3. 遺 伝 性 腎 が ん ラ ッ ト

—— ヒ ト 結 節 性 硬 化 症 遺 伝 子 の 疾 患 モ デ ル ——

樋 野 興 夫

癌研究所 実験病理部

The Eker Rat, a Model of Human Tuberous Sclerosis (*TSC2*) Gene

Okio HINO

Department of Experimental Pathology, Cancer Institute

Summary

The Eker rat hereditary renal carcinoma (RC), originally reported by R. Eker in 1954, is an excellent example of a Mendelian dominant predisposition to a specific cancer in an experimental animal. We recently reported that a germline insertion in the rat homologue of the human tuberous sclerosis gene (*TSC2*) gives rise to dominantly inherited cancer in the Eker rat model, as well as a tumor suppressor nature for the *Tsc2* gene function. We also showed a strong conservation between the rat and human gene products. Tuberous sclerosis is an autosomal dominant genetic disease characterized by phacomatosis with manifestations that include mental retardation, seizures, and angiofibroma, although abortive types are more frequent. The phenotype in human differs from that in the Eker rat, except for the occurrence of RCs (in humans, angiomyolipomas are more common). Because nothing is known about molecular mechanism of human tuberous sclerosis, the Eker rat has great potential for elucidating the *TSC2* gene role in renal carcinogenesis, as well as studying species-specific differences in tumorigenesis and/or cell-type specific carcinogenesis.

緒 言

ラットには、いまだ病因遺伝子が解明されていないヒト疾患に類似した疾患モデルが多く存在している。しかし、ラットの遺伝解析は、甚だ不十分であった。そこで我々は、メンデルの法則に従い単一遺伝子による常染色体優性遺伝形式をとる遺伝性腎癌ラット (Eker rat) の原因遺伝子の単離、同定を目的として、まず、ラットゲノム地図の作成を試みた。我々は、リンケージ遺伝解析に必要な戻し交配ラットを短期間に効率よく作成する為に、まず最初にキャリアラットの短期検出の開発を試みた¹⁾。この開発の成功によりその後の研究が飛躍的に進んでいった。次に多数の DNA マーカー (cDNA, microdissection DNA, microsatellite DNA) を単離し、上記の方法で作成した多数の戻し交配ラットを用いて、原因遺伝子はラット染色体 10 番に局在することを明らかにした²⁾。そこでラット染色体 10 番の詳細なマッピングとそれに対応するヒト染色体の位置を決定した (ヒト染色体 17

番, 5 番, 16 番)³⁾。ラット染色体 10 番の詳細なマッピングは、ラット 10 番染色体に存在が予測されているヒトでは未知の他の病因遺伝子の単離にも貢献できるものと考ええる。我々は、さらに解析を進め、本ラット発見 40 年目にして、ついに原因遺伝子の同定に成功した。驚いたことに原因遺伝子は最近発見されたヒト結節性硬化症遺伝子 (*TSC2*) に相同なラットの遺伝子であった⁴⁾。また、本ラットには腎癌以外にも子宮腫瘍、脾臓腫瘍および下垂体腫瘍が高率に発生することが明らかになった^{5,6)}。ヒト結節性硬化症と Eker rat の表現型は、大きく違い overlap する病変として唯一腎癌があるのみである。本ラットは、*TSC2* 遺伝子機能異常による腎癌発生機序の解明の疾患モデルとして期待されるとともに、発癌において重要な問題である、species-specific difference および phenotype-specific mutation についても実験的に詳細に追求できる利点がある。

我々の最終目的は、疾患モデルからヒト疾患の診

断, 予防, 治療に資する知見を得ようとするものである。

実験材料と方法 & 実験成績

(1) 病因遺伝子キャリアーラットの短期検出法の確立

Eker rat は病因遺伝子がホモ接合体になると致死効果を示すため⁷⁾ 正常ラットと交配しヘテロ接合体の状態で維持し, 病因遺伝子を有するキャリアーラットであるか否かは, 1 年後に腎癌が発生するまで不明であるという, 繁殖継代上, 大きな難点を有して研究の進展を妨げていた。我々は病因遺伝子キャリアーラットは経胎盤発癌 [N-ethyl-N-nitrosourea (ENU), 80 mg/kg, i.p. 妊娠 15 日目] に高感受性であり生後 2 週という極く早期に肉眼的に成人型の腎腫瘍が観察されることを見出した。対照群のラットでは, 少なくとも生後 17 週まで腫瘍は認められなかった¹⁾。

(2) 戻し交配ラット [F₁(LE 系/BN 系)×BN 系] の短期作製法の開発

Eker rat は Long Evans (LE) 系で維持されている。多型性を多く得るために, 遺伝的にかけ離れている Brown Norway (BN) 系を用いて戻し交配ラット [F₁(LE 系/BN 系)×BN 系] を作成した。しかし遺伝的背景が BN 系となると LE 系に比して腫瘍発生時期が遅くなるので (modifier gene の存在) 戻し交配ラットを得るのに生後 1 年以上要する。そこで (1) の病因遺伝子キャリアーラットの短期検出法を用いて多数の戻し交配ラット [1 匹の F₁ (LE 系×BN 系; 雄)×BN 系; 雌 (ENU 投与)] を生後 12~13 週で作製した²⁾。

