

ポリコム遺伝子群 *mel-18* のハプロインサフィシエンシーによるマウスの腫瘍原生獲得機構の解析

木 村 ま り

広島大学医学部免疫学・寄生虫学講座 (主任: 菅野雅元教授)

受付 平成13年11月30日

受理 平成14年1月25日

ポリコム遺伝子群は, ショウジョウバエでホメオボックス遺伝子群の負の制御因子として同定された。その遺伝子産物は核内でタンパク質複合体を形成し, 標的遺伝子の転写が抑制されるヘテロクロマチンの維持 (クロマチンサイレンシング) に寄与している。哺乳類ホモログの *mel-18* のノックアウトマウスは, 体の前後軸形成異常, リンパ球の細胞周期異常による重篤な免疫不全を呈した。*mel-18* は細胞死も制御しており, 細胞周期, 細胞死双方への関与より, 癌との関連が予想された。*mel-18* 発現の低下した NIH3T3 細胞は腫瘍形質を獲得し, *in vitro* では癌抑制の活性が確認されたが, *mel-18* 欠損マウスは生後3~4週間で死亡するため, 生体レベルでの証明は不可能であった。

近年 *mel-18* ヘテロ接合性マウスに乳癌を中心とする腺癌の発生が認められた。腫瘍の残存 *mel-18* 遺伝子座には, 変異, 欠失は認められなかった。Mel-18 タンパク質は核内で他のポリコムタンパク質等と複合体を形成するが, *mel-18*^{+/-}マウスの臓器ではこの複合体が消失していた。抗 Mel-18 抗体を用いた蛍光免疫染色では, 野生型細胞では核内に十数個の粗大な顆粒状の構造物がみられ, これが Mel-18 を含むポリコムタンパク質複合体の一部ではないかと考えられた。*mel-18* ヘテロ接合性マウスの腫瘍細胞ではこの破碎像が観察された。正常マウス乳腺細胞に *mel-18* アンチセンスを導入すると, 高率に腫瘍を形成し, 核内の Mel-18 タンパク質局在は, *mel-18*^{+/-}マウスの腫瘍細胞と同様の破碎パターンを呈した。他の乳癌関連遺伝子の検索では, *mel-18* の発現量の少ない細胞で癌抑制遺伝子の *brca1* の発現が減少, 癌遺伝子の *tbx2* の発現が増加しており, これらが *mel-18* の標的遺伝子であることが示唆された。以上より, *mel-18* のハプロインサフィシエンシーは, Mel-18 複合体を不安定化し, 標的遺伝子のヘテロクロマチン領域の破綻により腫瘍原生獲得に至ったものと考えられた。

Key words : ポリコム遺伝子群 (*Polycomb* group genes), *mel-18*, 遺伝子改変マウス, ハプロインサフィシエンシー (*haploinsufficiency*), 発癌

ポリコム遺伝子群は線虫から哺乳類まで遺伝学的に保存されている。その遺伝子産物は, 細胞核内で標的とする染色質の不活性化された領域 (ヘテロクロマチン領域) を半永久的に維持することが, ショウジョウバエの体節発生の制御を担うホメオティック遺伝子群で初めて同定された²¹⁾。哺乳類ポリコム遺伝子群の遺伝子産物には Mel-18²⁾をはじめ, Bmi-1³⁾, Rae-28⁸⁾, RING-1¹⁷⁾などがあり, これらのタンパク質は細胞の核内でタンパク質複合体を形成して標的遺伝子の抑制に寄与することが知られている^{4,15)}。

mel-18 は, ショウジョウバエのポリコム遺伝子 *posterior sex comb (psc)* の哺乳類ホモログで, この遺伝子座を選択的に破壊したノックアウトマウスは, 体節発生異常による頸椎の後方化を呈し, ホメオティック遺伝子群に対する抑制機能が哺乳類でも保たれていることが示された¹⁾。またこのマウスは免疫細胞の細胞周期異常に伴う重篤な免疫不全を呈し, *mel-18* の細胞周期への関与が示唆された¹⁾。さらにこの免疫細胞は容易に細胞死に至ることより, *mel-18* は細胞死にも関与すると思われた。したがって, *mel-18*

は細胞周期, 細胞死双方を制御することから癌抑制遺伝子の可能性が予想されていた。最近ヒト *EZH2* (*Enhancer of zeste homologues*) や, *bmi-1* など他のポリコム遺伝子でも, リンパ腫やホジキン病などの発癌への関与を示唆する研究が報告されている^{5,10,16}。

実際に *in vitro* の実験系で, *mel-18* の発現を抑制したマウス線維芽細胞はヌードマウスに移植すると固形腫瘍を形成し, 癌抑制遺伝子としての活性を持つことが確認された¹³。しかし, *mel-18* ノックアウトマウスは重篤な免疫不全に加え, 腸管神経叢形成不全の腸閉塞による低栄養で, 生後2~3週間で全例死亡するため, 生体での発癌はこれまで確かめられなかった。

近年, *mel-18* の正常遺伝子座と改変遺伝子座の両方を保持するヘテロ接合性マウスに, 乳癌を中心とする腺癌発生が見出された。腫瘍細胞の残存 *mel-18* 遺伝子座には欠失, 点変異, 転座などの変異は認められなかった。*mel-18*^{+/-}マウスの発癌機構を解析した結果, *mel-18* は従来の癌抑制遺伝子とは異なる機構により, 発癌を抑制していることが明らかになったので報告する。

材料と方法

1. マウス

gene targeting 法を用い, *mel-18* のタンパク質に翻訳される最初の ATG を含む *exon5* を pMCI-*neo* poly (A) カセットに置換した *mel-18* のゲノム DNA を含むプラスミドを作製した (Fig. 1)。これをマウス 129/SV 由来の胚性幹細胞に移入し, C57BL/6 マウス胚とキメラを形成させ, キメラマウス同士の交配から *mel-18* ヘテロ接合性マウスを作成した。これを10回以上 C57BL/6 マウスに戻し交配した¹⁾。形成した

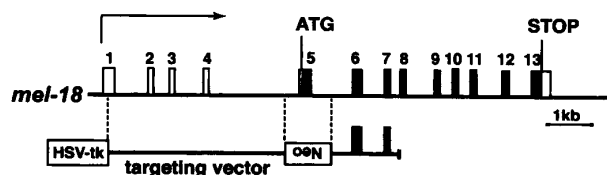


Fig. 1. Strategy for targeted disruption of the *mel-18* locus.

