

(別紙様式 12)

マウス腫瘍における Igf2 遺伝子の
発現と LOI の解析

(10670191)

平成 10 年度～平成 11 年度科学研究費補助金 (基盤研究(C)(2)) 研究成果報告書

平成 12 年 3 月

研究代表者 小 川 勝 洋
(旭川医科大学医学部教授)

は し が き

研究組織

研究代表者 : 小川 勝洋 (旭川医科大学医学部教授)

研究分担者 : 吉江 真澄 (旭川医科大学医学部助手)

研究分担者 : 小幡 雅彦 (旭川医科大学医学部助手)

研究経費

平成10年度 2,900千円

平成11年度 900千円

計 3,800千円

研究発表

(1) 学会誌等

Masahiko Obata, Gang-Hong Lee, Hiroaki Kanda, Tomoyuki Kitagawa and Katsuhiko Ogawa. Loss of heterozygosity at loci on chromosome 4, a common genetic event during the spontaneous immortalization of mouse embryonic fibroblasts. *Mol. Carcinog.* 19: 17-24, 1997

Gang-Hong Lee, James M. Bugni, Masahiko Obata, Hiroyuki Nishimori, Katsuhiko Ogawa and Norman R. Drinkwater. Genetic dissection of susceptibility to murine ovarian teratomas that originate from parthenogenetic oocytes. *Cancer Res.* 57: 590-593, 1997

Makoto Osanai, Katsuhiko Ogawa, Gang-Hong Lee. Phenobarbital causes apoptosis in conditionally immortalized hepatocytes depending on deregulated *c-myc* expression: characterization of an unexpected effect. *Cancer Res.* 57: 2896-2903, 1997

Hidenori Karasaki, Masahiko Obata, Katsuhiko Ogawa and Gang-Hong Lee. Roles of the *Pas1* and *Par2* genes in determination of the unique, intermediate susceptibility of BALB/cByJ mice to urethane-induction of lung carcinogenesis: Differential effects on tumor multiplicity, size and *Kras2* mutations. *Oncogene* 15: 1833-1840, 1997

Nobuyuki Shiojiri, Hirokazu Imai, Shinya Goto, Tomoaki Ohta, Katsuhiko Ogawa and Masataka Mori. Mosaic pattern of ornithine transcarbamylase expression in *spf-ash* mouse liver. *Am. J. Pathol.* 151: 413-421, 1997

Nobuyoshi Shiojiri, Tomoaki Ohta, Katsuhiko Ogawa and Rolf Bhardt. Complementary expression of glutamine synthetase and carbamoylphosphate synthetase I in ornithine carbamoyltransferase-deficient mouse liver (*spf-ash* mouse). *Histochem. Cell Biol.* 108: 489-494, 1997

Akihiko Yokoyama, Hidenori Karasaki, Noriko Urushibara, Ken Nomoto, Yoko Imai, Koji Nakamura, Yusuke Mizuno, Katsuhiko Ogawa and Kunimi Kikuchi. The characteristic gene expression of MAPK phosphatases 1 and 2 in hepatocarcinogenesis, rat ascites hepatoma cells, and regenerating rat liver. *Biochem. Biophys. Res. Comm.* 239: 746-751, 1997

Mitsuhiro Inagaki, Shinichi Kasai, Michio Mito and Katsuhiko Ogawa. Expression of chloramphenicol acetyl transferase activity in the spleen after transplantation of hepatocytes transfected with pSV2CAT plasmid by electroporation. *Transplantation Proc.* 29: 2214-2215, 1997

Satoshi Tanno, Ikue Fukuda, Yoshinori Saito and Katsuhiko Ogawa. Prohibitin expression is decreased in the regenerating liver but not in chemically-induced hepatic tumors in rats. *Jpn. J. Cancer Res.* 88: 1155-1164, 1997

Noriko Urushibara, Hidenori Karasaki, Koji Nakamura, Yusuke Mizuno, Katsuhiko Ogawa and Kunimi Kikuchi. The selective reduction in PTP σ expression in hepatomas. *Int. J. Oncol* 12: 603-607, 1998

Masumi Yoshie, Hiroyuki Nishimori, Gang-Hong Lee and Katsuhiko Ogawa. High colony forming capacity of primary cultured hepatocytes as a dominant trait in hepatocarcinogenesis-susceptible and resistant mouse strains. *Carcinogenesis* 19: 1103-1107, 1998

