

がん遺伝子H-, N-, K-ras 多重欠損マウスを用いた
Ras の生体機能の解析

市瀬 広武

がん遺伝子 H-, N-, K-*ras* 多重欠損マウスを用いた
Ras の生体機能の解析

東京大学大学院農学生命科学研究科
獣医学専攻 平成7年度博士課程 入学

市瀬 広武

指導教官

勝木 元也

(東京大学医科学研究所 教授)

目次

第1章 *ras* 遺伝子多重欠損マウスの生存性および表現型の解析

1.1 はじめに	1- 4
1.2 材料と方法	5- 9
1.3 結果	10-28
1.4 考察	29-32
1.5 参考文献	33-35

第2章 *ras* 遺伝子多重欠損マウスに観察される乳腺腫瘍および小腸浮腫の解析

2.1 はじめに	36
2.2 材料と方法	36-39
2.3 結果	40-57
2.4 考察	58-63
2.5 参考文献	64-67

第3章 まとめ

3.1 Ras の機能重複	68-70
3.2 Ras についてのこれまでの知見と表現型との比較	71-72
3.3 参考文献	73-75

謝辞	76
----	----

論文の内容の要旨	77-80
----------	-------

第1章

ras 遺伝子多重欠損マウスの生存性および表現型の解析

1.1 はじめに

ras 遺伝子は、マウス肉腫ウイルスのがん遺伝子 *v-ras* の原がん遺伝子として、またヒトのがんの多くで変異が見つかる遺伝子として同定された。遺伝子産物 Ras は、21kDa の低分子量 GTP 結合タンパク質である。受容体型チロシンキナーゼをはじめとする様々な種類の受容体からのシグナルを受けると GDP 結合型から GTP 結合型に変化して活性化し、MAP キナーゼ経路をはじめとするシグナル伝達経路にシグナルを伝えることで、細胞の増殖、分化を制御していると考えられている (1, 2, 3, 図1)。

Ras は哺乳類のみならず、線虫や酵母、ショウジョウバエにもホモログが存在する。そしてこれらの動物種の変異体解析により明らかにされた Ras を介するシグナル伝達系自体も、種を超えて保存されていることから、Ras は多くの生物種に共通するシグナル伝達の調節因子であると考えられている (1, 2, 3)。

ヒトやマウスをはじめとする哺乳類には、H-*ras*、N-*ras*、K-*ras* の3つの *ras* 遺伝子が存在する。これらは遺伝子構造や染色体の位置が異なるが、コードするタンパク質のアミノ酸配列の相同性が高い (1, 図2)。特に、N 末端側のイフエクター領域やグアニンスクレオチド結合領域は 100% 一致しており、C 末端の脂質修飾領域、CAAX 配列も保存されている。腫瘍で見つかる変異の位置および種類も3つで共通している (1, 2)。また、これら3遺伝子は、いずれもほとんどすべての臓器で発現している (4)。

一方、ヒトとマウスの間ではそれぞれの Ras において、アミノ酸配列の全長にわたり相同性が極めて高いが、3つの Ras 間で相同性が低く機能に重要でないと考えられる可変領域 (Heterogeneous region, 図2) もよく保存されている (2)。K-Ras は選択的スプライシングにより C 末端の構造が異なる K-RasA、K-RasB の2種類からなる (5)。特に K-RasB は他の Ras と脂質修飾の種類が異なる (6)。このような Ras 間での構造の違いから、共通する機能に加え、個々の Ras に特異的な機能が備わっている可能性が考えられる。実際、生化学的には、K-RasB に特異的に結合する smgGDS (7) や、H-Ras より N-Ras、K-Ras との結合能が強い SUR-8 (8) などのタンパク質の存在が知られている。

発現も、臓器により強弱に差が認められる(4)。精子形成の段階によって、3つの *ras* 遺伝子がそれぞれ特徴的な発現パターンを示すことが報告されている(9)。また、K-RasA、K-RasB の胃腸管での発現パターンに違いがあるという報告もある(10)。腫瘍で見つかる変異も、腫瘍の種類によって変異の生じる *ras* 遺伝子の種類が異なる(1,11)。

ras 遺伝子欠損マウスの解析では、N-*ras* 遺伝子のホモ型欠損マウスが成熟個体となるのに対し(12)、K-*ras* 遺伝子のホモ型欠損マウスは胎生致死であることがわかっている(13,14)。ところが、K-*ras* 遺伝子がヘテロ型欠損であってもN-*ras* 遺伝子のホモ型欠損が加わると胎生致死となることが報告されている(14)。

以上のことから、哺乳類における Ras には、種を超えて保存されているシグナル伝達の調節因子としての共通の性質と、Ras の構造や発現の相違がもたらす特殊な性質の両方が備わっていると考えられる。そこで、これら2つの性質の詳細を明らかにするため、既に私が所属する研究室で作成され、現在も解析中である各 *ras* 遺伝子の欠損マウスを用いて多重欠損マウスを作成し、その生存性と表現型についての観察、解析を行った。

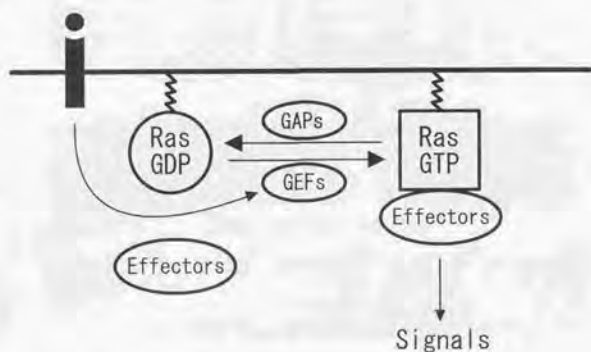


図1 Rasタンパク質の機能

Rasタンパク質はGDP結合型の不活性型とGTP結合型の活性型の2つの型をとる。どちらの型をとるかは、グアニンヌクレオチド交換反応制御タンパク質 (Guanine-nucleotide Exchange Factor; GEF) や、GTPase活性促進タンパク質 (GTPase Activating Protein; GAP) によって制御される。細胞膜受容体からのシグナルが伝えられると活性型となり、標的タンパク質に作用して下流にシグナルを伝える。

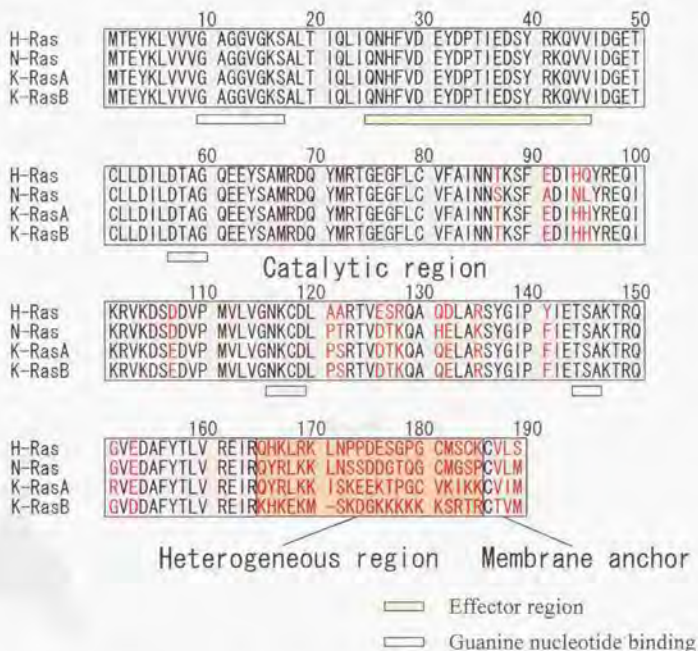


図2 マウスRasタンパク質のアミノ酸配列の比較

マウスのH-Ras、N-Ras、K-RasA、K-RasBのアミノ酸配列を比較した。4つのRasに共通するアミノ酸を黒で、いずれかのRasで異なるアミノ酸を赤で示した。

1.2 材料と方法

ras 遺伝子欠損マウスおよび *ras* 遺伝子導入マウス

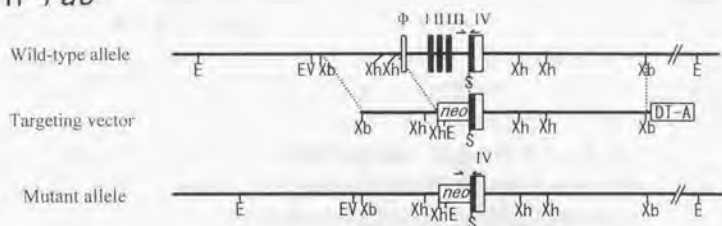
ras 遺伝子欠損マウスは、私の所属する研究室で既に作成され、維持されている *H-ras* 遺伝子欠損マウス、*N-ras* 遺伝子欠損マウス、*K-ras* 遺伝子欠損マウス (13, 15) を用いた。*H-ras* および *N-ras* 遺伝子欠損マウス作成についての論文は、現在他の研究者が投稿準備中であるため、遺伝子欠損の方策を簡単に説明するにとどめる (図 3)。図は、*ras* 遺伝子欠損マウス作成者の一人である中村健司助手の投稿準備中の論文から引用した (15)。

図に示すように、いずれの *ras* 遺伝子欠損マウスも、ネオマイシン耐性遺伝子 (*neo*) の挿入により発現が失われる。それぞれの Ras に特異的な抗体を用いたウェスタンブロット解析によって、ホモ型欠損マウスで確かにそれぞれの Ras の発現がなくなっていることが確認されている。

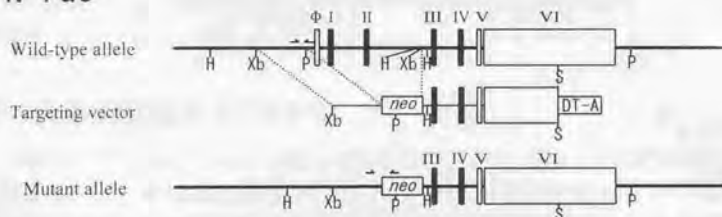
H-ras 遺伝子導入マウスは、ヒト *H-ras* のゲノム遺伝子を導入したものであり、全身で発現していることが転写レベル、翻訳レベルで確認されている (15, 16)。本実験では、遺伝子導入マウスの系統の 1 つ、*rasH2* を用いた。なお、ヒト *H-Ras* はマウス *H-Ras* とアミノ酸配列では 100% 一致している。

今回使用したマウスの遺伝的背景は、標的遺伝子組換えに使用した ES 細胞、CCE 細胞 (17)、の起源である系統 129SvEv と、交配に使用した (C57BL6/J) の混合である。

H-ras



N-ras



K-ras

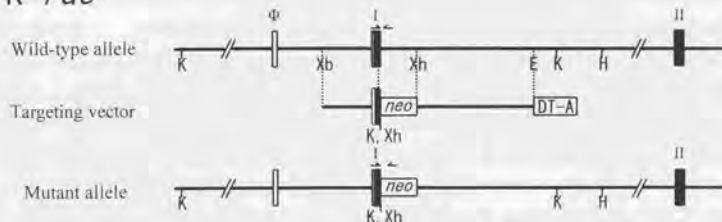


図3 H-, N-, K-ras遺伝子の遺伝子欠損の方策

H-ras遺伝子およびN-ras遺伝子は、上流エクソンの欠失により、K-ras遺伝子はエクソン1へのネオマイシン耐性遺伝子(neo)挿入により、Rasの発現が失われた。矢印(→)は遺伝子型解析のPCRプライマーの位置を示す。

マウスの飼育、観察

マウスは、SPF 環境下で、気温 $22 \pm 1^\circ\text{C}$ 、湿度 $55 \pm 5\%$ 、明期 12 時間、暗期 12 時間（午前 8 時点灯、午後 8 時消灯）の条件で飼育した。

明期開始後 1-2 時間、5-6 時間、11-12 時間の 3 回、交配ケージにおける分娩の有無や産仔の生死および異常の有無について観察した。哺乳期に異常が見られた個体は尾を 2-3mm 切断することで、異常の見られない個体との識別を行った。切断した尾は遺伝子型の判定に用いた。また、死亡した個体については、可能な限り解剖して観察し、尾あるいは組織の一部を遺伝子型の判定用に回収した。生後 3-4 週で耳にパンチあるいは切れ目を入れて個体識別を行ったのち、尾を 1-1.5cm ほど切断し、遺伝子型の判定に用いた。遺伝子型が明らかになった雄は生後 10 週、雌は生後 8 週以降に自然交配や体外受精に使用し、マウスを生産した。

体外受精、胚凍結および胚移植

培養はすべて 37°C 、5% CO_2 存在下で行った。卵子は、雌マウスに妊馬血清性腺刺激ホルモン (Pregnant Mare Serum Gonadotropin; PMSG) を 5iu、ヒト絨毛性性腺刺激ホルモン (human Chorionic Gonadotropin; hCG) を 5iu、48 時間の間隔を空け腹腔内注射して過排卵を誘起し、hCG 接種後 15-16 時間で卵管膨大部より単離し、体外受精用培地 (TYH 培地) 中 (18) に移した。精子は、精巣上体尾部より採取し、TYH 培地で 1.5 時間前培養したものをを用いた。精子を $150/\mu\text{l}$ となるよう、卵子を含む TYH 培地に加え、体外受精を行った。2 個の前核形成と第 2 極体放出が認められたものを修正 Whitten 培地 (modified Whitten 培地; MW 培地) (19) で洗浄後分離し培養した。翌日、2 細胞期胚に発生したものを凍結、または偽妊娠雌マウスへの移植に用いた。

胚の凍結は、中尾らの方法によって行った (20)。2 細胞期胚を 1M DMSO を含む PBI 培地 (21) 中で室温で 5 分間処理した後、 $5\mu\text{l}$ の同培地とともに胚を 1ml のクライオチューブ (NENC 社製) に移し、氷冷水で 5 分間冷却した。次に 0°C に予め冷却した凍結培地 (DAP213 溶液) (22) $95\mu\text{l}$ をチューブに加えて 5 分間放置した後、液体窒素中に漬けて凍結し、使用するまでそのまま保存した。胚の融解は、凍結チューブを液体窒素中から室温中に取り出し 30-60 秒後に、0.25M ショ糖を含む PBI 培地 $0.9\mu\text{l}$ を加えてピペティングして胚を回収した。回収後、PBI 培地で 4 回、MW 培地で 3 回、液を交換しながら洗浄し、移植に用いた。

胚の移植は、雌マウス (MCH: ICR、10-12 週齢、日本クレア) を精管結紮雄マウ

ス(MCH:ICR, 日本クレア)と交配させ、腔栓を確認して得た偽妊娠雌マウスを受容雌とし、両方の卵管にそれぞれ2細胞期胚を8-10個ずつ移植した。移植日、すなわち腔栓確認日を胎生0.5日とした。

遺伝子型の判定

実験操作、試薬調製は、文献を元に行った(23, 24, 25)。

遺伝子型判定用に採材した組織は、溶解液(25)を加え、55℃、12-16時間、緩やかに振とうして溶解した。等量のTE(10mM TrisHCl, 1mM EDTA)飽和フェノール(pH8.0)を加えて転倒混和し、微量高速遠心機(TOMY)で12,000rpm、10分間遠心して水層を分離した。水層に等量のイソプロパノールを加え、転倒混和して得た紐状沈殿を70%エタノールに移し、洗浄した。死体の組織から沈殿を得る際は、12,000rpmで5分間遠心してペレットにし、上清を捨てて70%エタノールを加え、洗浄した。70%エタノールを除去した後5-10分風乾し、TE溶液に溶解した。