The genomic organization of the wild-type *mel-18* locus and the structure of the targeting vector are shown. Exons are indicated by boxes and coding regions are filled. Targeting vector containing the fifth exon is replaced with the *neo* cassette.

mel-18 ノックアウトマウスはヘテロ接合子同士で交配され, 尾組織から採取された DNA を用いた PCR 法で *mel-18* の野生型および変異型の検出を行い, 仔マウスをそれぞれ野生型, ヘテロ接合性, ホモ接合性ノックアウトに分類し, 腫瘍発生の有無に関わらず自然死亡まで観察した。マウスは広島大学医学部動物実験施設の specific pathogen free の環境下で育成された。

2. 病理学的検索

腫瘍を発症した *mel-18*^{+/-}マウスは自然死直前で屠殺し, 腫瘍および肺, 肝, 腎, 脾, 消化管など主要臓器をホルマリン固定, パラフィン包埋し, 切片をヘマトキシリン・エオジン染色後, 顕微鏡下観察を施行した。

3. 腫瘍細胞 *mel-18* のサザンハイブリダイゼーション

mel-18^{+/-}マウスの腫瘍組織, 非癌部 (肝), 野生型マウスの肝組織よりゲノム DNA を抽出し, 制限酵素 *EcoR I*, *BamH I* で断片化したのち, アガロースゲルで電気泳動施行。塩酸処理後 NaOH で DNA を一本鎖変性させ, ナイロンメンブレンフィルターにプロットティング。UV 照射でクロスリンキング後, 0.5% SDS, 5xDenhardt, 5xSSC, carrier DNA 50 μg/ml 溶液でプレハイブリダイゼーション施行。マウス *mel-18* cDNA に α-³²P-dCTP で標識を施しプローブを作成。これをフィルター上の DNA と 0.1% SDS, 5xDenhardt, 5xSSC, carrier DNA 100 μg/ml 溶液で相補結合させ, イメージングプレートを用いたオートラジオグラフィーで三者のバンドを検出し, 比較した。

4. 腫瘍 *mel-18* 残存遺伝子座の検索

腫瘍組織の一部をヌードマウスの皮下に移植, 継代後, ナイロンメッシュを通して細分化, ウシ胎仔血清 10% 含有ダルベッコ変法培養液で細胞株を作成。培養液中にジェネティシン (G418) を混入し, この薬剤に耐性を示す *neo* の遺伝子を含む改変型 *mel-18* を持つ細胞, すなわち *mel-18*^{+/-}マウス由来の細胞のみを選択培養した。この細胞より DNAzol, RNAzol を用いて DNA, RNA を抽出。ゲノム DNA を鋳型にしてタンパク質に翻訳されるエクソン 5 からエクソン 12 まで下記のプライマーで nested PCR 法を試行。クローニングののち塩基配列をシーケンシング, 既知のマウス *mel-18* と比較し, 変異の有無を確認した。cDNA シーケンシングは RNA で RT-PCR を行い,

得られた cDNA を増幅してその塩基配列を読み取り、正常配列と比較した。1 回目 PCR プライマー: エクソン 5-464 (5'-CCTCTGTGGGGGCTATTTTA-3'), エクソン 12-1063 (5'-CTTCGCCAGGGGTAGATGTA-3')。2 回目 PCR プライマー: エクソン 5-484 (5'-TTGATGCCACCACCATTTGTG-3') とエクソン 9-760 (5'-AGCCCCCTTCTCCTGTTCCA-3'), エクソン 6-547 (5'-TGGAGACCA-ACAAATACTGC-3') とエクソン 11-962 (5'-TGTACTTGCTGGGCACATCC-3'), エクソン 9-780 (5'-CTGGGTGACGACGAGATTGT-3') とエクソン 12-1015 (5'-CATTAAGGTGTAGTATTCCT-3')。

5. 抗 Mel-18 抗体の作成

ヒスチジン・タグの付いたマウス Mel-18 組み替えタンパク質を作成、キレートカラムで精製。完全フロイント・アジュバント液に懸濁して BALB/c マウスの腹腔内投与で反復免疫を施行。腹水中の細胞をマウス形質細胞腫細胞と融合、ハイブリッド細胞を HAT 培地で選択後、培養上清と Mel-18 タンパク質の結合能を ELISA 法で確認した。ハイブリッド細胞の選択は少なくとも二回の限界希釈法で行われた。A3 のクローンが以降のタンパク質解析に用いられた。

6. *in vitro* の腫瘍原生分析

1.6 kb 長の *mel-18* のオープンリーディングフレームを pEF-HisB プラスミドに挿入し、正常マウス乳腺細胞株 (MM3MG) 細胞に電気的にトランスフェクション。コントロールとして空のベクターを導入したクローンも作成した。各導入細胞を選択薬剤のゼオシンに曝露した後、限界希釈法でクローニング、14 個のアンチセンス導入細胞クローンと 5 個の空ベクター導入細胞を、ヌードマウスの背部皮下に移植し、6 ヶ月以上観察した。腫瘍の発生の際は定期的に腫瘍径を測定し、腫瘍容量を (直径)² × (高さ) × π/6 で近似計算した。

