウスを樹立した。*Mlh1* ホモ接合変異体はメンデルの法則に従って生まれ、*Mlh1* 遺伝子が発生・発達に必須ではないことが明らかにされた。また、マウス胎仔由来繊維芽細胞株を用いた実験から、ホモ接合変異体では代謝阻害剤の6-チオグアニンやアルキル化剤の MNNG に耐性を認め、ミスマッチ修復能の欠損が強く示唆された。さらに *Mlh1* ホモ接合変異体には、リンパ腫や消化管腫瘍や皮膚腫瘍が発生し、それらの腫瘍には HNPCC と同様のマイクロサテライトの不安定性が認められ、*Mlh1* 遺伝子が造腫瘍性とゲノムの不安定性に関わることが確認された。また *Mlh1* ホモ接合変異体は雌雄とも不妊であるが、配偶子形成過程の第一減数分裂中期において、ほとんどの染色体がキアズマを形成せず染色体数の異常が認められ、*Mlh1* 遺伝子が遺伝的組み換えに関与することが判明した。

## 審査結果の要旨

本研究は、ミスマッチ修復機構とゲノムの不安定性及び発癌過程との関連を解明するため、ジーンターゲティング法により遺伝性非ポリポーシス大腸癌の原因遺伝子の一つ *hMLH1* 遺伝子のマウスホモログ *Mlh1* 遺伝子欠損マウスを樹立し、その表現型を解析したものである。ジーンターゲティング法は、既に確立された手法ではあるが、skillful な技術を必要とし、実験量も多くマウスの樹立まで至らないことがある。しかし、本研究では、ノックアウトマウスの作成のみならず詳細な解析が施行されており、一つのまとまった研究として内外に発表可能なものとなっている。例えば、現在まで *Msh2*, *Mlh1*, *Pms2* 各ミスマッチ修復遺伝子ノックアウトマウスが樹立され解析結果が発表されてきたが、ホモ接合変異体を一年間という長期にわたり経過観察し、発生する腫瘍について詳細に検討した報告はない。また上記のノックアウトマウスでは、消化管腫瘍の発生を認めておらず、本研究よってはじめて、マウスにおいても *Mlh1* 遺伝子が消化管腫瘍の発生に関与することが確認された。さらに、以前発表された *Mlh1* ノックアウトマウスでは、卵子形成過程の解析がなされておらず、ホモ接合変異体雌マウスの不妊の原因は不明であった。本研究ではじめて、受精前の卵子の染色体解析が施行され、卵子形成過程の第一減数分裂中期において、ほとんどの染色体がキアズマを形成せず染色体数に異常を来していることが確認された。また、後に Cre 酵素を用いて導入した変異を改変し、ヒトで認められた生殖細胞変異をマウスゲノム上で模倣しようという試みは、非常にユニークと思われ、今後の発展性が期待される。

以上から、時間と労力を惜しまず行われた本研究は、積極的に独創的な手法を取り入れ新たな知見を幾つか得ており、学位授与に値すると考えられる。