Takao Ooasa, Hidenori Karasaki, Hiroaki Kanda, Kimie Nomura, Tomoyuki Kitagawa and Katsuhiko Ogawa. Loss of imprinting of the insulin-like growth factor II gene in mouse hepatocellular carcinoma cell lines. *Mol. Carcinog.* 22: 248-253, 1998

小川勝洋、李 康弘

実験的肝発癌、「肝臓病学 Basic Science」、戸田剛太郎 他編・医学書院 pp. 780-792, 1998

Hironori Ikebukuro, Mitsuhiro Inagaki, Michiro Mito, Shinichi Kasai, Katsuhiko Ogawa and Masumi Nozawa. Prolonged function of hepatocytes transplanted into the spleens of Nagase analbuminemic rats. *Eur. Surg. Res.* 31: 39-47, 1999

Katsuhiko Ogawa, Yoshihisa Yamada, Kan Kishibe, Kenichi Ishizaki and Yoshihiko Tokusashi. β -catenin mutations are frequent in hepatocellular carcinomas but absent in adenomas induced by diethylnitrosamine in B6C3F1 mice. *Cancer Res.* 59: 1830-1833, 1999

Katsuhiko Ogawa, Makoto Osanai, Masahiko Obata, Kenichi Ishizaki and Kenji Kamiya. Gain of chromosomes 15 and 19 is frequent in both mouse hepatocellular carcinoma cell lines and primary tumors, but loss of chromosomes 4 and 12 is detected only in the cell lines. *Carcinogenesis* 20: 99-108, 1999

Yoshihisa Yamada, Hidenori Karasaki, Kouji Matsushima, Gang-Hong Lee and Katsuhiko Ogawa. Expression of an IL-1 receptor antagonist during mouse hepatocarcinogenesis demonstrated by differential display analysis. *Lab. Invest.* 79: 1059-1067, 1999

小川勝洋

実験的肝発癌：オートクライン機能の活性化と肝発癌

「病理と臨床」臨時増刊号 日本人の病気と病理学・文光堂 17: 329, 1999

Kenichi Ishizaki and Katsuhiko Ogawa. Fine mapping of smallest common regions of deletion on chromosome 12 in liver epithelial and hepatocellular carcinoma cell lines from B6C3F1 and C3B6F1 mice. *Int. J. Cancer* (in press)

(2) 口頭発表

吉江真澄

マウス肝細胞のコロニー形成能の遺伝学的特性

平成9年度病理研究クラブ (1997 6/27-28, 徳島)

Masumi Yoshie, Hiroyuki Nishimori, Gang-Hong Lee, Katsuhiko Ogawa

High colony forming capacity of cultured hepatocytes as a dominant trait in C3H/HeJ, C57BL/6J and DBA/2J mice.

88th Annual Meeting of American Association for Cancer Research (1997 4/12-16, San Diego, CA, USA)

吉江真澄、西森博幸、李 康弘、小川勝洋

培養マウス肝細胞のコロニー形成能と遺伝学的背景

第86回日本病理学会総会 (1997 6/3-5, 札幌)

小山内誠、李 康弘、小川勝洋

c-myc 高発現マウス不死化肝細胞株におけるフェノバルビタール誘導アポトーシスの機序と活性化 c-H-ras によるアポトーシスの抑制

第86回日本病理学会総会 (1997 6/3-5, 札幌)

小川勝洋、神谷研二、小山内誠、小幡雅彦

マウス肝癌及び肝癌細胞株における染色体・LOH解析

第56回日本癌学会総会 (1997 9/25-27, 京都)

吉田行範、小山内誠、李 康弘、小川勝洋

マウス培養肝細胞におけるH-ras活性化と紫外線耐性

第56回日本癌学会総会 (1997 9/25-27, 京都)

吉江真澄、西森博幸、李 康弘、小川勝洋

マウス初代培養肝細胞におけるコロニー形成能の系統差と細胞死・増殖能の関係

第56回日本癌学会総会 (1997 9/25-27, 京都)