7. Mel-18 タンパク質に対するウェスタンブロット

野生型マウスおよび担癌 *mel-18*^{+/-}マウスの正常組織 (肝)、癌組織をホモジナイズ後プロテアーゼ阻害剤緩衝液 (62.5 mM Tris-HCl, pH 6.8, 10% glycerol, Complete™ (Roche) 1Tab/25 ml buffer) で細胞融解し、タンパク質溶液を抽出。Superrose 6 カラムを用い、タンパク質溶液をゲル濾過クロマトグラフィーで分画した。各分画サンプルを 10% ポリアクリルアミドゲルで SDS-PAGE 後、PVDF メンブレンにトランスファーし、5. のモノクローナル抗 Mel-18 抗体で

ウェスタンブロットを施行した。また *mel-18* cDNA アンチセンスを導入したマウス正常乳腺細胞の各クローンもペレット状にした後、同様の手順でタンパク質を抽出、SDS-PAGE、メンブレンへのトランスファー、ウェスタンブロットを施行した。Mel-18 タンパク質の発現量はブロットの濃度で定量した。

8. Mel-18 タンパク質の細胞内局在 (蛍光免疫染色)

マウス正常乳腺細胞株、4. の腫瘍細胞株、*mel-18* cDNA アンチセンス導入細胞の各細胞をチャンバー付きカバーガラスに植え、4% パラホルムアルデヒドで固定。SDS, Triton X-100 で浸透化後、モノクローナル抗 Mel-18 抗体を一次抗体、Alexa Fluor™ 488 ヤギ血清抗マウス IgG 抗体を二次抗体として染色を施行し、共焦点レーザー顕微鏡で検鏡した。

9. 他の癌抑制遺伝子、癌遺伝子の動向 (リアルタイム定量的 PCR)

マウス正常乳腺細胞、*mel-18*^{+/-}マウスの腫瘍由来株細胞、*mel-18* cDNA アンチセンス導入細胞の各細胞より TRIZOL で RNA を抽出、各 1 μg を Superscript II 逆転写酵素で cDNA に逆転写。TaqMan PCR 用測定キットを用い、ABI Prism 7700 Sequence Detection System (Perkin-Elmer) で *brca1*, *brca2*, *cyclinD1*, *tbx2* について定量的 PCR 法施行。蛍光ラベル付きプローブは、*brca1* (AGAGAGAAGTGGACTCACCCGCAAAGTCTG), *brca2* (AAAGCCACGTGTGCTAATTGCCGCAAG), *cyclinD1* (CAAAATG-CCAGAGGCGGATGAGAACA), *tbx2* (TACAGCACCTTC-CGCACCTATGT-CTTCC), プライマーは *brca1* (forward: TCCAAACGCTGACTCCCTTAG, reverse: AACATCGGTGGTAGCTCCAGAA), *brca2* (forward: CTGTTG-TAAAACCGATAGGTCTTGC, reverse: AATGGCCACCAAATAAGGTCG), *cyclinD1* (forward: CCACGATTTTCATCGAACACTTCC, reverse: ACAAGGTCTGTGCATGCTTGC), *tbx2* (forward: TGC-GAGCCAATGACA-TCTTGA, reverse: AGGCAGT-GACAGCGATGAAGT) でデザインした。同時に glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase (GAPDH) の定量を行い、コントロールとした。PCR の条件は、50°C 2 分間、95°C 10 分間の後、95°C 15 秒間 60°C 1 分間の反復を 45 サイクルで行った。

結 果

1. *mel-18* ヘテロ接合性マウスに発生した腫瘍について

mel-18 の遺伝子改変マウスは, 3個の独立した胚性幹細胞株から開始し, 同胞同士の交配で繁殖, 増加させた。*mel-18* ヘテロ接合性マウスは野生型マウスと身体的特徴の変化はなく, 成長, 加齢にも相違は認められなかった。生涯を通じて発癌のない *mel-18* ヘテロ接合性マウスの生存期間は野生型と差がなかった。発癌は *mel-18* ヘテロ接合性マウス178匹中49匹 (27.5%) にみられ, そのほとんどがメスマウスで発生時期の平均は15.3ヶ月であった。腫瘍の発生母地は半数以上が乳腺で, その他は腹腔内発生の一例外を除いて, 頸部, 項部, 後肢近位部など全身の皮下に認められた。腫瘍は発生部位に関わらず全例が腺癌であった (Table 1, Fig. 2a, 2b)。乳腺腫瘍の病理学的所見では, ほぼ全例とも腺管内にエオジン好染性の分泌物を有する腺癌 (Fig. 2c) であり, マウスの自然発生乳癌で普遍的な小葉型腺癌の所見¹⁸⁾と矛盾しなかった。他臓器への転移は一例のみ認められ (Table 1 の No.1), その臓器は肝, 肺であった。肺の転移像は末梢血管へ