PCRは以下の条件で行った。DNA 0.01-0.1 μ gを鋳型として使用し、ExTaqポリメラーゼ(TAKARA)を使用した20 μ lの反応系で、94℃2分の処理後、94℃30秒、60℃30秒、72℃30秒のサイクルを30サイクル行い、72℃4分の処理でPCRを終えた。機械はパーキンエルマー社の9600を使用した。PCR反応液の5 μ lを、2%アガロースゲル、1 \times TBE緩衝液を用いて100V、30-40分泳動し、エチジウムブロマイドで染色後、UVトランスイルミネーターでUV照射し、写真撮影して遺伝子型を判断した。遺伝子型判定用のプライマーとして、

H-*ras* 遺伝子については、

```
forward 5' GCTCCCTATTGTGTTGGTTTTGC 3'
reverse 5' CCGCAATTTATGCTGCCGAATCTC 3'
neo 5' TCCTGCCGAGAAAGTATCCA 3'
```

N-*ras* 遺伝子については、

```
forward 5' CATATTTAAACAAAAGACGAATGC 3'
reverse 5' AACAGGATTCATTTAGGCACAAC 3'
neo 5' ATCAGAGCAGCCGATTGTCTGTTG 3'
```

K-*ras* 遺伝子については、

```
forward 5' GATAATCTTGTGTGAGACATGTTTC 3'
reverse 5' CTGTAGAGCAGCGTTACCTCTATC 3'
neo 5' ATCAGAGCAGCCGATTGTCTGTTG 3'
```

H-*ras* 遺伝子導入マウスのH-*ras* 導入遺伝子については、

```
forward 5' TCAGCAGCCTCCCTTGTGCC 3'
```

reverse 5' GAAACCAAGATCAAGACCA 3'

を使用した。

ras 遺伝子欠損の遺伝子型は、*neo* 遺伝子配列を元にした *neo* プライマーと、マウス *ras* 遺伝子の配列を元にしたプライマーとの間で反応が進むことによるバンドの有無と、マウス *ras* 遺伝子の配列を元にした *ras* プライマー同士で反応が進むことによるバンドの有無を同時に検出することで行った。また、H-*ras* 導入遺伝子の有無については、導入遺伝子がヒト H-*ras* 遺伝子であることを利用し、マウスの内在性 H-*ras* 遺伝子と配列の異なる 3'非翻訳領域の配列が増幅されるか否かによって検出した。この検出法の信頼性は、サザンハイブリダイゼーション法による多検体での検出結果と全て一致したことで確認されている(26)。

遺伝子型表記について

ras 遺伝子欠損マウスの遺伝子型表記は、以下に示す例のように記述することにする。

H-*ras* 遺伝子ヘテロ型欠損マウス : H(+/-)マウス

H-*ras* 遺伝子ホモ型欠損 N-*ras* 遺伝子ヘテロ型欠損マウス : H(-/-)N(+/-)マウス

H-*ras* 遺伝子ホモ型欠損 N-*ras* 遺伝子ヘテロ型欠損 K-*ras* 遺伝子ヘテロ型欠損マウス : H(-/-)N(+/-)K(+/-)マウス

H(+/-)マウスのように、他の *ras* 遺伝子についての記述がない場合、他の *ras* 遺伝子は野性型(+/+)であることを示す。

なお、「野性型」という表記であるが、研究用マウスと実際に野に生きる「野生」のマウスとを区別するために、意図的に使用している。

1.3 結果

ras 遺伝子多重欠損マウスの生存性

各 *ras* 遺伝子欠損マウスについて、ヘテロ型マウス同士の交配によりホモ型マウスの作成を試みたところ、H(-/-)マウスおよび N(-/-)マウスは期待値通りの割合の数で出生し、生育したが、K(-/-)マウスは胎生致死であった(13)。欠損させても胎生致死に至らなかった H-Ras、N-Ras の存在意義や、3つの Ras の相互関係についての情報を得る目的で、*ras* 遺伝子の複数種類を欠損させた 2重あるいは 3重欠損マウスの生存性について調べた。

はじめに N-*ras* 遺伝子と K-*ras* 遺伝子の組み合わせについて検討した。N(-/-)マウスと K(+/-)マウスとの交配で N(+/-)K(+/-)マウスが正常に得られたので、このマウスと N(-/-)マウスを交配させることで、N(-/-)K(+/-)マウスの作成を試みた。ところが、N(-/-)K(+/-)マウスの出生率が低く、その多くが胎生期に死亡していることが明らかになった(表1)。N(+/-)K(+/-)マウスと N(-/-)マウスとの組み合わせによる生産では、4種類の遺伝子型の産仔が均等に得られるはずである。胎生 15.5 日では 4 遺伝子型で顕著な差はなく生存しているが、胎生 18.5 日では N(-/-)K(+/-)マウスの数が減少していた。また、融解し吸収されつつある死亡胎仔の遺伝子型が N(-/-)K(+/-)であった(表1、カッコ内)。このことから、胎生 15.5 日から 18.5 日の間に多くが死亡していることがわかった。胎生致死を免れたものは、外見上正常に生まれてきた。しかし、これらの新生仔では、哺乳後、腹腔に白色のミルク様の液体の貯留が認められ(写真1)、生後 0-1 日で死亡した。

Crosses	N(+/-)K(+/-) X N(-/-)K(+/+)					total
	N	+/-	+/-	-/-	-/-	
	K	+/+	+/-	+/+	+/-	
E13.5	5	3	5	2	15	
E15.5	7	4	4	5	20	
E18.5	13	17	20	3(5)	58	
P0	21	16	19	4	60	

表 1 N-*ras*およびK-*ras*遺伝子 2 重欠損マウスの胎生中期から出生にかけての生存性

N(+/-)K(+/-)の雌マウスとN(-/-)K(+/+)の雄マウスを交配した。以降の表でも、先に記す方が雌の、後に記す方が雄の遺伝子型を示す。

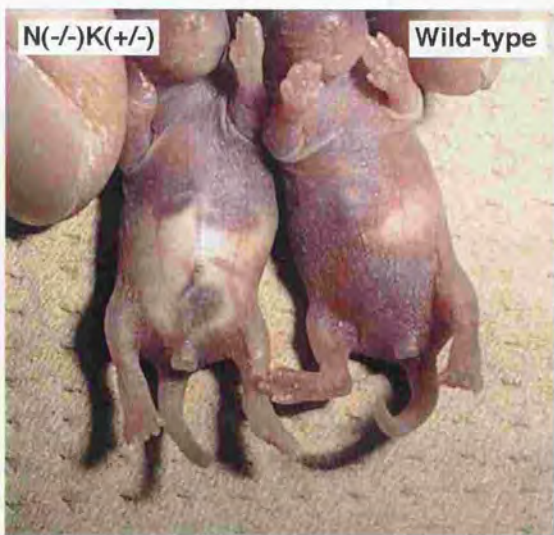
胎生期(E13.5-18.5)については、体外受精および胚移植によって胎仔を得た。新生仔期(P0)については、自然交配によって産仔を得た。

胎仔、新生仔の一部より抽出したDNAで遺伝子型を判定した結果を表に示す。表の上側に胎仔の遺伝子型を、左側に胎生期の日齢を示す。E13.5は胎生13.5日を意味する。P0はE19.5に相当する。

表に示す数字は、各発生段階における、それぞれの遺伝子型の胎仔の数である。E18.5のカッコ内の数字は、死亡して吸収されつつあった胎仔の数である。

写真1 N(-/-)K(+/-)マウスの新生仔で観察された
乳糜腹水の貯留

写真左側がN(-/-)K(+/-)マウス、右側が野性型マウスの哺乳後の新生仔である。野性型マウスでは、胃内にミルクが溜まっているが、左側のN(-/-)K(+/-)マウスでは、腹腔全体が白くなっている。腹腔上部の肝臓や腹腔下部の膀胱の周囲まで白くなっており、液体が貯留していることがわかる。



次に *H-ras* 遺伝子と *K-ras* 遺伝子の組み合わせについて調べたところ、 $N(-/-)K(+/-)$ マウスとは対照的に、 $H(-/-)K(+/-)$ マウスは期待値通りに生まれ、成長した。しかし、 $H(-/-)K(+/-)$ マウス同士の組み合わせで得られる $H(-/-)K(-/-)$ マウスは、 $K(-/-)$ マウスが胎生 12.5 日から 18.5 日にかけて死亡する (13) のに対して、胎生 9.5 日から 11.5 日の間に死亡していた (表 2)。胎生 11.5 日に生存していた 1 例は、発生段階が 2 日ほど遅れていた。

一方、*H-ras* 遺伝子と *N-ras* 遺伝子の組み合わせでは、 $H(-/-)N(+/-)$ マウスや $H(+/-)N(-/-)$ マウスが正常に得られた。そこで、 $H(-/-)N(+/-)$ マウス同士および $H(+/-)N(-/-)$ マウス同士の交配で $H(-/-)N(-/-)$ マウスの作成を試みたところ、期待値の半分ほどしか出生しなかった (表 3 A, 3 B)。出生した $H(-/-)N(-/-)$ マウスと $H(+/-)N(-/-)$ マウスの交配では期待値通りに出生した (表 3 C)。これらの新生仔の中にも、 $N(-/-)K(+/-)$ マウス同様に、腹腔の白色液体の貯留が起こっているものが存在したが、多くは生き残った。また、 $H(-/-)N(-/-)$ マウス同士の自然交配では、産仔数が 6-9 と、野性型マウス同士の産仔数に匹敵し、繰り返し妊娠、出産した。

$H(-/-)N(-/-)$ マウスと $H(-/-)K(+/-)$ マウスの組み合わせで産まれた $H(-/-)N(+/-)K(+/-)$ マウスは、見かけ上正常であったが、多くが生後 1 週間以内に死亡した。この遺伝子型でも、 $N(-/-)K(+/-)$ マウス同様に、腹腔の白色液体の貯留が起こっていた。しかし、発症したマウスのすべてが死亡するわけではなく、生き残ったものは成熟個体となった (表 4)。このマウスについても、生殖能力が、雌雄ともにあることを確認した。

ras 遺伝子多重欠損マウスの遺伝子型と、出生の有無および胎生致死の時期についてまとめると、図 4 のようになる。

Crosses	H(-/-)K(+/-) X H(-/-)K(+/-)			total
	H	-/-	-/-	
Genotypes	K	+/+	+/-	-/-
	E7.5	6	19	6
E9.5	6	13	5	24
E11.5	22	53	1	76
E13.5	8	19	0	27

表2 H-*ras* および K-*ras* 遺伝子2重欠損マウスの胎生期における生存性

雌雄ともにH(-/-)K(+/-)マウスを用いて、体外受精および胚移植によって胎仔を得た。その胎仔よりDNAを抽出し、遺伝子型を判定した結果を表に示す。

Crosses	Genotypes		No. newborns	% observed	% expected
	H	N			
A.	-/-	+/+	55	30.9	25
	H(-/-)	+/-	97	54.5	50
	N(+/-)	-/-	26	14.6	25
	total		178	100	100
B.	+/+	-/-	47	30.9	25
	H(+/-)	-/-	78	51.3	50
	N(-/-)	-/-	27	17.8	25
	total		152	100	100
C.	-/-	+/-	75	47.2	50
	H(+/-)	-/-	84	52.8	50
	N(-/-)	-/-	159	100	100
	total		159	100	100

表3 H-ras および N-ras遺伝子2重欠損マウスの生存性

表の左側から、親の遺伝子型、産仔の遺伝子型、新生仔期における各遺伝子型の産仔数、産仔数全体に対する割合、親の遺伝子型から期待される各遺伝子型の産仔数の割合を示す。

A: H(-/-)N(+/-)マウス同士の交配結果。

B: H(+/-)N(-/-)マウス同士の交配結果。

C: H(+/-)N(-/-)マウスとH(-/-)N(-/-)マウスの交配結果。

ABCいずれの組み合わせも自然交配による。

Crosses	Genotypes			No. newborns	No. newborns with C. A.	No. mice weaned
	H	N	K			
H(-/-) N(-/-) K(+/+)	-/-	+/-	+/+	17	0	17
x						
H(-/-) N(+/+) K(+/-)	-/-	+/-	+/-	12	12	6

表4 H(-/-)N(+/-)K(+/-)マウスの生存性および乳糜腹水の発症

H(-/-)N(-/-)マウスとH(-/-)K(+/-)マウスによる体外受精および胚移植でマウスを得たときの結果について示す。このとき得られるマウスの遺伝子型は、H(-/-)N(+/-)とH(-/-)N(+/-)K(+/-)の2種類である。

帝王切開によって得た29匹の新生仔のうち、12匹でN(-/-)K(+/-)マウス同様の腹腔内への白色液体(乳糜腹水)の貯留が認められた。この新生仔の尾の一部を採材し、遺伝子型を確認したところ、すべてH(-/-)N(+/-)K(+/-)であった。生後1週間内に6匹死亡したが、いずれもH(-/-)N(+/-)K(+/-)であった。また、離乳後の遺伝子型確認では、乳糜腹水の見られなかった17匹は、いずれもH(-/-)N(+/-)であった。

C. A. : Chylous Ascites、乳糜腹水

H- <i>ras</i>	N- <i>ras</i>	K- <i>ras</i>		
		+/+	+/-	-/-
+/+	+/+	□	□	□
+/-				□
-/-				■
+/+	+/-	□	□	■
+/-				□
-/-				■
+/+	-/-	□	□	■
+/-			■	
-/-			■	

図4 *ras*遺伝子多重欠損マウスにおける、胎生期の生存性と遺伝子型の関係

出生の有無および胎生致死の時期について、下に示すように色分けして表示した。

- 正常に発生し、出生する。
- 正常に発生し、出生するが、多くが哺乳期に死亡する。
- 胎生期 (E15.5-E18.5) に死亡するか、出生後 (P0-P1) に死亡する。
- 胎生期 (E12.5-E18.5) に死亡する。
- 胎生期 (E9.5-E11.5) に死亡する。
- 胎生期に死亡する。
(出生しない。死亡時期は未解析。)

ras 遺伝子多重欠損マウスの新生仔期における表現型

新生仔の腹腔に白色液体の貯留が認められるのは、哺乳後であった。貯留が認められた $N(-/-)K(+/-)$ マウスの死亡個体や哺乳後の生存個体を解剖したところ、白色液体は腹腔のみに貯留し、胸腔には認められなかった。開腹して観察したところ小腸表面が白く見えた(写真2、上段左側)。組織を調べたところ、小腸の粘膜下層に浮腫が認められた(写真2、下段左側)。一方、遺伝子型が野生型の哺乳後新生仔では浮腫は認められなかった(写真2、上下段ともに右側)。胎生 18.5 日に採材した、未哺乳の同遺伝子型個体の小腸と組織像を比較すると、小腸粘膜下層の浮腫は哺乳後に生じていることがわかった(写真3)。

腹腔に貯留する白色液体が胃腸管の内容物の漏出によるのかどうかを知るために、炭素粉末の浮遊液を、発症している哺乳マウスに経口投与して観察したところ、炭素粉末は腹腔に漏出することなく、胃腸管を通過して糞と共に排泄された。胃腸管内腔からの直接漏出がないことと、この症例がヒトや変異マウスで報告されている乳糜腹水(Chylous Ascites)の症例と類似していることから、腹腔の白色液体は小腸上皮からの吸収を経たキロミクロンを含む、乳糜腹水である可能性が高い。この検討は第2章で詳しく行うが、以降 *ras* 遺伝子欠損マウスの腹腔に貯留する白色液体を、乳糜腹水と呼ぶ。