漆原範子、唐崎秀則、中村恒史、水野佑亮、小川勝洋、菊池九二三

肝癌組織におけるPTP δ mRNAの特異的発現低下

第56回日本癌学会総会 (1997 9/25-27, 京都)

中村恒史、横山明彦、唐崎秀則、漆原範子、水野佑亮、小川勝洋、 菊池九二三

MAP kinase phosphatase遺伝子発現の肝癌における癌性変異

第56回日本癌学会総会 (1997 9/25-27, 京都)

唐崎秀則、吉江真澄、小川勝洋

Differential displayによるマウス肝癌で特異的に発現する遺伝子の解析

第20回 日本分子生物学会 (1997 12/15-19, 京都)

山田 能久、唐崎 秀則、岸部 幹、吉江 真澄、李 康弘、小川 勝洋

マウス肝発癌に伴う遺伝子発現の変化の検討—IL-1 receptor antagonist (IL-1ra)の高発現—

第32回 日本肝臓学会東部会 (1998 12/3~4, 札幌)、 シンポジウム「治療学へ向けての肝病態解明の基礎研究」

Katsuhiko Ogawa, Makoto Osanai, Masahiko Obata, Kenji Kamiya, Kenichi Ishizaki

Chromosomal alterations and allelotype changes in mouse hepatocellular carcinoma cell lines and primary tumors.

89th Annual Meeting of American Association for Cancer Research (1998 3/28-4/1, New Orleans, LA, USA) Proc. Am. Assoc. Cancer Res. 39:632, 1998

大浅 貴朗、唐崎 秀則、神田 浩明、野村 起美恵、北川 知行、小川 勝洋

マウス不死化肝細胞及び肝癌細胞における Igf II の発現

第 87 回日本病理学会総会 (1998 4/14-16, 広島)

石崎 賢一、小川 勝洋

マウス正常肝細胞及び肝癌に由来する細胞株の LOH 解析

第 87 回日本病理学会総会 (1998 4/14-16, 広島)

吉田 行範、小川 勝洋

メチル化特異的 PCR によるマウス培養肝細胞株と肝癌細胞の $p16^{INK4a}$ 遺伝子のメチル化の検討

第 87 回日本病理学会総会 (1998 4/14-16, 広島)

山田 能久、唐崎 秀則、吉江 真澄、李 康弘、小川 勝洋

IL-1 receptor antagonist (IL-1ra)のマウス肝癌における高発現

第57回日本癌学会総会 (1998 9/30-10/2, 横浜)

吉田 行範、安田 淳美、小川 勝洋

マウス肝癌および正常肝、肝癌由来細胞株における $p16^{INK4a}$ プロモーター領域のメチル化の検討

第57回日本癌学会総会 (1998 9/30-10/2, 横浜)

小幡 雅彦、小川 勝洋

マウス不死化線維芽細胞株における $p16^{INK4a}$ 、 $p19^{ARF}$ 発現の検討

第57回日本癌学会総会 (1998 9/30-10/2, 横浜)

石崎 賢一、小川 勝洋

マウス正常肝細胞及び肝癌に由来する細胞株のLOH解析
第57回日本癌学会総会 (1998 9/30-10/2, 横浜)

岸部 幹

マウス肝癌における遺伝子発現異常の解析
哺乳動物遺伝学研究会 (1999 6/7~8, 木更津)

Yoshihisa Yamada, Hidenori Karasaki, Kan Kishibe, Masumi Yoshie, G-H Lee, and Katsuhiko Ogawa.
Expression of an IL-1 receptor antagonist during mouse hepatocarcinogenesis demonstrated by
differential display analysis.

90th Annual Meeting of American Association for Cancer Research (1999 4/10-4/14, Philadelphia, PA,
USA) Proc. Am. Assoc. Cancer Res. 40:177, 1999

岸部 幹、山田 能久、小川 勝洋

Microarray 法によるマウス肝癌における遺伝子発現異常の検討
第 88 回日本病理学会総会 (1999 4/6-8, 東京)

島 礼、中村 恒史、小川 勝洋、菊池 九二三

ラット肝癌におけるプロテインホスファターゼの癌性変異とその意義
第58回日本癌学会総会 (1999 9/29-10/1, 広島)

山田 能久、岸部 幹、小川 勝洋

LPS肝障害作用に対するマウス肝前癌結節細胞の高感受性
第58回日本癌学会総会 (1999 9/29-10/1, 広島)