の腫瘍塞栓と肺実質への浸潤が散見された (Fig. 2d)。項部, 下顎部など乳腺以外の皮下や腹腔内に発生した腫瘍の所見も, 乳腺腫瘍の所見と一致していた。

2. 残存 *mel-18* 遺伝子座の検討

相同遺伝子座の双方の変異で癌抑制遺伝子の機能が失われるという従来の癌抑制遺伝子の概念¹⁴⁾を検証するため, *mel-18* ヘテロ接合性マウスに発生した腫瘍の細胞の残存 *mel-18* 遺伝子座の状態を検討した。ゲノム DNA を制限酵素で断片化した後マウス *mel-18* cDNA をプローブに用いてサザンハイブリダイゼーションを施行したところ, 腫瘍と正常組織の *mel-18* で顕著な違いを認めなかった (データ示さず)。次に, 残存遺伝子座の変異の有無を6匹の担癌 *mel-18*^{+/-}マウスのゲノム DNA のシーケンシングと cDNA のシーケンシングで検討したが, 点変異, 欠失, フレームシフトなどはいずれも認められなかった (データ示さず)。

Table 1. Tumorigenesis in *mel-18* heterozygous mice

No.	sex	age (m)	origin or region of tumors
1	F	12	mammary gland, multiple pulmonary and liver metastases
2	F	11	mammary gland
3	F	11	mammary gland
4	F	16	mammary gland
5	F	16	mammary gland
6	F	19	mammary gland
7	F	19	mammary gland
8	F	21	a root of left lower limb
9	F	27	a root of left upper limb
10	F	14	a root of left lower limb
11	F	14	around right lower limb
12	F	19	mammary gland
13	F	17	lower abdominal region, subcutaneous
14	F	14	a root of right upper and left limbs, abdominal region
15	F	14	lower abdominal region, subcutaneous
16	F	22	Intra-abdominal, a mesentery
17	F	11	nape, a root of left lower limb, upper abdominal region
18	F	7	lower abdominal region
19	F	8	mammary gland
20	F	9	nape
21	F	17	mammary gland
22	F	12	left nape
23	F	24	anterior neck, a root of right lower limb
24	F	8	left neck
25	F	11	a root of left upper limb

We showed a part of *mel-18*^{+/-} mice with tumorigenesis.

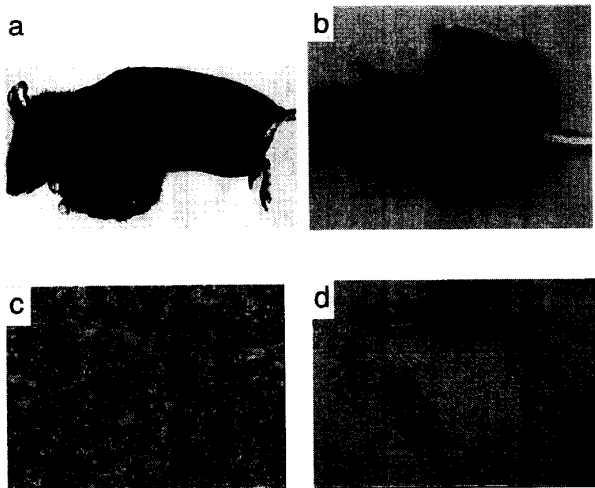


Fig. 2. Tumor generations in *mel-18*^{+/-} mice.

(a), (b) *mel-18*^{+/-} mice suffering from tumors. 9-12 months-old *mel-18*^{+/-} mice developed solid tumors subcutaneously at various sites. The main of primary organs were mammary glands. (c), (d) Haematoxylin and eosin staining of histological sections. Tumors were characterized as acinar-type adenocarcinomas. (c) A typical tumor image. Tumors were comprised of small glandular structure with intraluminal eosinophilic secretion. (d) An image of pulmonary metastasis. Original magnification 200 x for (c), (d).

3. Mel-18 タンパク質を含むポリコームタンパク質複合体 (Mel-18 タンパク質複合体) の検討

mel-18 の遺伝子産物である Mel-18 タンパク質は、他のポリコームタンパク質等と複合体を形成して細胞内で作用することが知られている³⁾。*mel-18*^{+/-}マウスの腫瘍、正常組織の Mel-18 タンパク質複合体をゲル濾過、ウェスタンブロットを行い、Mel-18 タンパク質を含む分画を同定した。野生型では、約 6 MDa に相当する (データ示さず) 分画15, 16に Mel-18 タンパク質が存在しており、これは複合体を形成しているものと思われる。*mel-18*^{+/-}マウスでは腫瘍、非腫瘍組織に関わらず、この分画には Mel-18 タンパク質が検出できなかった (Fig. 3a)。分画31, 32では、Mel-18 タンパク質はモノマーとして存在していると考えられた (データ示さず)。これは野生型のみならず、*mel-18*^{+/-}マウスの腫瘍、非腫瘍組織を問わず認められたが、その量は野生型に比較すると減少していた (Fig. 3a)。以上より *mel-18*^{+/-}マウスでは、Mel-18 タンパク質が減少しているだけでなく、Mel-18 タンパク質を含む複合体が形成されなくなっているこ

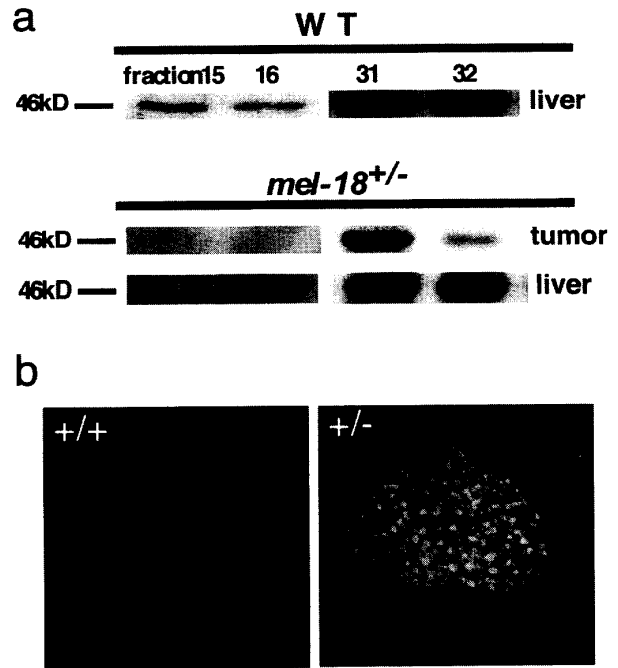


Fig. 3. Protein analyses of PcG complexes.