写真2 N(-/-)K(+/-)マウスの新生仔で観察された
小腸のリンパ浮腫

左側がN(-/-)K(+/-)マウス、右側が野性型マウスで、写真1に示した個体の小腸である。上段に外観を、下段に組織像を示す。ともにミルクの吸収が起こっているが、N(-/-)K(+/-)マウスでは小腸が全体的に白く見える。組織切片で観察すると、白く見えるのは粘膜下層に浮腫が生じているためであることがわかる。

N(-/-)K(+/-)



Wild-type

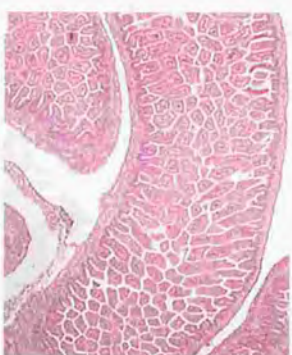


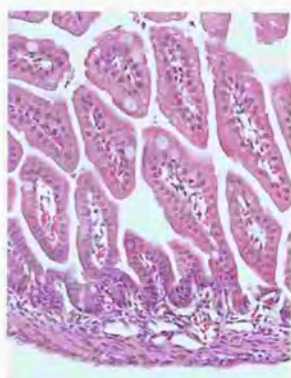
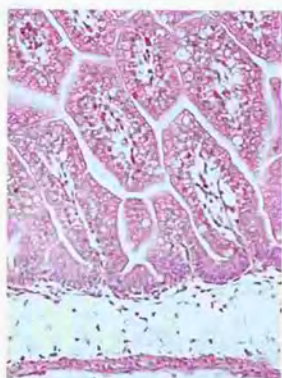
写真3 小腸粘膜下層の浮腫と哺乳の関係

左側の写真がN(-/-)K(+/-)マウス、右側の写真が野性型マウスの小腸（空腸）の組織で、上段が哺乳後(P0)、下段が哺乳前(E18.5)である。哺乳前では小腸粘膜下層の浮腫が見られない。したがって、小腸の浮腫は哺乳後に起きる。

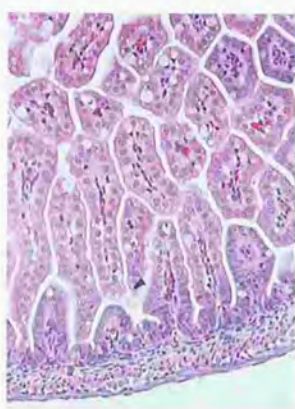
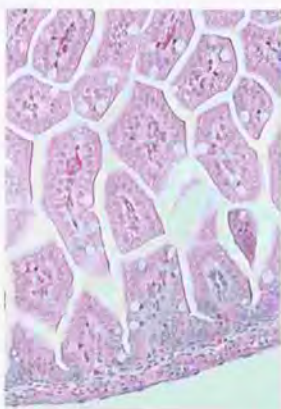
N(-/-)K(+/-)

Wild-type

**After
Suckling
(P0)**



**Before
Suckling
(E18.5)**



H(-/-)N(+/-)K(+/-)マウスのように、乳糜腹水の貯留が起こっても、必ずしも死に至るわけではないことから、離乳時に期待値に近い数が生存している他の遺伝子型も調べた。自然交配および体外受精-胚移植により生産した *ras* 遺伝子欠損マウスについて、哺乳後の乳糜腹水の有無についてチェックした。遺伝子型にかかわらず P0(誕生日)から P1 にかけて、発症が確認できる程度に乳糜腹水が貯留した。また、同じ遺伝子型のマウスを自然交配と体外受精-胚移植の両方で生産しても、双方で同様に乳糜腹水の貯留が認められた。自然交配により生産したマウスの遺伝子型と乳糜腹水の発症率、発症個体の致死率をまとめると、それぞれ表 5A、5B のようになる。多くの遺伝子型で乳糜腹水の貯留が観察された。*ras* 遺伝子の欠損が進むほど、すなわち表の右側、下側に進むほど、発症率や致死率が高くなる傾向にあった。

H-	N-	K-ras	
		+/+	+/-
+/+	+/+	0 / 96 (0)	0 / 99 (0)
+/-		0 / 23 (0)	0 / 15 (0)
-/-		2 / 228 (1)	20 / 135 (15)
+/+	+/-	0 / 70 (0)	5 / 76 (7)
+/-		0 / 30 (0)	6 / 20 (30)
-/-		2 / 175 (1)	35 / 37 (95)
+/+	-/-	2 / 237 (1)	6 / 6 (100)
+/-		5 / 153 (3)	胎生致死
-/-		64 / 137 (47)	胎生致死

表5A *ras*遺伝子多重欠損マウスの新生仔における乳糜腹水の発症率

乳糜腹水の発症率と発症個体の致死率について、様々な遺伝子型の*ras*遺伝子欠損マウスを自然交配によって生産し観察した結果をそれぞれ表5A、表5Bにまとめた。表の左側および上側に、各*ras*遺伝子の遺伝子型を示す。たとえば、表右下隅はH(-/-)N(-/-)K(+/-)という遺伝子型である。

表5Aの数字の分母は観察した各遺伝子型のマウスの数で、分子は乳糜腹水の貯留が観察されたマウスの数である。

カッコ内は発症した割合を%で示している。「胎生致死」は出生してこないで観察できなかった遺伝子型を示す。

H-	N-	K-ras	
		+/+	+/-
+/+	+/+	-	-
+/-		-	-
-/-		0 / 2 (0)	7 / 20 (35)
+/+	+/-	-	0 / 5 (0)
+/-		-	1 / 6 (17)
-/-		0 / 2 (0)	27 / 35 (77)
+/+	-/-	0 / 2 (0)	6 / 6 (100)
+/-		0 / 5 (0)	胎生致死
-/-		20 / 64 (31)	胎生致死

表5B 乳糜腹水を発症した*ras*遺伝子多重欠損マウスの死亡率

表5Bの数字の分母は、表5Aに示した発症個体数であり、そのうち離乳までに死亡したものを分子に示す。死亡する個体のほとんどは、生後5日までに死亡した。

H-*ras* 遺伝子導入マウスの導入遺伝子による *ras* 遺伝子多重欠損マウスの表現型の回復

次に、H-*ras* 遺伝子導入マウスと *ras* 遺伝子欠損マウスを交配し、H-*ras* 遺伝子導入 *ras* 遺伝子多重欠損マウスを作成し、*ras* 遺伝子多重欠損マウスで見られる表現型が回復するかどうかについて検討した(表6)。H-*ras* 導入遺伝子をもたない遺伝子型は表5Aのデータのもので、導入遺伝子をもつ遺伝子型はH-*ras* 遺伝子導入 *ras* 遺伝子多重欠損マウス生産の複数の組み合わせで得られた数の合計である。導入遺伝子を持つ多重欠損マウスでは、乳糜腹水の貯留が観察されなかった。また、新生仔期に採材したものでは、小腸の浮腫も観察されなかった。

H	N	K	Tg ^{H-ras}	
			-	+
-/-	-/-	+/+	64 / 137 (47)	0 / 9 (0)
-/-	+/-	+/-	35 / 37 (95)	0 / 13 (0)
+/+	-/-	+/-	6 / 6 (100)	0 / 14 (0)

表6 H-*ras*導入遺伝子による、*ras*遺伝子多重欠損マウスの表現型への影響

表の左側に*ras*遺伝子欠損の遺伝子型を示す。表右側の上部に、H-*ras*導入遺伝子の有無を示す。

数字は、表5A同様に乳糜腹水が観察された割合を示しており、H-*ras*導入遺伝子を持たない(-)ものは表5Aより引用している。H-*ras*導入遺伝子を持つ(+)場合、遺伝子欠損の種類にかかわらず、乳糜腹水が認められなかった。

1.4 考察

胎生期

ras 遺伝子欠損マウスについてはすでに *N-ras* 遺伝子 (12)、*K-ras* 遺伝子 (13, 14)、*N-ras* 遺伝子および *K-ras* 遺伝子同時欠損 (14) についての報告がある。*N(-/-)* マウスでは何の異常も認められなかったのに対し (12)、*K(-/-)* マウスは胎生致死であった (13, 14)。また、Johnson らは、*N(-/-)K(+/-)* マウスも胎生致死であり、*K(-/-)* マウスが同じ理由で死亡していると報告した (14)。

今回の結果では、確かに *N(-/-)K(+/-)* マウスの多くが胎生 15.5 日から 18.5 日にかけて死亡していたが (表 1)、その死亡原因は明らかにできなかった。胎生 18.5 日で採材し生存している個体や新生仔は見かけ上正常であり、心筋のひ薄化 (13) あるいは肝構造の異常や貧血、浮腫 (14) は認められなかった。

N(-/-)K(+/-) の新生仔は呼吸や哺乳、排泄を見かけ上正常に行っており、同腹の他の遺伝子型と見分けがつかない。しかし、哺乳後、腹腔への白色液体 (乳糜腹水) の貯留および小腸の浮腫が認められ (写真 1, 2)、P0-P1 で死亡した。このように、*N(-/-)K(+/-)* マウスでは胎生致死あるいは授乳期での死亡の 2 種類の表現型が現れる。したがって、*N-Ras* と *K-Ras* の相補的作用の重要な時期として、胎生期と新生仔期の 2 回があると考えられる。しかし、死亡時期が異なるだけで、実際には致死の原因が共通している可能性もある。

一方、*H(-/-)K(+/-)* マウスや *H(-/-)N(-/-)* マウスが個体として得られることから、*H-ras* のマウス発生過程への寄与は低いと考えられた。しかし、*H(-/-)K(-/-)* の胎仔は *K(-/-)* の胎仔よりも早い時期に死亡することがわかった。*H-Ras* が発現していて *K-Ras* が発現していない *K(-/-)* マウスは胎生 9.5-11.5 日では生存しており (13)、*H-Ras* の発現がなくて *K-Ras* が発現している *H(-/-)* マウスや *H(-/-)N(-/-)* マウスも正常に発生することから、胎生 9.5 日-11.5 日の発生過程で、*K-Ras* あるいは *H-Ras* を必要とする時期が存在することが示された。

H(-/-)N(-/-) マウスは出生するものの、約 4 分の 1 が *H(-/-)N(-/-)* マウスであると期待される組み合わせでは、期待値の半分程度しか出生しなかったため、半分が胎生致死であることが考えられた (表 3A, 3B)。しかし、*H(-/-)N(-/-)* マウスを親として用いた組み合わせでは、期待値通りに出生し、成長した (表 3C)。また、データは示さないが、*H(-/-)N(-/-)* マウス同士の交配では、野性型同様の産仔数 (6~9 匹) が得られている。したがって、*H(-/-)N(-/-)* マウス

は胎生期に死ぬことなく、正常に発生していると考えられる。また、繁殖能力も、雌雄ともに正常である。

以上のことから、H-Ras や N-Ras は生体内で発生に寄与しているが、K-Ras のみが発生に必要な十分であることがわかる。つまり、個体発生に必要な Ras を介するシグナル伝達系はすべて K-Ras によって制御可能であること、そして Ras を必要とする細胞すべてにおいて K-Ras が発現していることがわかる。

では、個体発生において H-Ras、N-Ras ではなく K-Ras が必須となっている理由が、Ras 間の構造と発現の相違からどのように説明できるだろうか。

第一に、K-Ras が H-Ras や N-Ras とシグナル伝達系を共有していることに加え、発生に重要な役割を果たす細胞において、K-Ras が H-Ras や N-Ras と異なるシグナル伝達系を独自に制御している可能性が挙げられる。この場合、K-Ras が構造上、特異的なシグナル伝達経路を制御している場合と、細胞で K-Ras のみが発現していることで結果的に単独で制御している場合が考えられる。

第二に、K-Ras は、発生に重要な役割を果たす細胞において H-Ras や N-Ras と同じシグナル伝達経路を共有しているが、下流に伝えるシグナルの量が他の Ras に比べ高いことが考えられる。このシグナルの量は、それぞれの Ras の分子あたりのシグナル強度と、細胞内での発現量に左右される。たとえば、3つの Ras のシグナル強度が同一であるとすると、発現量のみが問題となり、K-Ras が他の2つの Ras よりも細胞内で多く発現していることが考えられる。一方、シグナル強度に差があるとすると、K-Ras がシグナル強度と発現量の積で他の2つの Ras を上回っていることが考えられる。

ところが、胎生致死である K(-/-)マウスや N(-/-)K(-/-)マウスが、前述の H-ras 導入遺伝子(16)によって成熟個体にまで発生することが中村らによって見出されている(15)。N(-/-)K(-/-)Tg マウスは H(-/-)N(-/-)マウスが K-Ras のみで発生するのは対照的に、H-Ras のみで発生している。個体発生における K-Ras の役割は H-Ras で代替できることから、発生に重要なシグナル伝達経路は2つの Ras 間で共有できることが明らかである。したがって、第一に挙げた可能性のうち、K-Ras が特異的なシグナル伝達経路を制御することによる可能性は否定できる。

しかし、胎生期における3つの ras 遺伝子の発現はいずれも全身性であること、H-ras 導入遺伝子が内在性の ras 遺伝子の発現を上回る量で全身に発現していることが *in situ* ハイブリダイゼーション解析の結果わかっており(15)、K-Ras のみが発現する細胞が存在するの否か、K-Ras 欠損による変化が量的にどれほどの H-Ras の発現によって回復し得るのかといった問題は未解決であるので、上記の他の可能性は残されている。

古恵良らは、 $K(-/-)$ マウスが胎生致死となる原因が、心筋壁のひ薄化による心機能の低下にあると報告した(13)。しかし、心筋壁のひ薄化に先立ち、胎生11.5日で野性型の胎仔でも観察される神経細胞のアポトーシスが、 $K(-/-)$ の胎仔で亢進していることも見出した(13)。この心筋と神経細胞の変化に因果関係があるか否かは明らかでないが、心臓の変化が心筋細胞以外の細胞での変化による可能性があることを念頭に置く必要がある。

したがって、 $N(-/-)K(+/-)$ マウスや $H(-/-)K(-/-)$ マウスの場合、胎生致死が何種類、何段階の変化によるのかという問題に加え、死に至る変化が、2種類のRasの欠損が同じ細胞内で起こることに端を発しているのか否かという問題がある。そのため、個体発生における3つのRasの機能重複を考える場合、「機能」が細胞内シグナル伝達での機能を意味するのか、それとも独立した細胞で起こる生理機能を意味するのかを、より詳細な解析によって明らかにしなければならない。

新生仔期

ras 遺伝子多重欠損マウスを作成した結果、生存の点では $H(-/-)N(-/-)$ マウスや $H(-/-)N(+/-)K(+/-)$ マウスまでが正常の範疇に入り、 $N(-/-)K(+/-)$ マウスあるいは $K(-/-)$ マウスおよびそれ以上に*ras* 遺伝子が欠損したものは胎生致死の範疇に入った(図4)。

しかし、 $N(-/-)K(+/-)$ マウスの新生仔期における死亡個体に見られた腹腔内の異常、乳糜腹水と小腸の浮腫は、他の遺伝子型にも共通して見られることが明らかになった(表5)。この表現型の詳細は第2章で説明するが、乳糜腹水と小腸の浮腫はどの遺伝子型においても常に併発することから、発症した新生仔は遺伝子型にかかわらず同じ原因によって発症していると考えられる。また、腹水と浮腫も、共通の原因によって起こっているか、どちらか一方が2次的に起こっているかのどちらかであると考えられる。