(3) マーカー DNA の作製

(a) rat kidney cDNA clones: 正常のラット腎臓より Zap-cDNA® Synthesis Kit (Stratagene 社) を用い cDNA ライブラリーを作製した。ベクターは Lambda ZAP® II を用いた。このライブラリーより 500 個のクローンを得た。LE 系と BN 系間での多型性の有無を 16 種類の制限酵素 (Ava I, BamHI, BglII, Cla I, EcoRI, EcoRV, HincII, HindIII, Kpn I, Msp I, Nco I, Pst I, PvuII, Rsa I, Tag I, Xba I) で調べた。現在までに 102 個のクローン [4 個は同一のクローン (102-4=98), 98 個のうち 14 個は repeated sequences (98-14=84)] の解析を終え, 54 個 (64%=54/84) の cDNA clones が 2 種間で多型性を示すことがわかった。多型性を示す cDNA についてはラット染色体の局在をラット-

マウス ハイブリッドパネル (Dr. Levan より提供) を用いて決定した。今回, cDNA clones は 2 種間でさえ高い多型性を示すことがわかり rat genome mapping にとって有用であることが確認された⁸⁾。

(b) subtracted cDNA clones: 遺伝性ラット腎癌細胞と正常ラット腎臓間での cDNA subtraction を Representational Difference Analysis (RDA) の変法を開発し行った⁹⁾。正常腎臓で発現している腎癌細胞では発現していない (下記の如く本ラットの原因遺伝子は癌抑制遺伝子であるので) 31 個の cDNA clones を単離し, 更に塩基配列を決定した。うち 11 個は未知の遺伝子であった (Kobayashi, T. et al., manuscript in preparation)。

(c) ラット 10 番染色体の microdissection clones: 正常ラット胎児の培養細胞からラット 10 番染色体の q12 領域を顕微鏡下で切断し PCR 法でその DNA 断片を増やし pBluescript SK(+) ベクターに cloning を行った (長崎大学の新川教授の協力)。現在までに 39 個のラット 10 番染色体由来のユニークな clone が得られている¹⁰⁾。

(d) microsatellite マーカー: 新たにラット 10 番染色体由来の microsatellite マーカーである primer DNA を合成した。

(4) リンケージ解析

(2) の戻し交配ラット 129 匹と (3) の多数の多型性 DNA マーカーを用いてリンケージ解析を行い原因遺伝子 (ラット 10 番染色体; ヒト染色体 16p13.3 に相同な部位) は *TSC2* に相同なラットの原因遺伝子に強くリンクしていることを見出した³⁾。

(5) 原因遺伝子は癌抑制遺伝子である

F₁ ラットに発生した腎癌はもとより, ごく初期の前癌病変である変異尿管管においても Knudson の “2 hit” が確認され, *Tsc2* 遺伝子不活性化は, 癌化の rate limiting step であることが示唆された^{11,12)}。これは, 細胞レベルでは原因遺伝子の機能は, recessive であり, 原因遺伝子は癌抑制遺伝子であることを示す。

(6) 新しい Cancer Syndrome の疾患モデル

Eker rat は, 名前が示す如く, 腎癌を起こすラットとして発見された。しかし, このラットを 2 年間長期観察したところ, 下垂体, 脾臓, 子宮にも腫瘍が non-carrier のラットに比して高率に見られた^{5,6)}。それらの腫瘍においてもラット 10 番染色体の LOH が観察された¹³⁾。新しい cancer syndrome の疾患モデル

ルとして期待される (ちなみにヒトで、腎癌を合併する cancer syndrome としては、von Hippel-Lindau (VHL) disease, tuberous sclerosis (TSC) が知られている。興味あることに VHL, TSC とともに母斑症 (Phakomatosis) である。

本ラット腎癌には、VHL 遺伝子の変異は認められなかった¹⁴⁾。さらに、Eker rat 腫瘍において micro-satellite instability は確認されなかった¹⁵⁾。

(7) 原因遺伝子の構造解析

我々は、Tsc2 遺伝子の全構造を決定した。genomic DNA の size は約 35 kb であり、coding exon は 41 個もあった。ラット Tsc2 産物はヒト TSC2 産物と全長にわたって約 92% の高い相同性を示すことを見出した。興味あることに、alternative splicing が exons 25 and 31 に見られた。Eker mutation は intron 30 への retrotransposon 挿入による¹⁶⁾。さらに、non-coding exon の存在も見い出している (Kobayashi, T. et al., submitted)。exon-intron の構造解析を行い全遺伝子をカバーする PCR-SSCP 法の primer を多数作成し loss of heterozygosity (LOH) の見られない症例で intragenic mutation を見出した。これは、Knudson's two-hits を証明するものである (Kobayashi, T. et al., submitted)。