(a) Representative Western blots of PcG protein complexes are shown with the genotype of the mouse. Mel-18 proteins were detected in fractions 15, 16, 31 and 32. The former pair may include Mel-18 proteins involved in huge PcG protein complexes; the latter ones may represent Mel-18 protein monomers. (b) Observation of PcG bodies in the cell nuclei by immunofluorescence. Normal PcG bodies were visualized as several rough globules similar to nuclear bodies. Tumor cell lines derived from *mel-18*^{+/-} mice contained finer nuclear particles.

とが示された。

Mel-18 タンパク質の細胞内局在を調べるため、培養株細胞に抗 Mel-18 抗体を用いた蛍光免疫染色を施行した。野生型マウス由来株細胞では核内に粗大な顆粒状構造物が十数個認められたが、*mel-18*^{+/-}マウス腫瘍由来株細胞では、この構造物があたかも破碎されたような細粒状に変化しているのが認められた (Fig. 3b)。

4. Tumorigenicity assay

マウス正常乳腺細胞に *mel-18* cDNA のアンチセンスを導入して内在性 *mel-18* の発現量を減少させ、ヌードマウスの皮下に移植したところ、14クローンのうち10クローンで固形腫瘍を形成した。ベクターのみを導入したコントロールの細胞では、腫瘍の形成

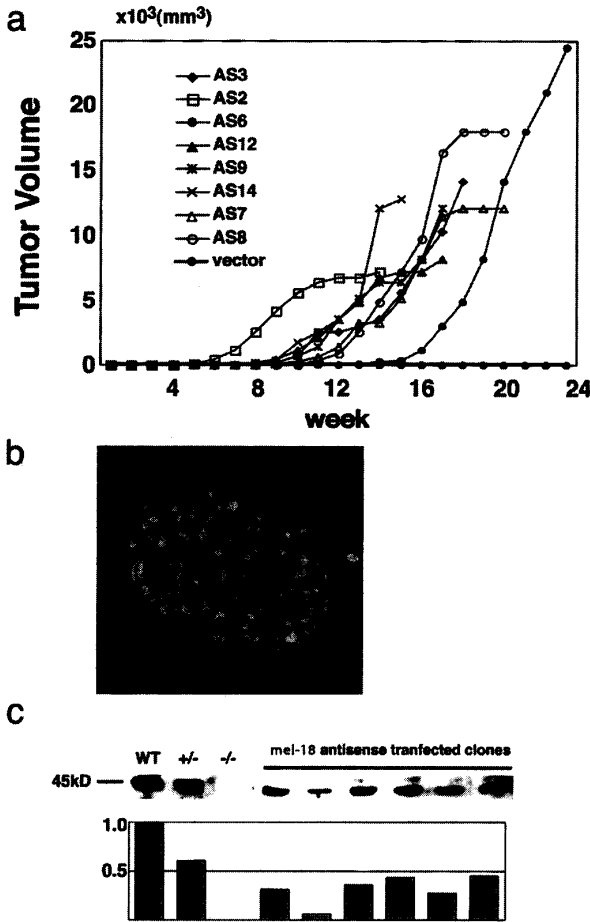


Fig. 4. Analysis of murine mammary gland cells transfected with *mel-18* cDNA antisense. (a) The growth curve of tumor volumes were followed for approximately 25 weeks. The representative clones are shown. AS: transfected clones with *mel-18* cDNA antisense. (b) Immunohistochemical staining of transfected cells showed a change in *Mel-18* containing complexes distributions in the nuclei similar to those observed in tumor cells derived from *mel-18*^{+/-} mice. (c) Immunoblots of *Mel-18* protein expression in transfectants that produced tumors. Expression levels were quantified by densitometry.

は見られなかった (Fig. 4a)。腫瘍原生を獲得した導入細胞の、抗 *Mel-18* 抗体を用いた蛍光免疫染色では、*mel-18*^{+/-}マウスでみられた腫瘍細胞と同様、*Mel-18* タンパク質を含む構造物の破壊像が認められた (Fig. 4b)。ウェスタンブロット法では、腫瘍原生を獲得した導入細胞の *Mel-18* タンパク質量は、マウス正常乳腺細胞に比べ低下していた (Fig. 4c)。

5. 他の乳癌関連遺伝子の動向

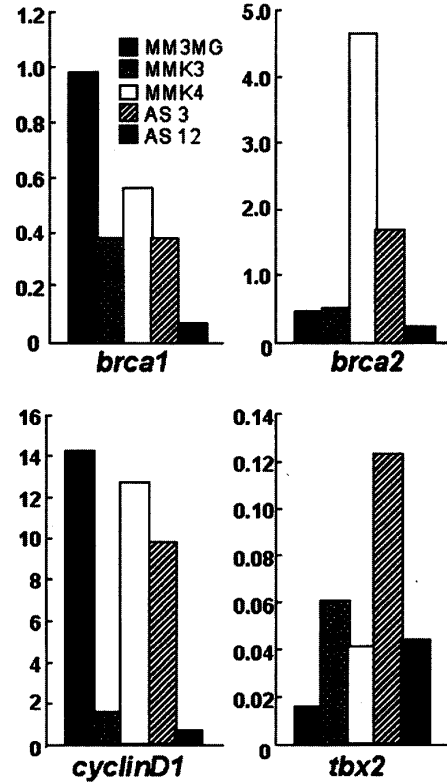


Fig. 5. Quantification of mRNA expression for *brca1*, *brca2*, *cyclinD1*, and *tbx2*. Quantitative TaqMan PCR determined mRNA levels of tumor cell lines, *mel-18* antisense transfectants and normal murine mammary gland cells. MM3MG: normal murine mammary gland cell, MMK3 and MMK4: tumor cell-lines derived from *mel-18*^{+/-} mice, AS3 and AS12: *mel-18* antisense transfected MM3MG clones.