H-ras と *N-ras*、*N-ras* と *K-ras*、*H-ras* と *K-ras* いずれの組み合わせの遺伝子欠損によっても同じ表現型を示す新生仔が得られ、また $N(+/-)K(+/-)$ マウスが7%の発症率であるのに対して *H-Ras* の発現が減少した $H(+/-)N(+/-)K(+/-)$ マウスでは発症率が30%、同様に $K(+/-)$ マウス0%に対して *N-Ras* の発現が減少した $N(+/-)K(+/-)$ マウスが7%、 $H(-/-)N(+/-)$ マウス1%に対して *K-Ras* の発現が減少した $H(-/-)N(+/-)K(+/-)$ マウスが95%と、どのRasの減少によっても同

一表現型の発症率の上昇が見られる。また、H-Ras あるいは N-Ras、あるいはその両方を欠損させても同一の表現型が生じている(表5A)。これらの結果から考えて、いずれの Ras 欠損によっても同じ細胞に変化が生じることで発症に至る可能性が高い。

また、H-*ras* 遺伝子導入マウスと交配させることによって得た H-*ras* 遺伝子導入 *ras* 遺伝子多重欠損マウスでは、乳糜腹水や小腸の浮腫が認められなかった。H-Ras と N、K-Ras が独立して発症に影響しているならば、導入遺伝子由来の H-Ras によって H-*ras* 遺伝子欠損による変化のみが回復すると考えられる。ところが、H-*ras* 遺伝子欠損による影響のみならず、N-*ras* や K-*ras* 遺伝子欠損のみによる表現型の出現も抑えられた(表6)。したがって、この表現型にそれぞれの Ras が独立して影響している可能性は極めて低い。

発症へのそれぞれの Ras の関与については、N(-/-)K(+/-)マウスの発症率が100%であるのに対して、H(-/-)K(+/-)マウスでは15%であることから、N-Rasの方がH-Rasより大きく影響していることがわかる。また、H(-/-)マウスで発症率が1%であるのに対して、K-*ras* 遺伝子の1対立遺伝子の欠損が加わったH(-/-)K(+/-)マウスでは15%、N-*ras* 遺伝子の1対立遺伝子の欠損が加わったH(-/-)N(+/-)マウスでは1%である。このH(-/-)N(+/-)マウスにさらにK-*ras* 遺伝子の1対立遺伝子の欠損が加わったH(-/-)N(+/-)K(+/-)マウスでは95%であるのに対し、N-*ras* 遺伝子の1対立遺伝子の欠損が加わったH(-/-)N(-/-)マウスでは47%である。つまり、K-Rasの方がN-Rasより大きく影響する。

K(+/-)マウスが0%、N(-/-)マウス、H(-/-)マウスが共に1%と、単独の減少では影響力にほとんど差がないことから、2種類あるいは3種類のRasの減少による発症への相乗効果も考慮する必要があるが、K-Ras > N-Ras > H-Rasの順序で大きく影響していることがわかる。

以上のことから、3つのRasが同一細胞で機能し、K-Ras > N-Ras > H-Rasの順序で細胞の変化に影響を及ぼしていることが考えられる。シグナル伝達系を共有している場合、個体発生におけるK-Rasの必須性について先ほど論じたように、Rasの分子あたりのシグナル強度と細胞内での発現量によって、下流に伝達されるシグナルの量が決定されると考えられる。上記のRasの順位は、シグナル強度と発現量の積の大きさを示していることになる。一方、シグナル伝達経路は異なっても、下流でシグナルが統合される可能性もあるので、各Rasが、経路は異なるが同じ効果をもたらすシグナル伝達系を制御していることも考えられる。この場合、Rasの順位は各シグナル伝達系の影響力の順位ということになる。しかし、これらの可能性について検討するには、まず*ras*遺伝子欠損で1次的に変化の生じた細胞が何であるのかを同定する必要がある。

1.5 参考文献

- 1 Barbacid M ; ras genes. *Annual Review of Biochemistry* 1987 56:779-827
- 2 Lowy DR, Willumsen BM ; Function and regulation of ras. *Annual Review of Biochemistry* 1993 62:851-891
- 3 Campbell SL, Khosravi-Far R, Rossman KL, Clark GJ, Der CJ ; Increasing complexity of Ras signaling. *Oncogene* 1998 17:1395-1413
- 4 Leon J, Guerrero I, Pellicer A ; Differential expression of the ras gene family in mice. *Molecular and Cellular Biology* 1987 7(4):1535-40
- 5 McGrath JP, Capon DJ, Smith DH, Chen EY, Seeburg PH, Goeddel DV, Levinson AD ; Structure and organization of the human Ki-ras proto-oncogene and a related processed pseudogene. *Nature* 1983 304(5926):501-6
- 6 James GL, Goldstein JL, Brown MS ; Polylysine and CVIM sequences of K-RasB dictate specificity of prenylation and confer resistance to benzodiazepine peptidomimetic in vitro. *Journal of Biological Chemistry* 1995 270:6221-6226
- 7 Mizuno T, Kaibuchi K, Yamamoto T, Kawamura M, Sakoda T, Fujioka H, Matsuura Y, Takai Y ; A stimulatory GDP/GTP exchange protein for smg p21 is active on the post-translationally processed form of c-Ki-ras p21 and rhoA p21. *Proceedings of National Academic Sciences in USA* 1991 88:6442-6446
- 8 Sieburth DS, Sun Q, Han M ; SUR-8, a conserved Ras-binding protein with leucine-rich repeats, positively regulates Ras-mediated signaling in *C.Elegans*. *Cell* 1998 94(1):119-30
- 9 Sorrentino V, McKinney MD, Giorgi M, Geremia R, Fleissner E ; Expression of cellular protooncogenes in the mouse male germ line: a distinctive 2.4-kilobase pim-1 transcript is expressed in haploid postmeiotic cells. *Proceedings of National Academic Sciences in USA* 1988 85(7):2191-5

- 10 Pells S, Divjak M, Romanowski P, Impey H, Hawkins NJ, Clarke AR, Hooper ML, Williamson, DJ ; Developmentally-regulated expression of murine K-ras isoforms. *Oncogene* 1997 15(15):1781-6
- 11 Bos JL ; The ras gene family and human carcinogenesis. *Mutation Research* 1988 195(3):255-71
- 12 Umanoff H, Edelmann W, Pellicer A, Kucherlapati R ; The murine N-ras gene is not essential for growth and development. *Proceedings of National Academic Sciences in USA* 1995 92(5):1709-13
- 13 Koera K, Nakamura K, Nakao K, Miyoshi J, Toyoshima K, Hatta T, Otani H, Aiba A, Katsuki M ; K-ras is essential for the development of the mouse embryo. *Oncogene* 1997 15(10):1151-9
- 14 Johnson L, Greenbaum D, Cichowski K, Mercer K, Murphy E, Schmitt E, Bronson RT, Umanoff H, Edelmann W, Kucherlapati R, Jacks T ; K-ras is an essential gene in the mouse with partial functional overlap with N-ras. *Genes and Development* 1997 11(19):2468-8111
- 15 中村 健司、中尾 和貴、市瀬 広武、古恵良 桂子、八田 稔久、大谷 浩、阪上 洋行、近藤 尚武、饗場 篤、勝木 元也 ; 投稿準備中
- 16 Saitoh A, Kimura M, Takahashi R, Yokoyama M, Nomura T, Izawa M, Sekiya T, Nishimura S, Katsuki M ; Most tumors in transgenic mice with human c-Ha-ras gene contained somatically activated transgenes. *Oncogene* 1990 5(8):1195-200
- 17 Robertson E, Bradley A, Kuehn M, Evans M ; Germ-line transmission of genes introduced into cultured pluripotential cells by retroviral vector. *Nature* 1986 323: 445-8
- 18 Toyoda Y, Yokoyama M, Hoshi T ; *Japan Journal of Animal Reproduction* 1971 16:147-151
- 19 Whitten WK ; *Advances in Bioscience* 1974 6:129-141

- 20 Nakao K, Nakagata N, Katsuki M ; Simple and efficient vitrification procedure for cryopreservation of mouse embryos. *Experimental Animal* 1997 46:231-234
- 21 Whittingham DG ; Embryo banks in the future of developmental genetics. *Genetics* 1974 78:395-402
- 22 Nakagata N ; *Japan Journal of Fertility and Sterility* 1989 34:757-760
- 23 *Molecular Cloning : A Laboratory Manual* 2nd Edition CSH lab. press.
- 24 *Current Protocols in Molecular Biology*, Wiley
- 25 発生工学実験マニュアル、勝木 元也 編 講談社
- 26 都築 利奈、北里大学学部卒業研究 1998.

第2章

ras 遺伝子多重欠損マウスに観察される 乳糜腹水および小腸浮腫の解析

2.1 はじめに

第1章で示したように、*ras* 遺伝子多重欠損マウスの様々な遺伝子型の新生仔において、乳糜腹水の貯留と小腸粘膜下層の浮腫という共通の表現型が認められることが明らかになった。このことから、H、N、K-Ras の機能重複の可能性が強く示唆されたが、Ras が細胞内シグナル伝達の分子である以上、どのような細胞でのシグナル伝達が表現型に結びついたのか、どのような細胞内での機能重複があるのかが問題となる。*ras* 遺伝子欠損によって異常の生じた細胞の同定を目的として、乳糜腹水および小腸の浮腫の発症や経過、組織像を観察した。

2.2 材料と方法

組織学的検索

新生仔は、氷上で冷却して運動を抑制した後、保定し、皮膚を切開して体幹部を露出させた。矢状断で新生仔全体の切片を作製するものは、そのまま1-2時間固定した後、胸壁および腹壁を一部切開して穴を開けさらに固定を続けた。また、腸管を切り出して切片を作製するものは、最初から腹腔および胸腔を開いて固定した。固定液にはすべて4%パラホルムアルデヒド/リン酸緩衝液(pH 7.4)を用い、4℃で振とうして、一晩以上固定した。

固定後、PBS(-) (pH 7.4)で洗浄したのち、自動包埋機(サクラ精機)を用いてパラフィンブロックを作成した。新生仔全体の包埋では、全工程で振とうを行い、70%エタノール3回、80%エタノール2回、90%エタノール2回、100%エタノール2回、クロロホルム2回を室温で各回2時間ずつ行い、次いでパラフィン3回を60℃で脱気しながら各回2時間ずつ行った。切り出した臓器の包埋では、全行程を1時間にした以外は新生仔全体の包埋と同様に処理した。

組織切片は 5 μ m の厚さに薄切し、脱パラフィン後エタノール処理を経て水に戻し、ヘマトキシリン・エオジン染色を行い、脱水、透徹を経て封入し、観察した。

新生仔の経時的採材

経時的採材は、体外受精-胚移植によって得た新生仔を用いた。胚移植の受容雌に膈栓が確認された日を胎生 0.5 日とした時の胎生 19.5 日の午前 2 時頃から午前 6 時頃にかけて、自然分娩あるいは帝王切開によって新生仔を得た。自然分娩の場合は分娩後、親が蘇生させた仔を逐次分離した。分離後 1 時間保温した後、そのまま採材するものと母親あるいは里親に 12 時間つけて哺乳させるものに分け、前者を哺乳開始後 0 時間として、後者は哺乳開始後 12 時間として採材した。里親には、胚移植の受容雌マウスと同じ日に、自然交配での膈栓が確認された雌マウス (MCH:ICR、日本クレア) を使用した。

タンパク質解析

新生仔の経時的採材で述べた方法で得た哺乳開始後 0 時間の新生仔を用いた。新生仔を氷冷し、動きが鈍くなったところでピンで保定して開腹した。胃から肛門にいたる消化管を切り出して氷冷したディッシュ上に移し、胃、脾臓、腸間膜、大腸から小腸を分離した。小腸はホモジナイザーを用い、氷冷下でタンパク質抽出用緩衝液 (extraction buffer ; 15mM EGTA, 1% Triton-X100, 60mM sodium β -glycerophosphate, 30mM *p*-nitrophenylphosphate, 25mM Mops (pH7.2), 15mM MgCl₂, 0.2mM Na₂VO₄, 5mM NaF, 1mM dithiothreitol (DTT), 2 μ g/ml leupeptin, 2 μ g/ml aprotinin, 1 μ g/ml pepstatin, 1mM phenylmethylsulphonyl fluoride (PMSF)) に均一な懸濁液になるまですりつぶした。その後、超音波破砕機でさらに処理した。タンパク質濃度は、Pierce 社の BCA 測定キットを用いて決定した。こうして得たタンパク質 20 μ g を用いてウェスタンブロットを行った。Laemmuli の方法に従い、12%アクリルアミドゲルの SDS-PAGE で 35mA、3 時間泳動した。分子量マーカーにはレインボーマーカー (バイオ・ラド社) を用いた。泳動終了後、セミドライ法で PVDF メンブレン (バイオ・ラド社) に転写した。転写後のメンブレンはブロックエース (雪印) で 4 $^{\circ}$ C、12-16 時間ブロッキングした後、ウェスタンブロット解析を行った。Ras のウェスタンブロット解析には、H、N、K-Ras に共通のエピトープを認識するマウスモノクローナル抗体、pan-Ras Ab-3 (Oncogene Research 社) を使用した。TBST 溶液に 1:50 で希釈したものを 1 次抗体反応液とし、室温で

1時間メンブレンを反応させた。メンブレンは TBST 溶液で 4 回、5 分間ずつ洗浄し、マウスに対する 2 次抗体 (SantaCruz 社) を 1:2,000 で希釈したものを 2 次抗体反応液として、室温で 1 時間反応させた。終了後、TBST 溶液で 4 回、5 分ずつ洗浄した後、ECL plus キット (アマシャム・ファルマシア社) を用いて、X 線フィルムに感光させてバンドの検出を行った。

RT-PCR

タンパク質解析の際と同様に小腸を単離し、液体窒素存在下で乳鉢を用いて粉末状にした。液体窒素とともにチューブに移し、液体窒素を気化させると同時に TRIzol 溶液 (Gibco BRL 社) を加え、ボルテックスで均一になるまで混合した。室温で 2-3 分静置後、クロロホルムを 1/5 量加え、ボルテックスで混合し、14,500rpm で 10 分間遠心し、水層を分離した。水層に等量のイソプロパノールを加え、室温で 5 分間放置した後、10,000rpm で 10 分間遠心し、沈殿を得た。沈殿は 70%エタノールで洗浄後、5-10 分間風乾し、DEPC 処理水を加えて 55°C で溶解した。溶解後、DNaseI 処理緩衝液および DNaseI を加え、37°C で 1 時間反応させた。反応終了後、再び上記の方法で TRIzol による RNA の分離、抽出を行い、ジエチルピロカーボネート処理水 (DEPC 処理水) に溶解した。その一部はホルムアルデヒド法で電気泳動し、エチジウムブロマイドで染色、脱染後 UV 照射下でゲルを観察し、RNA が分解されることなく抽出されていることを、リボゾーム RNA のバンドの存在を指標に確認した。また、一部は紫外線吸光度法で濃度を決定し、ゲルの染色結果と合わせて確認した。こうして得たトータル RNA を用いて、cDNA 合成を行った。逆転写反応には SuperScript Preamplification system (Gibco BRL 社) を用いて、ランダムプライマー、dT プライマーを使用しそれぞれ単独に cDNA を合成した。なお、反応は RNase インヒビター (ペーリンガーマンハイム社) 存在下で行った。反応終了後、TE 緩衝液を加えて保存し、PCR に用いた。