(8) 原因遺伝子の機能解析

Tsc2 遺伝子機能として我々は、転写活性を見出した。また抗体を作成し細胞内局在に関して興味ある知見を得ている¹⁷⁾。さらに wild-type Tsc2 遺伝子導入腎癌細胞で増殖および形態に変化が観察されている¹⁸⁾。我々は、現在腎癌発生機序解明をめざしている¹⁹⁾。

総括と考案

遺伝性腎癌ラットは、1954 年ノルウェーの Eker によって発見され、腎癌発生は、Mendel の法則に従い、単一遺伝子による常染色体優性遺伝形式をとる。我々は、本ラットの発癌機構を解明すべく positional cloning 法によって原因遺伝子の単離・同定をめざした。ついに我々は、Tsc2 遺伝子にレトロトランスポゾン挿入による germline mutation を見出し Eker rat 発見 40 年目に於て原因遺伝子の同定に成功した⁴⁾。

ここに Eker rat は、現在全く不明である、多彩な症状を示すヒト結節性硬化症 (最近 5800 人に 1 人の出生率との報告があり比較的頻度の高い難病) の発症機序解明および治療、予防の開発の疾患モデルとし

て、新しい展開を迎えることとなった。

文 献

- 1) Hino, O., Mitani, H. and Knudson, A.G.: *Cancer Res.*, **53**, 5856 (1993)
- 2) Hino, O., Mitani, H., Nishizawa, M., Katsuyama, H., Kobayashi, E. and Hirayama, Y.: *Jpn. J. Cancer Res.*, **84**, 1106 (1993)
- 3) Hino, O., Kobayashi, T., Kobayashi, E., Tsuchiya, H. and Hirayama, Y.: *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **203**, 1302 (1994)
- 4) Kobayashi, T., Hirayama, Y., Kobayashi, E., Kubo, Y. and Hino, O.: *Nature Genetics*, **9**, 70 (1995)
- 5) Hino, O., Mitani, H., Katsuyama, H. and Kubo, Y.: *Cancer Lett.*, **83**, 117 (1994)
- 6) Hino, O., Kobayashi, T., Mitani, H., Kobayashi, E., Kubo, Y., Tsuchiya, H., Kikuchi, Y., Nishizawa, M. and Hirayama, Y.: *Transplantation Proceedings*, **27**, 1529 (1995)
- 7) Hino, O., Klein-Szanto, A.J.P., Freed, J.J., Testa, J.R., Brown, D.Q., Vilensky, M., Yeung, R.S., Tartof, K.D. and Knudson, A.G.: *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **90**, 327 (1993)
- 8) Hino, O., Kobayashi, E., Kobayashi, T., Klinga-Levan, K. and Levan, G.: *Rat Genome*, **2**, 6 (1996)
- 9) Tsuchiya, H., Tsuchiya, Y., Kobayashi, T., Kikuchi, Y. and Hino, O.: *Jpn. J. Cancer Res.*, **85**, 1099 (1994)
- 10) Kobayashi, T., Kawaguchi, T., Kishino, T., Matsumoto, N., Niikawa, N., Mori, M., Levan, G., Klinga-Levan, K. and Hino, O.: *Mammalian Genome*, **6**, 216 (1995)
- 11) Kubo, Y., Mitani, H. and Hino, O.: *Cancer Res.*, **54**, 2633 (1994)
- 12) Kubo, Y., Klimek, F., Kikuchi, Y., Banasch, P. and Hino, O.: *Cancer Res.*, **55**, 989 (1995)
- 13) Kubo, Y., Kikuchi, Y., Mitani, H., Kobayashi, E., Kobayashi, T. and Hino, O.: *Jpn. J. Cancer Res.*, **86**, 828 (1995)
- 14) Kikuchi, Y., Kobayashi, E., Nishizawa, M., Hamazaki, S., Okada, S. and Hino, O.: *Jpn. J. Cancer Res.*, **86**, 905 (1995)
- 15) Hino, O., Kobayashi, E., Hirayama, Y., Kobayashi, T., Kubo, Y., Tsuchiya, H., Kikuchi, Y. and Mitani, H.: *Molecular Carcinogenesis*, **14**, 23 (1995)
- 16) Kobayashi, T., Nishizawa, M., Hirayama, Y., Kobayashi, E. and Hino, O.: *Nucleic Acids Res.*, **23**, 2608 (1995)

- 17) Tsuchiya, H., Orimoto, K., Kobayashi, T.
and Hino, O. : *Cancer Res.*, **56**, 429 (1996)
- 18) Orimoto, K., Tsuchiya, H., Kobayashi, T.,
Matsuda, T. and Hino, O. : *Biochem. Bio-*
phys. Res. Commun., **219**, 70 (1996)
- 19) Hino, O., Kobayashi, E., Nishizawa, M.,
Kubo, Y., Kobayashi, T., Hirayama, Y.,
Takai, S., Kikuchi, Y., Tsuchiya, H.,
Orimoto, K., Kajino, K., Takahara, T. and
Mitani, H. : *J. Cancer Res. Clin. Oncol.*, **121**,
602 (1995)