mel-18^{+/-}マウスに発生した腫瘍の半数以上が乳癌であったため、定量的 RT-PCR で他のマウス乳癌抑制遺伝子 (*brca1*¹⁹⁾, *brca2*²⁰⁾, 癌遺伝子 (*tbx2*¹²⁾, *cyclinD1*⁹⁾) の動向を調べた。*mel-18* の発現量の低いアンチセンス導入細胞 (AS3, AS12) と *mel-18*^{+/-}マウス由来の癌細胞 (MMK3, MMK4) では、マウス正常乳腺細胞 (MM3MG) に比較して、癌抑制遺伝子の *brca1* の発現量が低く、癌遺伝子の *tbx2* の発現量が増加していた (Fig. 5)。その他の遺伝子の発現量の変化は一貫していなかった。

考 察

mel-18^{+/-}マウスの27.5%に腫瘍の発生があり、コントロールの野生型マウスの同様の腫瘍発生率は5%であったことから、統計学的に明らかな有意差 ($p < 0.001$) を認め、*mel-18* の腫瘍発生への関与が示

唆された。*mel-18*^{+/-}マウスの腫瘍は半数以上が乳癌で、その他全身のあらゆる部位の皮下より発生しており、全例が腺癌であった。他臓器への転移例は少数で、多くは原発部位に局限した高分化型腺癌と考えられた。これらの腫瘍は皮脂腺等、乳腺と初期発生段階で原基を同じくする皮膚付属器官を発生母地とするのではないかと思われた。すなわち、*mel-18* ヘテロ接合性マウスに発生する腫瘍は、上皮性外胚葉由来の器官に特異的と思われた。

mel-18 と腫瘍発生の因果関係を検討するに当たり、最初に作業仮説を立てた。第一に従来の癌抑制遺伝子のツーヒット (two-hit) セオリー¹⁴⁾、第二にハプロインサフィシエンシー (haploinsufficiency)¹⁹⁾である。後者は遺伝学で用いられてきた概念で、ある遺伝子の相同遺伝子座の片方が失われることで、個体の形質に何らかの変化がもたらされるというものであり、性染色体がXOとなるターナー症候群が代表的である。近年この概念が癌抑制機構を考える上で応用されるようになってきた²⁰⁾。

まずツーヒットセオリーを検証するために、*mel-18* の残存遺伝子座が何らかの形で損なわれている可能性を検討した。腫瘍ゲノムのサザンハイブリダイゼーションでは、正常組織と *mel-18* のパターンは変わらず、*mel-18* の著明な変化はないものと考えられた。次に、残存遺伝子座に点変異、欠失、フレームシフト等の変異が生じていないか検討したが、いずれも認められず、残存 *mel-18* 遺伝子座は正常のままで腫瘍が発生したことが確認された。よって、今回の発癌は、従来の癌抑制遺伝子の概念に従わず、ハプロインサフィシエンシーに拠るものと考えられた。ハプロインサフィシエンシーの発現様式を呈する遺伝子は様々なものがあるが、個体の初期発生に必須であるもの、他のタンパク質とある一定の比率で複合体を形成するものなど、共通の性質がある⁷⁾。

mel-18 を含むポリコム遺伝子群は、ショウジョウバエの初期発生段階で発現するホメオティック遺伝子群の負の調節因子であり、タンパク質複合体を形成して標的となる染色質領域を覆い、転写が行われないヘテロクロマチン領域として維持する¹⁵⁾。従って、ポリコム遺伝子群は、タンパク質複合体を機能単位としていることが考えられる。実際 *mel-18* の遺伝子産物である Mel-18 タンパク質は、他のポリコムタンパク質と複合体を形成して核内に分布していることが示されている³⁾。そこで *mel-18* の正常遺伝子座が片方のみになることで複合体がどう変化するか、タンパク質のゲル濾過、ウェスタンブロット法で検討して

た。野生型マウスの組織では、Mel-18 を含む約 6 MDa の巨大なタンパク質複合体 (Mel-18 タンパク質複合体) が同定されたが、*mel-18*^{+/-}マウスの組織では、腫瘍、非腫瘍組織とも、このタンパク質複合体が認められず、複合体の破壊、あるいは形成不全が起こっていることが確認された。