VEGF-C、VEGF-D、Flt-4、GAPDH の RT-PCR には、合成した cDNA 20ng を鋳型として使用し、ExTaq ポリメラーゼ (TAKARA) を用いて 20 μ l 反応系で反応を行った。94°C 2 分の処理後、94°C 30 秒、60°C 30 秒、72°C 30 秒のサイクルを 30 サイクル行い、72°C で 4 分間処理して終了した。反応液の 5 μ l を 2%アガロースゲル、1 \times TBE 緩衝液で 30-40 分泳動した。エチジウムブロマイドで染色、脱染後、UV を照射し写真撮影して発現の有無を検討した。用いたプライマーの配列は、

Flt-4

forward 5' AGACCTGGAAGCAGCGACAG 3'

reverse 5' ACGCCGAAGGACCACACATC 3'

VEGF-C

forward 5' AGCAGTTGCCGTCTGTGTCC 3'

reverse 5' CGGCAGGAAGTGTGATTGGC 3'

VEGF-D

forward 5' TCCATGTGTA CTGGTG CAG 3'

reverse 5' CTCTTCGTTGCAGCAGCCTC 3'

GAPDH

forward 5' CTC AAGATTGTCAGCAATGC 3'

reverse 5' CAGGATGCCCTTAGTGGGC 3'

である。

2.3 結果

乳糜腹水の観察

乳糜腹水の貯留が認められた新生仔の経過は、N(-/-)K(+/-)マウスの場合を除いて(第1章)、他の遺伝子型で共通していた。

自然交配生産による新生仔の観察では、生後2日以降になってはじめて貯留が確認されるものもまれに存在したが、最終的に貯留が認められる新生仔のほとんどは、生後0-1日で確認された。自然交配では出生および哺乳開始時刻を特定するのが困難なので、帝王切開して里親につけた新生仔の観察を行った。その結果、親が授乳行動を開始してから早くも3時間ほどで貯留が顕著になる新生仔が現れた。さらに時間が経つにつれ新たに貯留が認められるようになり、最終的に貯留が認められる新生仔は授乳開始12時間後までに確認された。

乳糜腹水の発症後、生存する個体では、早いものは生後1日で貯留が認められなくなったが、多くは生後2、3日で認められなくなった。生後4、5日でも認められる個体が存在したが、成長は発症していないものと同様で、大きさに変わりがなかった。生後5日を越えると腹壁が厚くなって外からの観察が困難になり、貯留の有無が判定できなかったが、生後4週以降に開腹した例では貯留が認められなかった。

発症後死亡する個体は生後0日から認められたが、多くは生後3日から5日の間に痩せ衰えて死亡した。生存時から腹壁を通して小腸の異常が認められ、死亡後解剖してみると長さや太さ、外観が異常で、伸縮性を失っていた(写真1)。また、1例と、まれであるが生後2週で凝乳様物質の蓄積が認められて死ぬケースもあった(写真2)。

観察した新生仔では、皮膚や四肢のむくみ、浮腫は認められなかった。また、乳糜腹水が貯留し死亡した個体の解剖の結果、いずれも胸水の貯留は認められなかった。

写真1 生後5日目における正常なマウスの胃腸管と、
乳糜腹水が観察され死亡した*ras*遺伝子欠損
マウスの胃腸管の比較

上段左側は生後5日目の野性型マウスから採材した胃腸管。
上下段ともに右側はH(-/-)N(+/-)K(+/-)マウス、下段左側は
H(-/-)N(-/-)マウスで、ともに生後5日目に死亡した直後の
胃腸管。野性型に比べ、死亡したマウスの小腸は短く伸縮性
に欠け、色調も異常である。

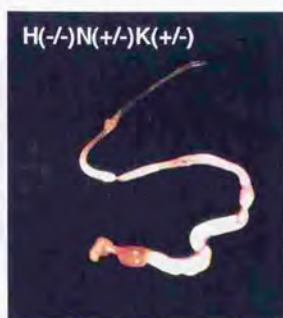


写真2 生後2週目で死亡したH(-/-)N(-/-)マウスに見られる腹腔内異常

死亡時、腹腔が膨れていたが、触ると硬い感触であった。皮膚を切開しても透過性が悪く、内部臓器の様子がわからない(A)。筋層を開くとチーズ状の白い物質が腹腔のほとんどを占めており(B)、腹腔内臓器の存在が確認できない。



腸管の外観と組織像

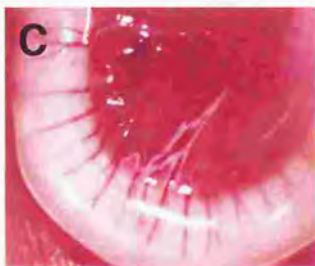
哺乳開始後 0 時間、すなわち未哺乳の新生仔では、遺伝子型にかかわらず、腸管の色調の変化や浮腫と思われる変化は認められなかった。しかし、哺乳開始後 12 時間では、乳糜腹水の貯留に加え、十二指腸の C 字状領域の途中に始まり空腸、回腸と続くリンパ浮腫が認められた(写真 3)。また、膵臓の実質と被膜との間に乳糜腹水と同じ成分と思われる白色液体の貯留が認められた(写真 3、D および F)。この十二指腸での変化は共通して見られたが、その下流の浮腫の範囲は個体によって違いがあった。小腸の広い領域にわたって見られるものもいたが(写真 3、C)、部分的に見られるものもあった(写真 3、E)。一方、胃、盲腸や大腸には浮腫は生じなかった。他の主要臓器、脳、胸腺、肺、心臓、肝臓、腎臓、膀胱、骨格筋、皮膚でも、小腸で見られたような浮腫性病変は確認されなかった。また、哺乳開始後 12 時間では、腸間膜のリンパ管の一部が乳糜液で白濁しており(写真 3、A、C、E)、乳糜腹水が認められる個体でもリンパ管が存在することがわかった。

哺乳開始 0 時間では、哺乳後乳糜腹水が観察される可能性が高い遺伝子型であっても、野性型同様の組織像であり、上皮を含む粘膜、粘膜筋板、粘膜下層、2 層の平滑筋層や神経叢、漿膜といった基本構造を有していた。しかし、哺乳開始後 12 時間で乳糜腹水の貯留が認められたものでは、小腸の粘膜下層に浮腫病変が認められた。この病変は、遺伝子型にかかわらず、乳糜腹水が貯留した個体に共通して認められた(第 1 章の写真 3)。脳、胸腺、肺、心臓、肝臓、腎臓、膀胱、骨格筋、皮膚では、哺乳前後や遺伝子型を問わず、浮腫病変が認められなかった。

写真3 哺乳後12時間における新生仔の小腸の外観

上段(A, B)が野性型、中段(C, D)および下段(E, F)がH(-/-)N(-/-)マウスであり、左側に空腸-回腸、右側に十二指腸および膵臓の外観を示す。ここで観察したH(-/-)N(-/-)マウスでは、ともに乳糜腹水の貯留が認められた。これらのマウスの十二指腸および膵臓では腸管の浮腫と膵臓被膜内への白色液体の貯留が認められる(D, F)。空腸-回腸でも浮腫が認められるが、1例では浮腫が広範囲に生じているが(C)、もう1例では局所的に浮腫が生じている(E)。

なお、血管に沿って走行するリンパ管が、吸収したキロミクロンで白く見えている(A, C, E)。

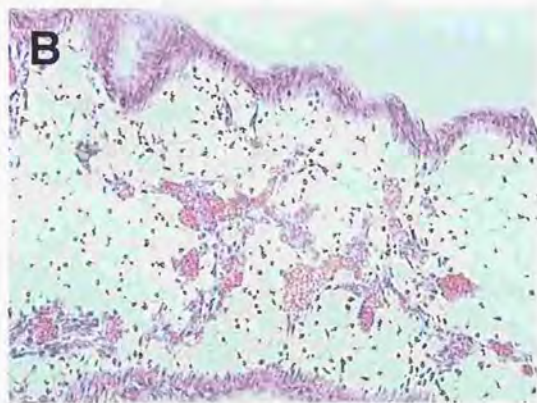
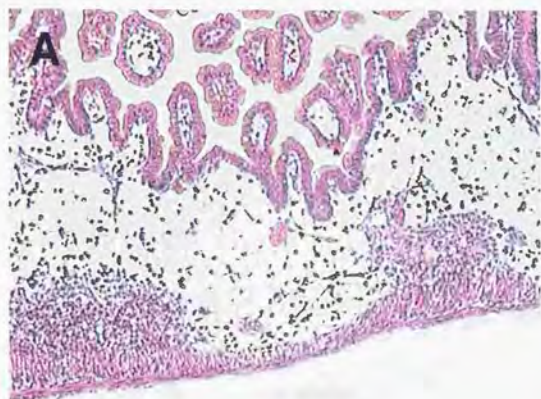


生後2日のH(-/-)N(-/-)マウスの、発症、未発症の両方の個体について、小腸の組織像を観察したところ、発症したマウスの小腸では浮腫病変が進行し、上皮の連続性は保たれているものの、絨毛内部の構造や粘膜筋板の構造が失われていた(写真4, A)。その一方で、粘膜下層での線維芽細胞の集積(写真4, A)や血管新生(写真4, B)が顕著になっていた。

次に、生後5日のH(-/-)N(-/-)マウスでも小腸の組織像を観察したところ、発症後の個体で、観察の経験上まもなく死亡すると考えられるものでは(写真5, A および B の右端)、小腸の粘膜の剥離、平滑筋や漿膜の細胞の形態変化や壊死が認められた(写真6, C)。一方発症したものの未発症のものと同様ならず成長している個体(写真5, A および B の中央)では、粘膜下層での線維芽細胞の増殖や血管新生により、未発症個体(写真5, A および B の左側)の小腸(写真6, A)に比べ粘膜下層が肥厚しており、浮腫が回復していた(写真6, B)。

写真4 乳糜腹水が認められたマウスの、
生後2日目の小腸の組織像

遺伝子型はH(-/-)N(-/-)である。浮腫病変が進行し、
絨毛内部や粘膜筋板の構造が失われ、上皮が剥離した
状態にあるが、粘膜下層での線維芽細胞の集積(A)や
血管新生像(B)が顕著になっている。






写真5 生後5日目のH(-/-)N(-/-)マウスの発生の違い

遺伝子型はいずれもH(-/-)N(-/-)であるが、乳糜腹水の貯留が認められない個体(A, B左端)と認められる個体(A, B中央および右端)の外観を示す。乳糜腹水が認められる個体は出生日以來貯留が観察されており、生後5日目でもなお貯留が続いている(A中央および右端)。写真中央の個体は未発症個体(A, B右端)と成長がほとんど変わらないが(A, B中央)、写真右端の個体は明らかに成長が遅れている(A, B右端)。

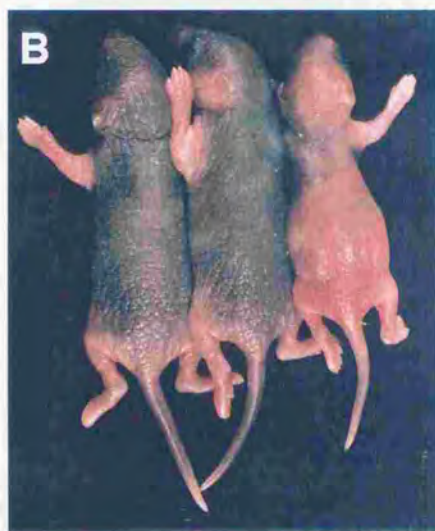
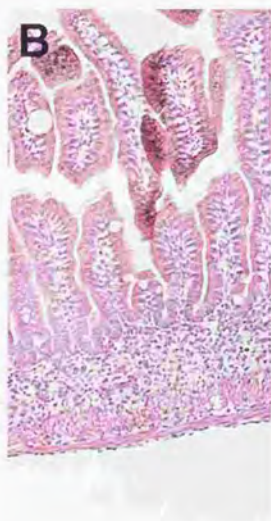
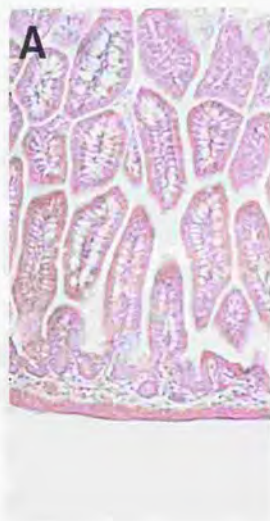


写真6 生後5日目の、乳糜腹水発症の有無による
小腸組織像の違い

写真5に示した個体の小腸の組織像で、写真5の順番同様に並んでおり、(A)が未発症個体、(B)が発症個体で成長が良好な個体、(C)が発症個体で成長が遅れている個体のものである。(B)は(A)に比べ粘膜下層が線維芽細胞や血管によって肥厚しており、浮腫病変の修復が起こっている。一方、(C)は粘膜の剥離や平滑筋層の壊死が見られ、修復されている様子がない。



新生仔小腸における Ras の発現

新生仔小腸における Ras の発現について、H、N、K-Ras のすべてを認識する抗 pan-Ras 抗体 (Ab-3, oncogene research 社) で調べた。用いた新生仔の遺伝子型は、写真 7 の左側から野性型、H(-/-)、H(-/-)N(+/-)、H(-/-)N(-/-)、H(-/-)N(+/-)K(+/-)、H(-/-)N(+/-)K(+/-)Tg^{fl-Ras} の順であり、発症率はそれぞれ 0%、0%、1%、47%、95%、0%である (第 1 章、表 5A、表 6)。

Ras の発現量は、発症率が高くなるほど減少する傾向にあり、発症しない H(-/-)N(+/-)K(+/-)Tg^{fl-Ras} の新生仔では野性型同様のレベルにまで発現量が回復していた。しかし、発症率の高い H(-/-)N(+/-)K(+/-)マウスの方が、発症率が中程度の H(-/-)N(-/-)マウスより、Ras の発現が高かった。また、両者を H(-/-)N(+/-)マウスと比較すると、N-Ras の発現が K-Ras の発現よりも多いことがわかった。

新生仔小腸における VEGF-C、VEGF-D、Flt-4 (VEGFR-3) の発現

ras 遺伝子欠損マウスの新生仔小腸の cDNA を用いて、RT-PCR を行った。逆転写反応を行っていないものでは、PCR 反応によるバンドが検出されないことを確認してある。リンパ管特異的に発現している受容体型チロシンキナーゼ、Flt-4 (VEGFR-3) (1, 2) や、そのリガンドでリンパ管新生を促進することが知られる増殖因子 VEGF-C (3, 4, 5)、VEGF-C 同様に Flt-4 のリガンドとなり得る VEGF-D (6, 7, 8) は、表現型が生じるのがまれな H(-/-)N(+/-)マウス (写真 8、レーン 1, 2) と、ほぼ 100% 表現型が出現する H(-/-)N(+/-)K(+/-)マウス (写真 8、レーン 3, 4) のいずれにおいても発現していた。

写真7 新生仔小腸におけるRasの発現（次頁上段）

未哺乳の*ras*遺伝子欠損マウスの新生仔より単離した小腸のタンパク質各20 μ gを用いて、Rasのウェスタンブロット解析を行った。用いた抗体は、H, N, K-Rasすべてを認識するpan-Ras抗体(Oncogene Research社)である。

遺伝子型は1番から6番まで順に、野性型、H(-/-)、H(-/-)N(+/-)、H(-/-)N(-/-)、H(-/-)N(+/-)K(+/-)、H(-/-)N(+/-)K(+/-)Tg^{H-ras}である。

写真8 新生仔小腸における、リンパ管形成に関与すると考えられる遺伝子群の発現（次頁下段）

リンパ管の異常が乳糜腹水および小腸浮腫の原因である可能性があるため、近年急速に研究されている、リンパ管形成に関与すると考えられる遺伝子について、RT-PCRで発現の検討を行った。

