



The simultaneous induction of tumorigenesis and Cre-loxP recombination in mice

Sakahara, Mizuho

(Degree)

博士 (医学)

(Date of Degree)

2009-03-25

(Date of Publication)

2012-12-25

(Resource Type)

doctoral thesis

(Report Number)

甲4654

(URL)

<https://hdl.handle.net/20.500.14094/D1004654>

※ 当コンテンツは神戸大学の学術成果です。無断複製・不正使用等を禁じます。著作権法で認められている範囲内で、適切にご利用ください。



氏 名	坂原 瑞穂
博士の専攻分野の名称	博士（医学）
学 位 記 番 号	博い第 4654 号
学位授与の 要 件	学位規則第 5 条第 1 項該当
学位授与の 日 付	平成 21 年 3 月 25 日

【 学位論文題目 】

The simultaneous induction of tumorigenesis and Cre-loxP recombination in mice(腫瘍形成と Cre-loxP 組換えを同時に誘導するマウスの作製および解析)

審 査 委 員

主 査	教 授	南 康博
	教 授	片岡 徹
	教 授	寺島 俊雄

Rac1 は低分子量 G タンパク質 Rho ファミリーに属し、細胞骨格の再構築を介して細胞の運動や接着の制御に関与している。また、Rac1 は全身に発現しており、発生・発がんなどの高次機能においても重要な役割を担っていると考えられている。さらに、ヒト由来の肺転移性乳癌細胞株において活性型 Rac1 の発現が増加していることや、扁平上皮癌を誘導する細胞株に優性不能型 Rac1 を形質導入すると、SCID マウスの皮下に注射した時の腫瘍の増殖が抑制されることが報告されている。これらのことから、Rac1 の活性化が腫瘍の形成・増殖・浸潤に関与している可能性が示唆された。しかし、*in vivo* における腫瘍形成および転移における Rac1 の機能を解析するためのモデルが少なく、Rac1 の役割は不明であった。

本研究では、テトラサイクリン誘導系および Cre-*loxP* 組換え系を組み合わせることで、腫瘍形成と Cre 組換え酵素の発現を同一細胞で誘導できる新規のトランスジェニックマウス(MMTV-LTR-*tTA/mT-TRE-cre* Tg マウス)を作製した。この MMTV-LTR-*tTA/mT-TRE-cre* Tg マウスは、脂腺で発現するマウス乳癌ウィルス末端反復配列 (MMTV-LTR)プロモータの下流に、ドキシサイクリンの投与により転写活性を制御できるテトラサイクリン調節トランス活性化因子(*tTA*)を持つ外来遺伝子、および、*tTA* が特異的に結合する両方向性のテトラサイクリン応答因子(*TRE*)下に *cre* 遺伝子と腫瘍形成能を有するポリオーマウィルスミドル T 抗原遺伝子(*mT*)を結合した外来遺伝子を C57BL/6N マウス由来の受精卵に同時に注入して作製した。ドキシサイクリン非投与下では、脂腺で *tTA* が発現し、*tTA* が *TRE* に結合することにより *mT* による腫瘍形成と Cre 組換え酵素による *loxP* 部位での組換えが同一細胞で誘導される。

MMTV-LTR-*tTA/mT-TRE-cre* Tg マウスにどのような腫瘍が生じるかを解析するため、ドキシサイクリン非投与下で飼育した。その結果、生後 20 カ月齢までに全ての MMTV-LTR-*tTA/mT-TRE-cre* Tg マウスの腎部・脇腹・四肢の付け根等の皮下に腫瘍が生じた。生じた腫瘍の組織学解析を行った結果、上皮系細胞由来の腫瘍である毛嚢脂腺由来腫瘍および間葉系細胞由来の腫瘍である血管腫とリンパ管腫の 3 種類に分類された。

MMTV-LTR-*tTA/mT-TRE-cre* Tg マウスに生じた腫瘍がトランスジーンの発現によるものかを調べるため、非腫瘍部位および腫瘍部位から RNA を抽出し、RT-PCR 解析を行った。非腫瘍部の組織から抽出した RNA からは、トランスジーン(*tTA・mT・cre*)の産物は検出されなかった。一方、腫瘍部の組織から抽出した RNA からは、トランスジーン由来の mRNA を検出した。また、腫瘍細胞において Cre-*loxP* 組換えが生じているかを調べるため、MMTV-LTR-*tTA/mT-TRE-cre*/CAG-CAT-Z Tg マウスに生じた腫瘍の X-gal 染色を行った。その結果、毛嚢脂腺由来腫瘍および血管腫の一部で Cre-*loxP* 組換えが生じていることが確認できた。