マウス正常乳腺細胞の蛍光免疫染色法では、Mel-18 タンパク質は核内に顆粒状に存在している像が今回初めて認められたが、*mel-18*^{+/-}マウス由来の腫瘍株細胞ではこれらの顆粒状構造物の破碎像が観察された。これまでの報告で Mel-18 タンパク質と複合体を形成する他のポリコムタンパク質も同様の顆粒状構造物として染色されること³⁾、上記のゲル濾過及びウェスタンブロットで *mel-18*^{+/-}マウスの腫瘍組織では Mel-18 タンパク質複合体が形成されなくなっていることを総合すると、*mel-18*^{+/-}マウス腫瘍由来株細胞の核でみられた Mel-18 タンパク質の破碎像は、Mel-18 タンパク質複合体の形成低下を形態的に示していると考えられる。

mel-18^{+/-}マウスでは Mel-18 タンパク質が減少しているだけでなく、Mel-18 タンパク質複合体が腫瘍、非腫瘍組織を問わず、形成されなくなっていることより、この Mel-18 タンパク質複合体の崩壊は、癌化した細胞の特異的な変化ではなく、恐らく *mel-18*^{+/-}マウスの全身の細胞で生じていると考えられる。クロマチンサイレンシングの主座を担うタンパク質複合体の崩壊は、標的遺伝子座のヘテロクロマチン化からの逸脱を予想させる。すなわち、複合体の形成不全は、ある標的遺伝子座の発現につながるのではないかと考えられる。こうしたクロマチンサイレンシングの破綻が、なぜ乳癌を中心とする腺癌の発生に結びつくかは明らかでないが、*mel-18* の標的遺伝子が乳癌発生の系に特異的なのではないかと考えている。Mel-18 タンパク質複合体の破壊は *mel-18* の遺伝子量あるいはタンパク質量の減少に起因するのではないかと思われた。

mel-18 の遺伝子発現量の減少が直接細胞の形質変化に結びつくか否かを、マウス正常乳腺細胞に *mel-18* cDNA アンチセンスを導入した細胞を用いて解析した。これらのクローンは、内因性 Mel-18 タンパク質量の減少が認められ、多くがヌードマウスの皮下に固形腫瘍を形成した。また蛍光免疫染色では、*mel-18*^{+/-}マウスに発生した腫瘍と同様、Mel-18 タンパク質を含む顆粒状構造物の破壊像を認めた。以上より、*mel-18* の発現量を下げただけで、タンパク質局在の変化と上皮細胞の癌化が起こることが確認された。従って、*mel-18* はマウスの新規の癌抑制遺伝子であ

ると考えられた。

今回の発癌は半数以上が乳癌であったが、他の乳癌関連遺伝子の関与がないか、定量的 RT-PCR 法を用いて検討した。その結果、*mel-18* の発現の低下しているクローン (*mel-18*^{+/−}マウス由来の腫瘍細胞、*mel-18* アンチセンス導入細胞) では、乳癌抑制遺伝子の *brca1* は発現が低下し、逆に乳癌癌遺伝子の *tbx2* は発現が上昇していた。これは、両者の発現調節が *mel-18* のコントロール下にあることを示唆している。癌化のメカニズムには複数の要因の存在が予想されるが、この度みられた癌抑制遺伝子・癌遺伝子の発現のバランスの異常も原因の一つではないかと考えられた。

以上の結果から、今回みられた *mel-18*^{+/−}マウスの発癌は、*mel-18* の遺伝子発現量の減少で、Mel-18 タンパク質を含むタンパク質複合体が不安定となり、この複合体がヘテロクロマチン状態を維持している染色体領域の破綻が生じ、複数の癌抑制遺伝子、癌遺伝子の活性化、不活性化が起こった状態が持続した結果、引き起こされるのではないかと考えられた。

最後に、近年のヒトゲノムプロジェクトの成果で、ヒト *Mel-18*, *BRCA1* の遺伝子座が17番染色体長腕21に近接して存在することが判明した¹¹⁾。これは、*BRCA1* に変異や欠失を伴わないが、17番染色体長腕にヘテロ接合性欠失 (Loss of heterozygosity, LOH) がみられる乳癌の癌発生のメカニズムを解明する上で、ヒト *Mel-18* の乳癌への関与を示唆する可能性を示していると思われる。ヒト *Mel-18* と発癌の関連性の解明は今後の重要な課題である。

謝 辞

稿を終えるに際し、ご指導を賜りました菅野雅元教授、第二外科学教室浅原利正教授に謹んで感謝の意を表します。また本研究にご助力いただいた免疫学寄生虫学教室の皆さまに対し、心より御礼申し上げます。

参 考 文 献

1. Akasaka, T., Kanno, M., Balling, R., Mieza, M. A., Taniguchi, M. and Koseki, H. 1996. A role for *mel-18*, a Polycomb group-related vertebrate gene, during the anteroposterior specification of the axial skeleton. *Development* 122 : 1513–1522.
2. Akasaka, T., Tsuji, K., Kawahira, H., Kanno, M., Harigaya, K., Hu, L., Ebihara, Y., Nakahata, T., Tetsu, O., Taniguchi, M. and Koseki, H. 1997. The Role of *mel-18*, a Mammalian Polycomb Group Gene, during IL-7-Dependent Proliferation of Lymphocyte Precursors. *Immunity* 7 : 135–146.
3. Alkema, M. J., Bronk, M., Verhoeven, E., Otte, A., van't Veer, L. J., Berns, A. and van Lohuizen, M. 1997. Identification of Bmi1-interacting proteins as constituents of a multimeric mammalian polycomb complex. *Genes & Dev.* 11 : 226–240.
4. Brock, H. W. and van Lohuizen, M. 2001. The Polycomb group—no longer an exclusive club? *Curr. Opin. Genet. Dev.* 11 : 175–181.
5. Cardoso, C., Mignon, C., Hetet, G., Grandchamps, B., Fontes, M. and Colleaux, L. 2000. The human EZH2 gene: genomic organization and revised mapping in 7q35 within the critical region for malignant myeloid disorders. *Eur. J. Hum. Genet.* 8 : 174–180.
6. Cook, W. D. and McCaw, B. J. 2000. Accommodating haplo-insufficient tumor suppressor genes in Knudson's model. *Oncogene* 19 : 3434–3438.
7. Fisher, E. and Scambler, P. 1994. Human haploinsufficiency— one for sorrow, two for joy. *Nature Genet.* 7 : 5–7.
8. Hashimoto, N., Brock, H. W., Nomura, M., Kyba, M., Hodgson, J., Fujita, Y., Takihara, Y., Shimada, K. and Higashinakagawa, T. 1998. RAE28, Bmi1, and M33 are members of heterogeneous multimeric mammalian Polycomb group complexes. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 245 : 356–365.
9. Hatchinson, J. N. and Muller, W. J. 2000. Transgenic mouse models of human breast cancer. *Oncogene* 19 : 6130–6137.
10. Haupt, Y., Bath, M. L., Harris, A. W. and Adams, J. M. 1993. bmi-1 transgene induces lymphomas and collaborates with myc in tumorigenesis. *Oncogene* 8 : 3161–3164.
11. International Human Genome Sequencing Consortium. 2001. Initial sequencing and analysis of the human genome. *Nature* 409 : 860–921.
12. Jacobs, J. J., Keblusek, P., Robanus-Maandag, E., Kristel, P., Lingbeek, M., Nederlof, P. M., van Welsem, T., van de Vijver, M. J., Koh, E. Y., Daley, G. Q. and van Lohuizen, M. 2000. Senescence bypass screen identifies *TBX2*, which represses *Cdkn2a* (*p19^{ARF}*) and is amplified in a subset of human breast cancers. *Nature Genet.* 26 : 291–299.
13. Kanno, M., Hasegawa, M., Ishida, A., Isono, K., and Taniguchi, M. 1995. *mel-18*, a Polycomb group-related mammalian gene, encodes a transcriptional negative regulator with tumor suppressive activity. *EMBO J.* 14 : 5672–5678.