岸部 幹、山田 能久、小川 勝洋

マウス肝癌におけるSm22 homologueの高発現
第58回日本癌学会総会 (1999 9/29-10/1, 広島)

小幡 雅彦、後藤 順一、小川 勝洋

過酸化水素による細胞老化誘導モデルと不死化関連遺伝子解析への応用
第58回日本癌学会総会 (1999 9/29-10/1, 広島)

小川 勝洋、山田 能久、岸部 幹、後藤 順一、小幡 雅彦、石崎 賢一、徳差 良彦

マウス肝発癌過程における β -catenin遺伝子変異
第58回日本癌学会総会 (1999 9/29-10/1, 広島)

澤田 成朗、村上 孝司、山浦 剛、吉江 真澄、坂本 隆、小川 勝洋、塚田 一博、済木 育夫

マウス肝腫瘍を用いた肝内転移モデルの作製とその機序解析
第58回日本癌学会総会 (1999 9/29-10/1, 広島)

研 究 成 績

〔研究目的〕

Igf2 遺伝子はマウスでは胎生期にはほぼ全ての臓器に発現しているが、生後は脳の一部を除いて速やかに消失する。一方、マウスの発癌過程ではしばしば Igf2 遺伝子の発現が早期から見られることや、臓器特異的に Igf2 を発現するトランスジェニックマウスではその臓器に腫瘍が発生することが知られている。したがって、Igf2 の発現はマウスの多段階発癌の重要な event の一つと考えられ、autocrine growth factor として腫瘍の増殖に関わるものと思われる。一方、Igf2 遺伝子は imprinting gene であり、正常組織では父親由来の遺伝子のみが発現する。また、マウス Igf2 遺伝子は 6 個の exon から成り、exon1,2,3 の上流に存在する転写開始点から転写され、exon1,2,3 のいずれかと exon4-6 を共通に含む 3 種類の mRNA が生成されることが知られている。

本研究ではマウス肝癌、脳腫瘍を用いて発癌過程における Igf2 遺伝子の活性化のメカニズムを検討する。具体的には ① MSM、C3H、Balb/c マウスの間での Igf2 の遺伝子多型を利用してこれらの F1 hybrid の腫瘍について allele specific な Igf2 の発現を検討する。② 各々の腫瘍について Igf2 mRNA の転写開始点を調べ、正常の発生過程と比較する。③ Igf2 exon 1 上流約 5kb 領域に存在する CpG island は paternal allele と maternal allele でメチル化の状態が異なることから、genomic imprinting に関係していると考えられている。この領域の paternal, maternal allele のメチル化状態を NaHSO₄ を用いた methylation specific PCR-DNA sequencing により、正常組織と腫瘍について比較する。

〔研究計画・方法〕

平成 10 年度計画

- (1) MSM x C3HF1、C3H x MSMF1 マウスを胎生期、新生児期、成熟期の各成長段階に屠殺し、脳、肝などの様々な組織を摘出して triazol 法により RNA を抽出する。この RNA を用いて RT-PCR により Igf2 cDNA を増幅し、exon 1, 2, 3 の発現及び allele 特異的発現について検討し、発生過程での Igf2 の発現の特性を明らかにする。RT-PCR は現有の機械を使って用ない、電気泳動は既存の装置及び申請のシーケンシング装置を用いて行う。
- (2) 上記 hybrid mice 由来の多数の肝癌細胞株、正常肝細胞株、初代培養肝細胞を用いて Igf2 mRNA の発現及び promoter の活性化及び imprinting 状態について RT-PCR 法により解析する。また、Western blotting により Igf2 蛋白の発現量が loss of imprinting に伴って増加するか否かを検討する。

- (3) 正常組織では Igf2 exon 1 の約 5kb 上流に存在する CpG island では paternal allele が特異的にメチル化していることが知られている。この領域の MSM と C3H で polymorphism を示す部位に PCR primer を作製する。各試料より DNA を抽出し、NaHSO₄ 処理・非処理 DNA について非処理 DNA 特異的、非メチル化 DNA 特異的、メチル DNA 特異的に作製した PCR primer を用いて paternal、maternal allele のメチル化状態を比較する。