未哺乳の新生仔より単離した小腸から抽出したtotal RNAを用いてcDNAを合成し、各反応に20ngずつを鋳型として使用した。レーン1、2がH(-/-)N(+/-)マウス、レーン3、4がH(-/-)N(+/-)K(+/-)マウスである。最下段のGAPDHは陽性対照である。



2.4 考察

ras 遺伝子欠損マウスでは、肉眼観察によって、どの *Ras* の減少によっても同一の表現型が出現すると考えられたが、第1章の $N(-/-)K(+/-)$ マウスで見られたような小腸粘膜下層の浮腫が他の遺伝子型においても生じており、確かに同じ変化が生じていると考えられた。また、HE 染色では、哺乳前のいずれの遺伝子型においても小腸を構成する細胞は存在すると見られ、生後 0 日の哺乳後の浮腫を生じた組織でも同様であった。

哺乳後 12 時間における小腸浮腫の外観を観察したところ、十二指腸途中から浮腫が見られる点、脾臓被膜下に乳糜液が貯留している点が、すべての発症マウスに共通して観察されたが、空腸、回腸での浮腫の発生に個体差が見られた。写真 3 のように、空回腸全体に認められるものもいるが、局所的に認められるものもいた。局所的に認められる浮腫が、回復して一部で見られるようになったのか、局所的に発生したのか区別できないが、小腸で部分的に異常が生じている可能性も考えられる。

発症個体のほとんどは生後 5 日以内に乳糜腹水が見られなくなった。また、発症後死亡するものの多くは遺伝子型にかかわらず、生後 3-5 日に死亡した。死亡直後の腸管の外観は白く、伸縮性を欠いたびつな形をしていたが、 $H(-/-)N(-/-)$ マウスと $H(-/-)N(+/-)K(+/-)$ マウスでは外観上区別がつかず(写真 1)、組織像も共に壊死がひどく、差が認められなかった。組織修復について観察したところ、乳糜腹水が見られる生後 2 日の $H(-/-)N(-/-)$ マウスの小腸では、粘膜の損傷や平滑筋層のひ薄化が顕著になる一方、浮腫領域で血管新生像が多く認められた(写真 4)。発症した $H(-/-)N(-/-)$ マウスのうち、生後 5 日の時点で生き残ると見られる個体では、粘膜下層に線維芽細胞の集積や血管新生が見られ正常に戻りつつあるのに対し、発生が遅れ死亡すると見られる個体では、粘膜の剥離や平滑筋層のひ薄化、壊死が見られた(写真 5、6)。これは、他の遺伝子型、 $H(-/-)N(+/-)K(+/-)$ マウスでも同様の結果であった。同一遺伝子型で発症後の異なる経過が観察されるが、異なる遺伝子型でも生存する場合、死亡する場合で経過が共通していることから、遺伝子型による組織の修復能の差はないと考えられる。

新生仔小腸における *Ras* の発現を、すべての *Ras* を認識する抗 pan-*Ras* 抗体で調べたところ、発症率と必ずしも相関しなかった。発症率の高い $H(-/-)N(+/-)K(+/-)$ マウスの方が、発症率が中程度の $H(-/-)N(-/-)$ マウスより、

Ras の発現が高かった(写真7)。H(-/-)N(+/-)マウスの発現と比較すると、N-Ras の発現が K-Ras の発現よりも多いことがわかる。K-Ras は成熟個体の小腸で全体的に発現が認められているので(9)、K-Ras の発現パターンの特異性を反映しているわけではない。したがって、K-Ras が質的に他の Ras より強く機能していることや、K-Ras が発症の原因となる細胞で他の細胞よりも強く発現していることが考えられる。

第1章で考察したように、3つの Ras は、この表現型の原因となる1次的変化の生じる細胞でいずれも発現し、シグナル伝達経路を共有している可能性が高い。そしてこの表現型が回復可能であることから、その細胞は欠損しているわけでも機能を喪失しているわけでもなく、増殖可能あるいは機能回復可能な細胞であることがわかる。したがって細胞数の減少あるいは機能の低下が起きていると考えられるが、その候補は小腸あるいは小腸以外の組織のどちらに求められるであろうか。

この異常の原因を考えるうえでヒントとなるのが、ヒトの乳糜腹水の症例である。ヒトで腹腔にキロミクロンを含むリンパ液の漏出、貯留が起こることがある。外傷や手術時の損傷、腫瘍形成などで起こる2次性の報告が多いが、新生児に起こる1次性の報告もあり、遺伝性であると考えられている(10)。乳糜腹水が貯留する原因として、リンパ管造影の結果からリンパ管の異常による漏出が考えられているが、明らかでない。しかし、食餌療法、高タンパク低脂肪乳を与え続けて自然回復を待つのが治療法の1つとして効果的であることから(10)、脂肪の吸収が発症に関与していることは明らかである。

脂肪の吸収や代謝について簡単に説明する。脂肪は胆汁リパーゼによってミセルとなり、小腸上皮に取り込まれる。吸収された脂肪は小腸上皮で代謝されてトリグリセリドとなる。次いで、このトリグリセリドとリポタンパク質から粒子状複合体、キロミクロンが形成される。小腸上皮の基底膜側に放出されたキロミクロンは、中心乳糜管と呼ばれる絨毛中心にある盲端のリンパ管内に取り込まれ、粘膜下層のリンパ管のネットワークで集合し、腸間膜リンパ管を通過して乳糜槽、胸管へと流れていき、血流と合流する。血流に入ったキロミクロンは、主に血管内皮細胞のリポタンパク質リパーゼによって代謝され、トリグリセリドとキロミクロン・レムナントとに分解されると考えられている。前者は筋や脂肪細胞に取り込まれて代謝源あるいは脂肪滴として蓄積され、後者は肝臓に取り込まれて他のコレステロールに代謝される(11)。

したがって、キロミクロンの輸送系もしくは代謝系、あるいはその両方に異

常が生じて表現型が現われると考えられる。様々な可能性が考えられるが、それぞれについて考察することにする。

(腸管内腔からの吸収の異常)

十二指腸や膵臓の発生を制御するホメオボックス遺伝子の欠損マウスでは、膵臓の欠損が見られ、生後数日で痩せ衰えて死亡した。これは膵機能の欠損による消化吸收不全に起因すると考えられている(12,13)。また、十二指腸上皮の機能的分化が遅れていることも報告されている(13)。しかし、乳糜腹水や小腸浮腫の報告はないので発症の1次的原因としてはこれらの異常は関係がないと思われる。上皮細胞については、*ras* 遺伝子欠損マウスで吸収異常、たとえば吸収の亢進が起こっている可能性も考えられる。この場合、吸収に対して輸送が追いつかないことが表現型出現の原因となると考えられる。生後2日の発症個体の例では粘膜の上皮以外の構造が失われることから、上皮からの吸収が表現型を悪化させていると考えられる(写真4)。しかし、表現型は生後5日前後に回復することから(写真5、6)、上皮に1次的変化があるとする、生後数日にのみみられる変化であると思われる。新生仔期の小腸上皮の吸収形態は他の時期と比べ特殊であると考えられており(14)、新生仔期の小腸上皮の機能が*ras* 遺伝子欠損マウスで異常になっている可能性がある。

(リンパ流の異常)

血管と違い、末梢のリンパ管は平滑筋のような動的機能を持つ細胞に取り囲まれていない部分がほとんどであり、リンパ流がどのようにして制御されるのか明らかでない。1つの可能性として、リンパ管が存在する器官の運動によってリンパ流が生じるという考えがある(15)。腸管の運動能低下によってリンパ流が停滞し、そのことに起因して表現型が出現する可能性がある。しかし、腸管の規則的伸縮を制御する Cajal 間質細胞数が減少した White spotting の変異マウスや *c-kit* にアンタゴニストとして働く抗 *c-kit* 抗体を腹腔注射した哺乳動物マウスでは、腸管運動の異常や腸閉塞は起こるが、乳糜腹水や小腸の浮腫が生じたという報告がない(16,17,18)。また、平滑筋収縮に関与する cGMP キナーゼ1 遺伝子欠損マウスも同様に、腸管運動の異常や腸閉塞は起こるが、乳糜腹水や小腸の浮腫が生じたという報告がない(19)。生後5日前後に死亡する *ras* 遺伝子欠損マウスの死因には、腸管運動の異常や腸閉塞も関与していると考えられるが、腸管運動そのものが直接表現型の出現に結びついている可能性は低い。

(リンパ管異常)

変異マウスである、Ra, Ra(op), Chy, Nil の4例で乳糜腹水(chylous ascites)の報告がある。

Ra(Ragged)マウスは、皮膚の異常によって分離された変異マウスで、Ra/+で皮膚の異常が見られる。Ra/Ra マウスは出生時に全身性の浮腫を生じており、生後まもなく死亡する(20)。この Ra マウスの Ra/+の一部で、新生仔期の乳糜腹水の貯留と小腸粘膜下層の浮腫が生じるものが発見されるようになったが(21)、遺伝子座が Ra と同じであり、皮膚の異常や浮腫の原因遺伝子と同じであると可能性が高い(22)。

Ra(op)(Ragged-opossum)マウスは、Ra マウスとは独立して分離された変異マウスで、皮膚の異常が Ra マウスと似ており、遺伝子座も Ra と同じ位置にマップされたことから、Ra のサブタイプとして Ra(op)と名付けられた。このマウスは Ra(op)/Ra(op)が胎生致死であり、Ra(op)/+も浮腫で死亡することが多い(23)。この Ra(op)/+の一部で乳糜腹水が見られることが報告されている(24)。Ra, Ra(op)ともに、マウス2番染色体にマップされているが、原因遺伝子は明らかになっていない(24)。

Chy(Chylous Ascites)マウスはエチルニトロソウレア(ENU)誘発突然変異マウスとして分離された。Chy/+の新生仔で乳糜腹水の貯留が認められるのに加え、後肢に浮腫が認められる。Chy/Chy の表現型は確認されていない。遺伝子座はマウス11番染色体上にマップされているが、原因遺伝子は不明である(25)。

Nil(Neonatal intestinal lipidosis)は新生仔期の小腸粘膜下層の浮腫および脂肪蓄積が見られる変異マウスとして分離された。一部は乳糜腹水の貯留を伴う。Nil/+の2割から7割で発症が認められる。また、Nil/Nil は胎生11日で死亡する(26)。この遺伝子座はマウス7番染色体上にマップされているが、同じ7番染色体上のH-ras 遺伝子座とは離れた位置にある(27)。

これらの変異マウスにおいても、リンパ管の異常や低形成が考えられているが、形態的あるいは機能的な異常の検索や確認はされておらず、表現型出現の原因は明らかでない。しかし、Ra マウスや Ra(op)マウスに見られる全身性浮腫は循環器系や脈管系に異常がある可能性を示唆している。また、ヒトにおいて、リンパ管の閉塞や低形成によって生じると考えられているリンパ浮腫(lymphoedema)の主症状として、手足のむくみや浮腫が生じるが、Chy マウスに見られる後肢の浮腫もリンパ浮腫である可能性がある。

これら変異マウスは、新生仔期に乳糜腹水と小腸粘膜下層の浮腫病変を特徴とする表現型が生じ、その病変が回復可能である点で ras 遺伝子欠損マウスの表現型と共通する。

変異マウスの原因遺伝子は同定されていないが、遺伝子座の違いから ras 以

外の遺伝子であることは明らかである。しかし、上記の共通点から考えて、これらの変異マウスにおいても、細胞あるいは細胞機能が完全に損なわれたことで発症するというよりは、細胞数あるいは細胞機能の低下によって発症すると考えられる。また、変異マウスと *ras* 遺伝子欠損マウスで表現型出現の原因となっている細胞が共通している可能性が高い。この細胞がリンパ管そのものやリンパ管の形成、機能を制御する細胞であるのか、あるいはそれ以外の細胞であるかを決定するには、変異マウスについても、*ras* 遺伝子欠損マウスと同様に解析の必要がある。

ras 遺伝子欠損マウスで、表現型が生じるのがまれである H(-/-)N(+/-)マウスと、ほぼ 100%で表現型が出現する H(-/-)N(+/-)K(+/-)マウスの新生仔小腸の cDNA を用いた RT-PCR では、リンパ管特異的に発現している受容体型チロシンキナーゼ、Flt-4 (VEGFR-3) (1, 2) や、そのリガンドでリンパ管新生を促進することが知られる増殖因子、VEGF-C (3, 4, 5)、VEGF-C 同様に Flt-4 のリガンドとなり得る VEGF-D (6, 7, 8) はいずれも発現していた (写真 8)。組織でもリンパ管構造が観察されている結果 (写真 3) と合わせると、Ras の減少で 1 次的変化の生じた細胞では、細胞そのものあるいは細胞機能が完全に欠損しているわけではない、という考えに合致する。しかし、末梢の微小なリンパ管構造の確認やリンパ管の微細形態の確認、遺伝子発現の定量や受容体のリン酸化状態については確認しておらず、今後の課題である。

(代謝異常)

キロミクロンを代謝するリポタンパク質リパーゼ遺伝子のホモ型欠損マウスでは、筋肉や肝臓、脂肪でのトリグリセリドの取り込みが認められず、実質と血管内皮の間隙でのトリグリセリドの蓄積が起こる。また、高トリグリセリド血症となる。生後 1-2 日で死亡するが、血中のトリグリセリドによる肺胞毛細血管の閉塞の結果であると考えられている (28, 29)。

このマウスでは乳糜腹水や小腸浮腫が報告されていないことや *ras* 遺伝子欠損マウスでは今のところ脂質代謝異常による合併症の兆候が見られないことから、*ras* 遺伝子欠損マウスの表現型が脂質代謝異常に起因する可能性は低いと考えられる。しかし、脂肪細胞特異的に発現する遺伝子 (adipocyte P2: aP2) のプロモーターを用いて弱毒化ジフテリアトキシン A (attenuated diphtheria toxin A: aDT-A) を脂肪細胞に発現させた遺伝子導入マウス、aP2-aDT-A 遺伝子導入マウスでは、導入遺伝子の発現が高い系統で乳糜腹水が起こった (30)。ただし、脂肪細胞に起こった変化や、小腸の浮腫の有無、発症率や致死率は明らかにされていない。また *ras* 遺伝子欠損マウスでは、体重増加や解剖時の脂肪組織の存在程度で見るとかぎり脂肪組織に異常はない。しかし、脂肪細胞が関与

するキロミクロンの代謝異常も発症に関与する可能性は否定できない。

以上のことから、小腸のリンパ管機能の低下が発症の原因の第一候補として考えられ、次いで脂肪細胞、小腸上皮の関与が考えられる。しかし、リンパ管は近年になってその増殖制御の分子が同定されたばかりで、その詳細が明らかでない。また、その機能、たとえば透過性の制御については、関与する分子すら明らかになっていない。したがって、Ras の減少によるシグナル伝達への影響が表現型の出現に結びつくまでの過程に、リンパ管や脂肪細胞、小腸上皮という候補が入ってきたところに留まっている。しかし、このように特殊な細胞にのみ異常が生じているとすれば、これまでほとんどの細胞に共通して考えられてきた Ras の機能についての理解が大きく変わることになる。今後、発症原因の候補となる組織、細胞を同定して詳細に解析し、表現型解析を通して Ras の機能解析を行いたい。