14. **Knudson, A. G. Jr.** 1971. Mutation and cancer: statistical study of retinoblastoma. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **68** : 820–823.
15. **Muller, C. and Leutz, A.** 2001. Chromatin remodeling in development and differentiation. *Curr. Opin. Genet. Dev.* **11** : 167–174.
16. **Raaphorst, F. M., van Kemenade, F. J., Blokzijl, T., Fieret, E., Hamer, K. M., Satijn, D. P., Otte, A. P. and Meijer, C. J.** 2000. Coexpression of BMI-1 and EZH2 polycomb group genes in Reed-Sternberg cells of Hodgkin's disease. *Am. J. Pathol.* **157** : 709–715.
17. **Satijn, D. P., Olson, D. J., van der Vlag, J., Hamer, K. M., Lambrechts, C., Masselink, H., Gunster, M. J., Sewalt, R. G., van Driel, R. and Otte, A. P.** 1997. RING1 is associated with the polycomb group protein complex and acts as a transcriptional repressor. *Mol. Cell Biol.* **17** : 4105–4113.
18. **Squartini, F. and Pingitore, R.** 1994. Tumours of the mammary gland. P47-100. *In* V. Turusov and U. Mohr (eds.), *Pathology of Tumours in Laboratory Animals, Tumours of the Mouse*, vol 2. Oxford University Press, New York.
19. **Weber, B. L., Abel, K. J., Couch, F. J., Merajver, S. D., Chandrasekharappa, S. C., Castilla, L., McKinley, D., Ho, P. P., Calzone, K., and Frank, T. S.** 1994. Progress toward isolation of a breast cancer susceptibility gene, *BRCA1*. *Cold Spring Harb. Symp. Quant. Biol.* **59** : 531–536.
20. **Wooster, R., Bignell, G., Lancaster, J., Swift, S., Seal, S., Mangion, J., Collins, N., Gregory, S., Gumbs, C. and Micklem, G.** 1995. Identification of the breast cancer susceptibility gene *BRCA2*. *Nature* **378** : 789–792.
21. **Zink, D. and Paro, R.** 1995. *Drosophila* Polycomb-group regulated chromatin inhibits the accessibility of a trans-activator to its target DNA. *EMBO J.* **14** : 5660–5671.

mel-18, a *Polycomb* Group Gene, is Haploinsufficient for
Murine Spontaneous Adenocarcinoma

Mari KIMURA

Department of Immunology and Parasitology, Hiroshima University School of Medicine
(Director: Prof. Masamoto KANNO)

The *Polycomb* group (*PcG*) gene products form protein complexes in mammalian cell nuclei and maintain chromatin silencing of target genes. *mel-18*, a mammalian *PcG* homologue, is considered to regulate cell cycle progression, cell death, or senescence based on the findings obtained from its knockout mice. Mel-18 participates in Polycomb protein complexes and the immunohistochemical analyses have shown that Mel-18 is located in the nucleus as a speckled distribution. Recently, *mel-18* hemizygous mice have shown to develop adenocarcinomas, most of which were classified as breast cancers. Although no gross rearrangements or nucleotide mutations in the remaining *mel-18* allele despite of the expression of Mel-18 protein in *mel-18* hemizygous mice, we found that, in *mel-18* hemizygous mice, a pattern of protein complexes including Mel-18 was destructed, and that a distribution pattern of Mel-18 changed to a micro-speckled pattern. In addition, murine mammary gland cells expressing reduced level of Mel-18 by antisense introduction acquired tumorigenicity and also showed an altered distribution of Mel-18 in the nucleus similar to those observed in tumor cells of *mel-18* hemizygous mice. Examinations of the expression of other breast cancer-associated genes demonstrated that *brca1* expression was reduced, whereas *tbx2* expression was induced both in the *mel-18* hemizygous tumor cells and *mel-18* antisense-introduced cells. These results strongly suggest that *mel-18* is a novel murine tumor suppressor gene and its haploinsufficiency results in tumorigenesis, possibly due to disruption of the protein complex formation and failure in silencing of target genes.