平成 11 年度

- (1) MSM と C3H の F1 マウス及び C3H と Balb/c の F1 マウスに ethylnitrosourea により脳腫瘍を、diethylnitrosamine により肝癌を誘発する。発癌過程の様々な時期に腫瘍を摘出し、Igf2 の発現、promoter 活性、imprinting について上記と同様の方法で検討する。脳腫瘍を誘発するマウスは、p53(-/-)の遺伝子背景をもつものを用いる。

〔結果〕

方法と結果

- (1) C3H、MSM、Balb/c マウスの Igf2 exon 6 の CA repeat を含む領域の塩基配列を比較したところ、C3H と MSM で 4 base、C3H と Balb/c で 12 base の違いがあることを見いだした。この polymorphism を利用して、RT-PCR にて F1 hybrid マウスの胎児、新生児、成熟期での Igf2 の allele 特異的発現を調べたところ、肝臓では胎児期、新生児期に父親の allele のみ発現していたのに対して、脳では胎児期から成熟期を通して bi-allelic に発現していた。
- (2) Igf2 の allele 特異的発現を初代培養正常肝細胞、正常肝由来不死化細胞、肝癌細胞株について検討したところ、いずれも Igf2 の発現が見られ、また、初代及び不死化細胞では imprinting が維持されていたのに対して、肝癌細胞株では多くに LOI が認められた。
- (3) 上記の細胞について Igf2 mRNA の転写開始点を比較した。その結果、肝癌細胞では P1、P2、P3 のいずれの発現も見られたが、初代細胞及び不死化細胞では P2、P3 のみが発現していた。
- (4) LOI(+)と LOI(-)肝癌細胞で Western blotting により Igf2 蛋白の発現量を比較したところ、両者で明らかながいはみられなかった。
- (5) MSM と C3H 又は C3H と Balb/c の F1 hybrid マウスに胎児期又は新生児期に ethylnitrosourea (ENU)又は diethylnitrosamine (DEN)を投与して肝及び乳腺腫瘍を誘発した。これらの腫瘍ではいずれも Igf2 の発現が見られたが、LOI は認められなかった。

(6) Balb/c、C3H、MSM の Igf2 5' non-coding 領域の塩基配列を比較して一塩基の polymorphism を見い出した。そこで、Balb/c ×C3H F1、C3H×MSM F1 マウスの DNA を用いて sodium bisulfite PCR ののち TA クローニングを行い methylation specific DNA sequencing を行った。その結果、この領域では paternal allele に特異的に CpG の methylation が起っていることが判明した。

〔総括と反省〕

マウス初代培養正常肝細胞、不死化肝細胞及び肝癌細胞では Igf2 が高頻度発現することが明らかになった。しかも、肝癌細胞では Igf2 の imprinting が失われて bi-allelic に発現するが、この現象は in vivo の腫瘍では見られず、細胞株の樹立に伴って起ると考えられた。また、肝癌細胞では転写開始点が P1、P2、P3 のいずれも利用されていたのに対して、正常及び不死化細胞では P2、P3 のみであったことから、癌化に伴って転写調節が変化することが示唆された。また、LOI の有無と Igf2 蛋白の発現量には相関は見られないことから、imprinting の維持と遺伝子発現の調節メカニズムは異なるものと考えられた。Igf2 の imprinting には Igf2 の下流に存在する H19 遺伝子が cis 又は trans に関わってことが示唆されている。また、H19 の promoter 領域の paternal allele 特異的メチル化は Igf2 の imprinting 維持に関っていることが示唆されているため、Igf2 LOI と H19 の allele specific methylation の関係について解析を進めている。

一方、Igf2 の imprinting には Igf2 遺伝子そのものの methylation も関係する可能性があり、この点についての検討も行った。これについてはまず Balb/c、C3H、MSM の間で Igf2 5'領域の polymorphism を検出し、polymorphic base を含む領域の methylation specific DNA sequencing を行い paternal allele に特異的な CpG メチル化を見い出した。この方法を用いて現在、肝癌細胞で LOI の有無と differential methylation との関係解析中である。また、今回は p53 ノックアウトマウスの入手が遅れたため脳腫瘍について Igf2 の発現を調べ得なかったが、この点については現在材料を準備中である。