2.5 参考文献

- 1 Kukk E, Lymboussaki A, Taira S, Kaipainen A, Jeltsch M, Joukov V, Alitalo K ; VEGF-C receptor binding and pattern of expression with VEGFR-3 suggests a role in lymphatic vascular development. *Development* 1996 122(12):3829-37
- 2 Dumont DJ, Jussila L, Taipale J, Lymboussaki A, Mustonen T, Pajusola K, Breitman M, Alitalo K ; Cardiovascular failure in mouse embryos deficient in VEGF receptor-3. *Science* 1998 282(5390):946-9
- 3 Joukov V, Pajusola K, Kaipainen A, Chilov D, Lahtinen I, Kukk E, Saksela O, Kalkkinen N, Alitalo K ; A novel vascular endothelial growth factor, VEGF-C, is a ligand for the Flt4 (VEGFR-3) and KDR (VEGFR-2) receptor tyrosine kinases. *EMBO Journal* 1996 15(2):290-98
- 4 Fitz LJ, Morris JC, Towler P, Long A, Burgess P, Greco R, Wang J, Gassaway R, Nickbarg E, Kovacic S, Ciarletta A, Giannotti J, Finnerty H, Zollner R, Beier DR, Leak LV, Turner KJ, Wood CR ; Characterization of murine Flt4 ligand/VEGF-C. *Oncogene* 1997 15(5):613-8
- 5 Jeltsch M, Kaipainen A, Joukov V, Meng X, Lakso M, Rauvala H, Swartz M, Fukumura D, Jain RK, Alitalo K ; Hyperplasia of lymphatic vessels in VEGF-C transgenic mice. *Science* 1997 276(5317):1423-5
- 6 Yamada Y, Nezu J, Shimane M, Hirata Y ; Molecular cloning of a novel vascular endothelial growth factor, VEGF-D. *Genomics* 1997 42(3):483-8
- 7 Lee J, Gray A, Yuan J, Luoh SM, Avraham H, Wood WI ; Vascular endothelial growth factor-related protein: a ligand and specific activator of the tyrosine kinase receptor Flt4. *Proceedings of National Academic Sciences in USA* 1996 93(5):1988-92
- 8 Achen MG, Jeltsch M, Kukk E, Makinen T, Vitali A, Wilks AF, Alitalo K, Stackman SA ; Vascular endothelial growth factor D (VEGF-D) is a ligand for the tyrosine kinases VEGF receptor 2 (Flk1) and VEGF receptor 3 (Flt4). *Proceedings of*

National Academic Sciences in USA 1998 95(2):548-53

9 Pells S, Divjak M, Romanowski P, Impey H, Hawkins NJ, Clarke AR, Hooper ML, Williamson, DJ ; Developmentally-regulated expression of murine K-ras isoforms. *Oncogene* 1997 15(15):1781-6

10 Lee CH, Young JR ; Chylous ascites in siblings. *Journal of Pediatrics* 1953 42: 83-86

11 Harrison's Principles of Internal Medicine, 12th edition, McGRAW-HILL, Inc.

12 Jonsson J, Carlsson L, Edlund T, Edlund H ; Insulin-promoter-factor 1 is required for pancreas development in mice. *Nature* 1994 371(6498):606-9

13 Offield MF, Jetton TL, Labosky PA, Ray M, Stein RW, Magnuson MA, Hogan BL, Wright CV ; PDX-1 is required for pancreatic outgrowth and differentiation of the rostral duodenum. *Development* 1996 122(3):983-95

14 Clark SL, Jr. ; The ingestion of proteins and colloidal materials by columnar absorptive cells of the small intestine in suckling rats and mice. *The Journal of biophysical and biochemical cytology* 1959 5:41-50

15 標準組織学 各論、第3版、藤田尚男、藤田恒夫 医学書院

16 Huizinga JD, Thuneberg L, Kluppel M, Malysz J, Mikkelsen HB, Bernstein A ; W/kit gene required for interstitial cells of Cajal and for intestinal pacemaker activity. *Nature* 1995 373(6512):347-9

17 Ward SM, Burns AJ, Torihashi S, Sanders KM ; Mutation of the proto-oncogene c-kit blocks development of interstitial cells and electrical rhythmicity in murine intestine. *Journal of Physiology* 1994 480 (Pt 1):91-7

18 Maeda H, Yamagata A, Nishikawa S, Yoshinaga K, Kobayashi S, Nishi K, Nishikawa S ; Requirement of c-kit for development of intestinal pacemaker system. *Development* 1992 116(2):369-75

- 19 Pfeifer A, Klatt P, Massberg S, Ny L, Sausbier M, Hirmeiss C, Wang GX, Korth M, Aszodi A, Andersson KE, Krombach F, Mayerhofer A, Ruth P, Fassler R, Hofmann F ; Defective smooth muscle regulation in cGMP kinase I-deficient mice. *EMBO Journal* 1998 17(11):3045-51
- 20 Carter TC, Phillips RJS ; Ragged, a semidominant coat texture mutant. *Journal of Heredity* 1954;45:151-154
- 21 Herbertson BM, Wallace ME ; Chylous ascites in newborn mice. *Journal of Medical Genetics* 1964 Sep;1:10-23
- 22 Wallace ME ; Analysis of genetic control of chylous ascites in ragged mice. *Heredity* 1979 Aug;43(1):9-18
- 23 Green EL, Mann SJ ; Opossum, a semi-dominant lethal mutation affecting hair and other characteristics of mice. *Journal of Heredity* 1961;52:223-7
- 24 <http://www.informatics.jax.org MGI:97841>
- 25 <http://www.informatics.jax.org MGI:88402>
- 26 Wallace ME, Herbertson BM ; Neonatal intestinal lipodosis in mice. An inherited disorder of the intestinal lymphatic vessels. *Journal of Medical Genetics* 1969 Dec;6(4):361-75
- 27 <http://www.informatics.jax.org MGI:97343>
- 28 Weinstock PH, Bisgaier CL, Aalto-Setälä K, Radner H, Ramakrishnan R, Levak-Frank S, Essenburg AD, Zechner R, Breslow JL ; Severe hypertriglyceridemia, reduced high density lipoprotein, and neonatal death in lipoprotein lipase knockout mice. Mild hypertriglyceridemia with impaired very low density lipoprotein clearance in heterozygotes. *J. Clin. Invest.* 1995 96(6):2555-68
- 29 Coleman T, Seip RL, Gimble JM, Lee D, Maeda N, Semenkovich CF ; COOH-terminal disruption of lipoprotein lipase in mice is lethal in homozygotes, but heterozygotes have elevated triglycerides and impaired enzyme activity. *Journal of*

30 Ross SR, Graves RA, Spiegelman BM ; Targeted expression of a toxin gene to adipose tissue: transgenic mice resistant to obesity. *Genes and Development* 1993 7(7B):1318-24

第3章

まとめ

3.1 Ras の機能重複

第1章で述べたように、K-Ras のみが欠損している K(-/-) マウスが胎生致死であるのに対し、K-Ras のみが発現している H(-/-)N(-/-) マウスが正常に発生し出生することから、3つの Ras のうち K-Ras のみが、発生段階において必要かつ十分であることがわかった。この、H-Ras、N-Ras と区別される K-Ras の役割とは一体何であろうか。

K-Ras と他の Ras とで役割が異なる理由として、まず、タンパク質の構造の違いに起因する可能性が挙げられる。K-Ras は他の Ras と異なり、選択的スプライシングにより C 末端の構造が異なる K-RasA、K-RasB の2種類からなる(1)。特に K-RasB は他の Ras と脂質修飾の種類が異なる(2)。そして、K-RasB に特異的に結合する smgGDS(3)や、H-Ras より N-Ras、K-Ras との結合能が強い SUR-8(4)などの存在が知られている。このような他のタンパク質との相互作用の違いが、シグナルの強度や経路の違いにつながる事が考えられる。つまり、K-Ras が他の Ras よりも優勢に働くシグナル伝達系、あるいは K-Ras が独自に制御するシグナル伝達系が存在し、このシグナル伝達系が個体発生に必須となっている可能性がある。

次に、発現の違いによる可能性が挙げられる。マウスの様々な臓器で3つの ras 遺伝子の発現を比較すると、調べたいずれの臓器においても3つの遺伝子発現が認められるが、臓器によりその強弱に差が認められる(5)。また、精子形成の様々な段階の細胞で、H-ras 遺伝子が一定量発現しているのに対して N-ras 遺伝子や K-ras 遺伝子が各段階で特徴的な発現パターンを示したり(6)、K-RasA が胃腸管の粘膜で発現しているのに対し K-RasB が筋層で発現していたり(7)。つまり、細胞や組織レベルで3つの Ras の発現量やパターンが異なることが、各 Ras の役割の違いとして反映される可能性がある。

ところが、私の所属する研究室において、K-ras 遺伝子欠損マウス(8)と H-ras 遺伝子導入(トランスジェニック;Tg)マウス(9)を交配させることで得た

K(-/-)Tg マウスが、正常に発生して成熟個体となること、そしてさらに他の *ras* 遺伝子欠損マウスと交配させることで得た、N(-/-)K(-/-)Tg マウスも成熟個体となることを見出されている(10)。用いた H-*ras* 遺伝子導入マウスは、第1章で紹介したヒト H-*ras* のゲノム遺伝子を導入したマウスであり、マウス H-Ras と同一アミノ酸配列のヒト H-Ras が全身で強く発現している(9, 10)。N(-/-)K(-/-)Tg マウスという H-Ras のみが発現しているマウスが、K-Ras のみが発現している H(-/-)N(-/-)マウス同様に成熟個体となることから、発生における K-Ras の機能は、H-Ras によって代替可能であることが明らかであり、Ras の機能重複が考えられる。

K(-/-)マウスや N(-/-)K(-/-)マウスを含む、胎生致死となる *ras* 遺伝子欠損マウスにおいて、1次的変化の生じた細胞が何であるか同定できていない。そのため、N(-/-)K(+/-)マウスや H(-/-)K(-/-)マウスの胎生致死から考えられる N-Ras と K-Ras、H-Ras と K-Ras の相補的作用や、上記の外來性 H-Ras による K-Ras の機能代替が、細胞内シグナル伝達での機能重複のみを意味するかどうか検討の余地はある。

しかし、K-Ras が発生に必須であるのは、K-Ras がその構造上独自に制御する、発生に必須なシグナル伝達系が存在するからではない。3つの Ras は同じシグナル伝達系で機能し得るが、それぞれの Ras のシグナル強度や発現が異なることでシグナルの有無や強弱に違いが生じ、個体発生における重要性の違いとなって現れていると考えられる。

一方、様々な遺伝子型の *ras* 遺伝子多重欠損マウスの新生仔において、共通の表現型、乳糜腹水の貯留と小腸粘膜下層の浮腫が認められた。3種類の Ras のいずれが減少してもその発症率の上昇が見られる一方、導入遺伝子による H-Ras の過剰発現によって、内在性 H-Ras の欠損による発症率上昇の影響のみならず、N-Ras、K-Ras 欠損による発症自体も抑えられた。これらのことから、発症の原因となる細胞において、3つの Ras が同時に発現しており、これらが同一のシグナル伝達経路か、途中経路が異なっても下流で統合されて1つになるシグナル伝達経路を制御している可能性が強く考えられる(図)。また、乳糜腹水の発症率の上昇に Ras が K-Ras > N-Ras > H-Ras の順序で大きく影響することは、この細胞内でのそれぞれの Ras のシグナル強度や発現量の違いを表していると考えられる。

胎生致死および新生仔の表現型の根本的な原因となっている細胞を同定し、Ras のシグナル伝達系について詳細に検討する必要があるが、表現型の解析結果は、3つの Ras の機能が生体内で重複していることを示すものである。

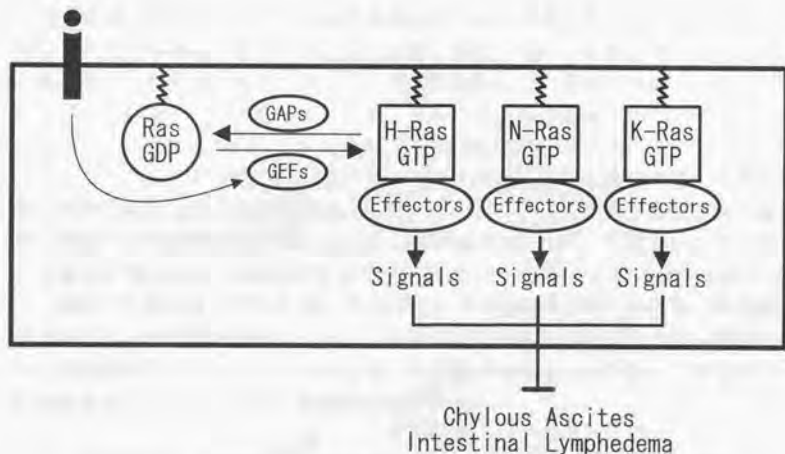


図 H-, N-, K-Rasの機能重複

乳糜腹水の貯留や小腸粘膜下層の浮腫という *ras* 遺伝子多重欠損マウスの表現型の解析では、発症を抑えている点で3つの Ras の機能が重複していることがわかった。発症原因となる細胞において、Ras を介するシグナル伝達経路の上流の受容体、Ras の調節タンパク質 (GEFs, GAPs) や標的タンパク質 (Effectors) が3つの Ras に共通しているのかどうかは明らかでない。しかし、機能重複の仕組みとして、3つの Ras が同一のシグナル伝達経路を制御している可能性や、それぞれの Ras に制御される経路が途中異なっても下流で統合されている可能性が考えられる。

3.2 Ras についてのこれまでの知見と表現型との比較

発見した新生仔の表現型は、多重欠損マウスの作成当初、全く予測していないものであった。

多くの膜受容体で、リガンドあるいは抗体による刺激に伴い、Ras の活性化が起こることが報告されている(11, 12, 13)。また、Ras の中和抗体やドミナントネガティブ変異体の導入によって、受容体刺激による細胞の増殖、分化などのシグナル伝達の効果が阻害されることから、これら受容体からのシグナルの一部あるいは全てが Ras を介して下流に伝えられると考えられている(11, 12, 13)。したがって、Ras を介するシグナル伝達系の上流に位置する受容体の種類は極めて多いことになる。また、Ras を介するシグナルの効果も、細胞の増殖や分化のみならず(11, 12, 13)、細胞接着(14, 15)、アポトーシス(16)にも関与していることが近年になって明らかになってきた。これらのことから、*ras* 遺伝子多重欠損マウスの Ras の減少による表現型は多岐にわたり、かつ劇的であることが予測された。しかし、実際には乳糜腹水の貯留と小腸の浮腫という限局的な変化であった。細胞を用いた実験の知見からの予測と、生体内での実験結果のこの違いは何に起因するのだろうか。

1つの可能性として、3つの *ras* 遺伝子の発現パターン上、多重欠損時に、表現型の原因となった細胞でのみ Ras の発現量の著しい低下が起こり、異常をきたしたということが考えられる。*ras* 遺伝子が欠損するにつれ発症率が上がることから、Ras の発現量の低下が関与するのは明らかである。また、3つの *ras* 遺伝子の発現量やパターンに差があるので(5, 6, 7)、多重欠損時の Ras の発現量の減少は組織、細胞種によって異なってくるはずであり、局所的に著しい発現量の低下が見られることは十分有り得る。それでも、様々な *ras* 遺伝子の組み合わせの多重欠損マウスであるにもかかわらず同じ表現型に集中し、他の組織での表現型を伴わないのは疑問として残る。