MMTV-LTR プロモータ下に *mT* 遺伝子を結合した MMTV-LTR-*mT* Tg マウスは乳癌を生じ、高頻度に肺転移を生じることが報告されている。そこで、本研究で作製した MMTV-LTR-*tTA/mT-TRE-cre* Tg マウスに生じた腫瘍が転移能を有するかを調べた。その結果、毛嚢脂腺由来腫瘍を生じた MMTV-LTR-*tTA/mT-TRE-cre* Tg マウス(C57BL/6N 系統)14 匹中 2 匹では肺にも腫瘍が生じ、肺腫瘍部から抽出した RNA を用いた RT-PCR 解析の結果、トランスジーン由来の mRNA (*tTA・mT・cre*) が検出された。肺に生じた腫瘍が毛嚢脂腺由来腫瘍に由来するものかを調べるため、組織学解析を行った。肺に生じた腫瘍では、上皮細胞由来の腫瘍で観察される腺管構造など、毛嚢脂腺由来腫瘍に類似した組織形態を示した。また、表皮基底細胞のマーカーである抗ケラチン 14 抗体を用いた免疫組織化学染色を行った結果、肺の腫瘍部にも毛嚢脂腺由来腫瘍と同様にケラチン 14 陽性細胞が観察されたことから、肺に生じた腫瘍は、毛嚢脂腺由来腫瘍と類似した細胞から構成されていると考えられた。これらの結果から、毛嚢脂腺由来腫瘍が肺に転移した可能性が示唆された。

次に、*mT* による腫瘍形成および転移における Rac1 の関与を調べるため、*mT* 発現細胞で *rac1* 遺伝子欠損が生じる *rac1*^{fl^{ox}/+}; MMTV-LTR-*tTA/mT-TRE-cre* Tg マウスの腫瘍形成について解析した。カプラン-マイヤー解析ならびにログランク検定を用いて、腫瘍が触知可能になった日を比較した結果、*rac1* 遺伝子欠損が生じる Tg マウス(*rac1*^{fl^{ox}/+}; MMTV-LTR-*tTA/mT-TRE-cre* Tg マウス)

と *rac1* 遺伝子欠損が生じない Tg マウス (*rac1*^{+/+} or *rac1*^{flax/+}; MMTV-LTR-*tTA*/mT-TRE-*cre* Tg マウス)に有意な差は見られなかった。しかし、*rac1* 遺伝子欠損が生じない Tg マウスでは生じた腫瘍の半数を毛嚢脂腺由来腫瘍が占めたのに対し、*rac1* 遺伝子欠損が生じたマウスでは毛嚢脂腺由来腫瘍は生じた腫瘍の 23.8% (n = 5/21)であった。*rac1* 対立遺伝子の遺伝子型に関係なく、遺伝的背景が C57BL/6N 系統と 129/Ola 系統の雑種 MMTV-LTR-*tTA*/mT-TRE-*cre* Tg マウスでは、肺転移は生じなかった。これらの結果から、mT によって誘導される毛嚢脂腺由来腫瘍の形成に *Rac1* が関与している可能性が示唆された。

本研究で作製した MMTV-LTR-*tTA*/mT-TRE-*cre* Tg マウスでは、毛嚢脂腺由来腫瘍・血管腫・リンパ管腫が生じ、毛嚢脂腺由来腫瘍では肺転移が生じることが明らかとなった。また、腫瘍細胞で *Cre-loxP* 組換えを誘導することができた。この MMTV-LTR-*tTA*/mT-TRE-*cre* Tg マウスは、mT による腫瘍形成および転移における特定遺伝子の機能を解析するための有用なモデルマウスになると期待できる。

論文審査の結果の要旨

受付番号	甲 第 1991 号	氏 名	坂原 瑞穂
論文題目 Title of Dissertation	腫瘍形成と <i>Cre-loxP</i> 組換えを同時に誘導する マウスの作製および解析 The simultaneous induction of tumorigenesis and <i>Cre-loxP</i> recombination in mice		
審査委員 Examiner	主 査 南 康博 Chief Examiner 副 査 片岡 徹 Vice-examiner 副 査 寺島 俊雄 Vice-examiner		

(要旨は1, 000字～2, 000字程度)

Rac1 は低分子量 G タンパク質 Rho ファミリーに属し、細胞骨格再構築を介し細胞の運動や接着の制御に関与している。また、Rac1 は全身に発現し、発生・発がんなどの高次機能においても重要な役割を担っていると考えられている。さらに、ヒト由来の肺転移性乳癌細胞株において活性型 Rac1 の発現が増加していることや、扁平上皮癌を誘導する細胞株に優性不能型 Rac1 を形質導入すると、SCID マウスの皮下に注射した際、腫瘍の増殖が抑制されることが報告されている。これらから、Rac1 の活性化が腫瘍の形成・増殖・浸潤に関与する可能性が示唆されるが、 <i>in vivo</i> における腫瘍形成及び転移における Rac1 の機能を解析するためのモデルが少なく、Rac1 の役割は不明であった。
本研究では、テトラサイクリン誘導系及び Cre-loxP 組換え系を組み合わせることで、腫瘍形成と Cre 組換え酵素の発現を同一細胞で誘導できる新規トランスジェニックマウス(MMTV-LTR- <i>tTA</i> / <i>mT</i> -TRE- <i>cre</i> Tg マウス)を作製した。このトランスジェニックマウスは、脂腺で発現するマウス乳腺癌ウィルス末端反復配列 (MMTV-LTR)プロモータの下流に、ドキシサイクリンの投与により転写活性を制御できるテトラサイクリン調節トランス活性化因子(<i>tTA</i>)を持つ外来遺伝子、および、 <i>tTA</i> が特異的に結合する両方向性のテトラサイクリン応答因子(TRE)下に <i>cre</i> 遺伝子と腫瘍形成能を有するポリオーマウィルスミドル T 抗原遺伝子(<i>mT</i>)を結合した外来遺伝子を C57BL/6N マウス由来の受精卵に同時に注入して作製した。ドキシサイクリン非投与下では、脂腺で <i>tTA</i> が発現し、 <i>tTA</i> が TRE に結合することにより <i>mT</i> による腫瘍形成と Cre 組換え酵素による <i>loxP</i> 部位での組換えが同一細胞で誘導される。
MMTV-LTR- <i>tTA</i> / <i>mT</i> -TRE- <i>cre</i> Tg マウスにどのような腫瘍が生じるかを解析するため、ドキシサイクリン非投与下で飼育した。その結果、生後 20 カ月齢までに全ての MMTV-LTR- <i>tTA</i> / <i>mT</i> -TRE- <i>cre</i> Tg マウスの腎部・脳腹・四肢の付け根等の皮下に腫瘍が生じた。生じた腫瘍は上皮系由来である毛嚢脂腺由来腫瘍及び間葉系由来である血管腫とリンパ管腫の 3 種類に分類された。また、非腫瘍部位及び腫瘍部位から RNA を抽出し、RT-PCR 解析を行ったところ、非腫瘍部組織からは、トランスジーン(<i>tTA</i> ・ <i>mT</i> ・ <i>cre</i>)の産物は検出されなかったが、腫瘍部組織からはトランスジーン由来 mRNA が検出され、

毛嚢脂腺由来腫瘍および血管腫の一部で Cre-loxP 組換えが生じていることが確認できた。
また、MMTV-LTR- <i>tTA</i> / <i>mT</i> -TRE- <i>cre</i> Tg マウスに生じた腫瘍の転移能を検討したところ、毛嚢脂腺由来腫瘍を生じた Tg マウス(C57BL/6N 系統)14 匹中 2 匹では肺にも腫瘍が生じ、肺腫瘍部ではトランスジーン由来の mRNA (<i>tTA</i> ・ <i>mT</i> ・ <i>cre</i>) が検出された。また、肺に生じた腫瘍では、上皮由来の腫瘍で観察される腺管構造など毛嚢脂腺由来腫瘍に類似した組織形態が観察され、表皮基底細胞のマーカーであるケラチン 14 陽性細胞も観察されたことから、毛嚢脂腺由来腫瘍が肺に転移した可能性が示唆された。
次に、 <i>mT</i> による腫瘍形成及び転移における Rac1 の関与を調べるため、 <i>mT</i> 発現細胞で <i>rac1</i> 遺伝子欠損が生じる <i>rac1</i> ^{<i>fllox</i>} ; MMTV-LTR- <i>tTA</i> / <i>mT</i> -TRE- <i>cre</i> Tg マウスの腫瘍形成について解析した結果、 <i>rac1</i> 遺伝子欠損が生じる Tg マウスと <i>rac1</i> 遺伝子欠損が生じない Tg マウスに有意な差は見られなかった。しかし、 <i>rac1</i> 遺伝子欠損が生じない Tg マウスでは生じた腫瘍の半数を毛嚢脂腺由来腫瘍が占めたのに対し、 <i>rac1</i> 遺伝子欠損が生じたマウスでは毛嚢脂腺由来腫瘍は生じた腫瘍の 23.8%であった。 <i>rac1</i> 対立遺伝子の遺伝子型に関係なく、遺伝的背景が C57BL/6N 系統と 129/Ola 系統の雑種 Tg マウスでは、肺転移は生じなかったことから、 <i>mT</i> によって誘導される毛嚢脂腺由来腫瘍の形成に Rac1 が関与することが示唆された。
本研究は、MMTV-LTR- <i>tTA</i> / <i>mT</i> -TRE- <i>cre</i> Tg マウスを作製し、本 Tg マウスに生じる腫瘍及びその転移について研究したものであるが、従来知られていなかった本 Tg マウスにおける毛嚢脂腺由来腫瘍・血管腫・リンパ管腫の発生や毛嚢脂腺由来腫瘍での肺転移を明らかにし、また本 Tg マウスが <i>mT</i> による腫瘍形成・転移における特定遺伝子の機能解析のための有用なモデルになることを示したもので、重要な知見を得たものとして価値ある業績であると認める。よって本研究者は、博士 (医学) の学位を得る資格があるものと認める。