他の可能性として、例を挙げて考えてみる。EGF 受容体(EGFR)遺伝子欠損マウスは、遺伝的背景によって死亡時期が異なるものの、全身の組織に異常が生じることが報告されている(17, 18, 19)。また、上皮系の細胞のみならず、神経細胞の増殖に異常が生じることでも報告されており(20)、EGFR を介するシグナル伝達系が、全身の多くの細胞で機能していることが考えられる。

しかし、EGFR の細胞内領域の自己リン酸化領域に変異が生じている変異マウス、*Waved-2* マウス(21)では、毛の発達異常と眼瞼の未発達による出生時の開

眼が見られるだけである。また、EGFR のリガンドの 1 つである、TGF α の遺伝子欠損マウス (22, 23) や、TGF α の発現量が低下している変異マウス、Waved-1 マウス (22, 23) でも、同様の毛の発達と眼瞼の異常が見られるだけである。また、Waved-2 マウスと、EGFR からのシグナルの下流に位置する *sos-1* 遺伝子欠損マウスとの 2 重変異マウスでは、眼瞼の異常が見られる頻度が Waved-2 マウスよりも高くなる (24)。これらのマウスでは、受容体の低機能性やリガンドの減少によって細胞内に伝えられるシグナルが減弱したことが表現型につながっていると考えられる。

このように、EGFR を介するシグナル伝達系が生体内の多くの細胞に必要とされているにもかかわらず、そのシグナルの減弱の影響が眼瞼や毛の発生のような限局した組織にのみ現れるのは、この EGFR を介するシグナル伝達系への依存度が、生体内の部位や時期によって差があることを示している。また、この EGFR を介するシグナル伝達系は、Ras が関与しているシグナル伝達系の中で最も著名なものである (11)。*ras* 遺伝子多重欠損マウスでも、H(-/-)N(-/-)マウス、H(-/-)N(+/-)K(+/-)マウスでそれぞれ 1 例のみであるが、出生時の眼瞼の異常が観察されており、EGFR の下流の Ras が減少したことでシグナルの減弱が起り、発症している可能性がある。

したがって、Ras の減少により限局された組織に表現型が現れるのも、新生仔期において Ras を介するシグナル伝達系への依存度が高い細胞でのみ、シグナルの減弱が大きく影響して表現型が現れると考えられる。

見かけ上異常が認められない *ras* 遺伝子多重欠損マウスの生理機能についても、経時的変化や刺激時の変化によって、発現量低下による表現型が明らかになる可能性がある。たとえば増殖因子やホルモンの投与や、免疫賦活化の刺激などを与えたとき、それに対する反応性の違いとして初めて、Ras について知られる多様な機能の変化が明らかになるのかもしれない。乳糜腹水や小腸浮腫の原因となる細胞の同定に加え、刺激負荷によってはじめて顕著になる可能性がある表現型についても、解析の余地がある。

3.3 参考文献

- 1 McGrath JP, Capon DJ, Smith DH, Chen EY, Seeburg PH, Goeddel DV, Levinson AD ; Structure and organization of the human Ki-ras proto-oncogene and a related processed pseudogene. *Nature* 1983 304(5926):501-6
- 2 James GL, Goldstein JL, Brown MS ; Polylysine and CVIM sequences of K-RasB dictate specificity of prenylation and confer resistance to benzodiazepine peptidomimetic in vitro. *Journal of Biological Chemistry* 1995 270:6221-6226
- 3 Mizuno T, Kaibuchi K, Yamamoto T, Kawamura M, Sakoda T, Fujioka H, Matsuura Y, Takai Y ; A stimulatory GDP/GTP exchange protein for smg p21 is active on the post-translationally processed form of c-Ki-ras p21 and rhoA p21. *Proceedings of National Academic Sciences in USA* 1991 88:6442-6446
- 4 Sieburth DS, Sun Q, Han M ; SUR-8, a conserved Ras-binding protein with leucine-rich repeats, positively regulates Ras-mediated signaling in *C.Elegans*. *Cell* 1998 94(1):119-30
- 5 Leon J, Guerrero I, Pellicer A ; Differential expression of the ras gene family in mice. *Molecular and Cellular Biology* 1987 7(4):1535-40
- 6 Sorrentino V, McKinney MD, Giorgi M, Geremia R, Fleissner E ; Expression of cellular protooncogenes in the mouse male germ line: a distinctive 2.4-kilobase pim-1 transcript is expressed in haploid postmeiotic cells. *Proceedings of National Academic Sciences in USA* 1988 85(7):2191-5
- 7 Pells S, Divjak M, Romanowski P, Impey H, Hawkins NJ, Clarke AR, Hooper ML, Williamson, DJ ; Developmentally-regulated expression of murine K-ras isoforms. *Oncogene* 1997 15(15):1781-6
- 8 Koera K, Nakamura K, Nakao K, Miyoshi J, Toyoshima K, Hatta T, Otani H, Aiba A, Katsuki M ; K-ras is essential for the development of the mouse embryo. *Oncogene* 1997 15(10):1151-9

- 9 Saitoh A, Kimura M, Takahashi R, Yokoyama M, Nomura T, Izawa M, Sekiya T, Nishimura S, Katsuki M ; Most tumors in transgenic mice with human c-Ha-ras gene contained somatically activated transgenes. *Oncogene* 1990 5(8):1195-200
- 10 中村 健司、中尾 和貴、市瀬 広武、古恵良 桂子、八田 稔久、大谷 浩、阪上 洋行、近藤 尚武、饗場 篤、勝木 元也 ; 投稿準備中
- 11 Barbacid M ; ras genes. *Annual Review of Biochemistry* 1987 56:779-827
- 12 Lowy DR, Willumsen BM ; Function and regulation of ras. *Annual Review of Biochemistry* 1993 62:851-891
- 13 Campbell SL, Khosravi-Far R, Rossman KL, Clark GJ, Der CJ ; Increasing complexity of Ras signaling. *Oncogene* 1998 17:1395-1413
- 14 Rosales C, O'Brien V, Kornberg L, Juliano R ; Signal transduction by cell adhesion receptors. *Biochimica et Biophysica Acta* 1995 1242(1):77-98
- 15 Hanks SK, Polte TR ; Signaling through focal adhesion kinase. *Bioessays* 1997 19(2):137-45
- 16 Downward, J ; Ras signalling and apoptosis. *Current Opinion in Genetics and Development* 1998 8(1):49-54
- 17 Sibilina M, Wagner EF ; Strain-dependent epithelial defects in mice lacking the EGF receptor. *Science* 1995 269(5221):234-8
- 18 Threadgill DW, Dlugosz AA, Hansen LA, Tennenbaum T, Lichti U, Yee D, LaMantia C, Mourton T, Herrup K, Harris RC, Barnard JA, Yuspa SH, Coffey RJ, Magnuson T ; Targeted disruption of mouse EGF receptor: effect of genetic background on mutant phenotype. *Science* 1995 269(5221):230-4
- 19 Miettinen PJ, Berger JE, Meneses J, Phung Y, Pedersen RA, Werb Z, Derynck R ; Epithelial immaturity and multiorgan failure in mice lacking epidermal growth factor receptor. *Nature* 1995 376(6538):337-41

- 20 Sibilila M, Steinbach JP, Stingl L, Aguzzi A, Wagner EF ; A strain-independent postnatal neurodegeneration in mice lacking the EGF receptor. *EMBO Journal* 1998 17(3):719-31
- 21 Luetkeke NC, Phillips HK, Qiu TH, Copeland NG, Earp HS, Jenkins NA, Lee DC ; The mouse waved-2 phenotype results from a point mutation in the EGF receptor tyrosine kinase. *Genes and Development* 1994 8(4):399-413
- 22 Mann GB, Fowler KJ, Gabriel A, Nice EC, Williams RL, Dunn AR ; Mice with a null mutation of the TGF alpha gene have abnormal skin architecture, wavy hair, and curly whiskers and often develop corneal inflammation. *Cell* 1993 73(2):249-61
- 23 Luetkeke NC, Qiu TH, Peiffer RL, Oliver P, Smithies O, Lee DC ; TGF alpha deficiency results in hair follicle and eye abnormalities in targeted and waved-1 mice. *Cell* 1993 73(2):263-78
- 24 Wang DZ, Hammond VE, Abud HE, Bertonecello I, McAvoy JW, Bowtell DD ; Mutation in *Sos1* dominantly enhances a weak allele of the *EGFR*, demonstrating a requirement for *Sos1* in *EGFR* signaling and development. *Genes and Development* 1997 11(3):309-20

謝辞

研究を指導し、支えてくださった以下の皆さんに感謝いたします。

東京大学医科学研究所ヒト疾患モデル研究センター

勝木 元也 教授

饗場 篤 助教授 中尾 和貴 助手 中村 健司 助手

山田 篤 市瀬 多恵子 江藤 智生

鈴木 規由 都築 利奈 田中 充

中潟 直己 (現 熊本大学教授) 古恵良 桂子 (現 九州大学)

高次機能研究分野の皆さん 動物センターの技官の皆さん

東京大学医学部

堀江 重郎 講師

愛知県立がんセンター研究所 病理学第一部

立松 正衛 部長 池原 譲 研究員

最後に、実験に使用しましたマウスに、深く感謝いたします。

論文の内容の要旨

獣医学専攻

平成7年度博士課程 入学

氏 名 市瀬 広武

指導教官名 勝木 元也

論文題目 がん遺伝子 H-, N-, K-*ras* 多重欠損マウスを用いた Rasの生体機能の解析

*ras*遺伝子は、レトロウイルスのがん遺伝子*v-ras*の原がん遺伝子として、またヒトのがんの多くで変異が見つかる遺伝子として同定された。遺伝子産物 Rasは、21kDaの低分子量GTP結合タンパク質である。様々な種類の受容体からのシグナルを受けるとGDP結合型からGTP結合型に変化して活性化し、MAPキナーゼ経路をはじめとするシグナル伝達経路にシグナルを伝えることで、細胞の増殖や分化を制御していると考えられている。

Rasは哺乳類のみならず、線虫や酵母、ショウジョウバエにもホモログが存在する。そしてこれらの動物種の変異体解析により明らかにされたRasを介するシグナル伝達系自体も、種を超えて保存されていることから、Rasは多くの生物種に共通するシグナル伝達の調節因子であると考えられている。

しかし、哺乳類のRasにはH-, N-, K-Rasの3種類が存在する。これらのRas間ではアミノ酸配列が極めてよく保存されており、変異の生じたがん遺伝子産物としての細胞の形質転換能や生化学的性質、シグナル伝達への寄与のメカニズムは共通している一方、それぞれのRasに特徴的な配列も存在し、脂質修飾の種類や結合するタンパク質の種類が異なることが知られている。また、3つの遺伝子はいずれも全身性に発現しているが、発現量やパターンがそれぞれに特徴的であることも知られる。これらのことから、哺乳類の生体内において、3つ

のRasに共通する機能とそれぞれのRasで異なる機能の両方が存在することが考えられる。

それぞれの*ras*遺伝子欠損マウスは、所属研究室において既に作成、解析されており、*H-ras*遺伝子ホモ型欠損マウス (*H(-/-)*マウス) や*N-ras*遺伝子ホモ型欠損マウス (*N(-/-)*マウス) が正常であるのに対して、*K-ras*遺伝子欠損マウス (*K(-/-)*マウス) が胎生致死であることがわかっている。このことから、*K-ras*遺伝子が*H-ras*および*N-ras*遺伝子と機能的に異なることが考えられた。そこで各*ras*遺伝子欠損マウスを用いて多重欠損マウスを作成し、その生存性と表現型の観察、解析を行うことで、3つのRasの機能重複の有無を検討した。

まず、多重欠損マウスの生存性について検討した。*N-ras*遺伝子欠損と*K-ras*遺伝子欠損の組み合わせでは、*N(-/-)*マウスや*K(+/-)*マウスがそれぞれ正常であるにもかかわらず、*N(-/-)K(+/-)*マウスの多くが胎生致死であった。一部は見かけ上正常に出生したが、哺乳後、腹腔への白色液体(乳糜腹水)の貯留および小腸粘膜下層の浮腫が認められ、出生当日あるいはその翌日に死亡した。また、*H-ras*遺伝子欠損と*K-ras*遺伝子欠損の組み合わせでは、*K(-/-)*の胎仔よりも*H(-/-)K(-/-)*の胎仔がより早い時期に死亡することがわかった。一方、*H-ras*遺伝子欠損と*N-ras*遺伝子欠損の組み合わせについては、*H(-/-)N(-/-)*マウスが出生し、繁殖能力の正常な成熟個体に成長することを観察した。3遺伝子欠損の組み合わせである*H(-/-)N(+/-)K(+/-)*マウスは、出生した個体のほとんどすべてに*N(-/-)K(+/-)*マウス同様の乳糜腹水の貯留と小腸粘膜下層の浮腫が認められ、その多くが生後数日で死亡した。しかし、生き残った個体は繁殖能力の正常な成熟個体に成長した。

*K(-/-)*マウスが胎生致死であるのに対して、*K-Ras*のみが発現している*H(-/-)N(-/-)*マウスが正常に発生することから、発生には*K-Ras*が必須であることが明らかになった。このことから、*K-ras*遺伝子に他の*ras*遺伝子と異なる機能が存在することが考えられた。しかし一方で、*N(-/-)K(+/-)*マウスや*H(-/-)K(-/-)*マウスの胎生致死の結果から*H-Ras*や*N-Ras*も発生に寄与していることがわかり、Ras間に機能重複がある可能性も考えられた。

次に、*N(-/-)K(+/-)*と*H(-/-)N(+/-)K(+/-)*という2つの遺伝子型の新生仔で観察された表現型、乳糜腹水と小腸粘膜下層の浮腫と、*ras*遺伝子欠損との関係について検討した。

この乳糜腹水の貯留は、2遺伝子型の新生仔のみならず、出生後の死亡が顕著でない他の遺伝子型の新生仔においても同様に観察されることがわかった

(表)。乳糜腹水の発症率は遺伝子型によって異なるが、いずれの*ras*遺伝子欠損も発症に影響し、*ras*遺伝子欠損が進むほど乳糜腹水の発症率が高くなる傾向にあった。

H-	N-	K- <i>ras</i>	
		+/+	+/-
+/+		0 / 96 (0)	0 / 99 (0)
+/-	+/+	0 / 23 (0)	0 / 15 (0)
-/-		2 / 228 (1)	20 / 135 (15)
+/+		0 / 70 (0)	5 / 76 (7)
+/-	+/-	0 / 30 (0)	6 / 20 (30)
-/-		2 / 175 (1)	35 / 37 (95)
+/+		2 / 237 (1)	6 / 6 (100)
+/-	-/-	5 / 153 (3)	胎生致死
-/-		64 / 137 (47)	胎生致死

表 *ras*遺伝子多重欠損マウスの新生仔における乳糜腹水の発症率

様々な遺伝子型の*ras*遺伝子欠損マウスを自然交配によって生産し、観察した結果を表にまとめた。表の左側および上側に、各*ras*遺伝子の遺伝子型を示す。分母は観察した各遺伝子型のマウスの数で、分子は乳糜腹水の貯留が観察されたマウスの数である。カッコ内は発症した割合を%で示したものである。

各遺伝子型の発症率を比較すると、2種類以上のRasの減少によって相乗的に発症率が高くなる傾向にあったが、K-Ras、N-Ras、H-Rasの順にその減少が発症率の上昇に大きく影響していた。一方、H-*ras*遺伝子導入マウス(Tg^{H-ras})と*ras*遺伝子欠損マウスを交配することで得たH-*ras*遺伝子導入*ras*遺伝子多重欠損マウスでの乳糜腹水の発症の有無について検討したところ、H(-/-)N(-/-)Tg^{H-ras}や

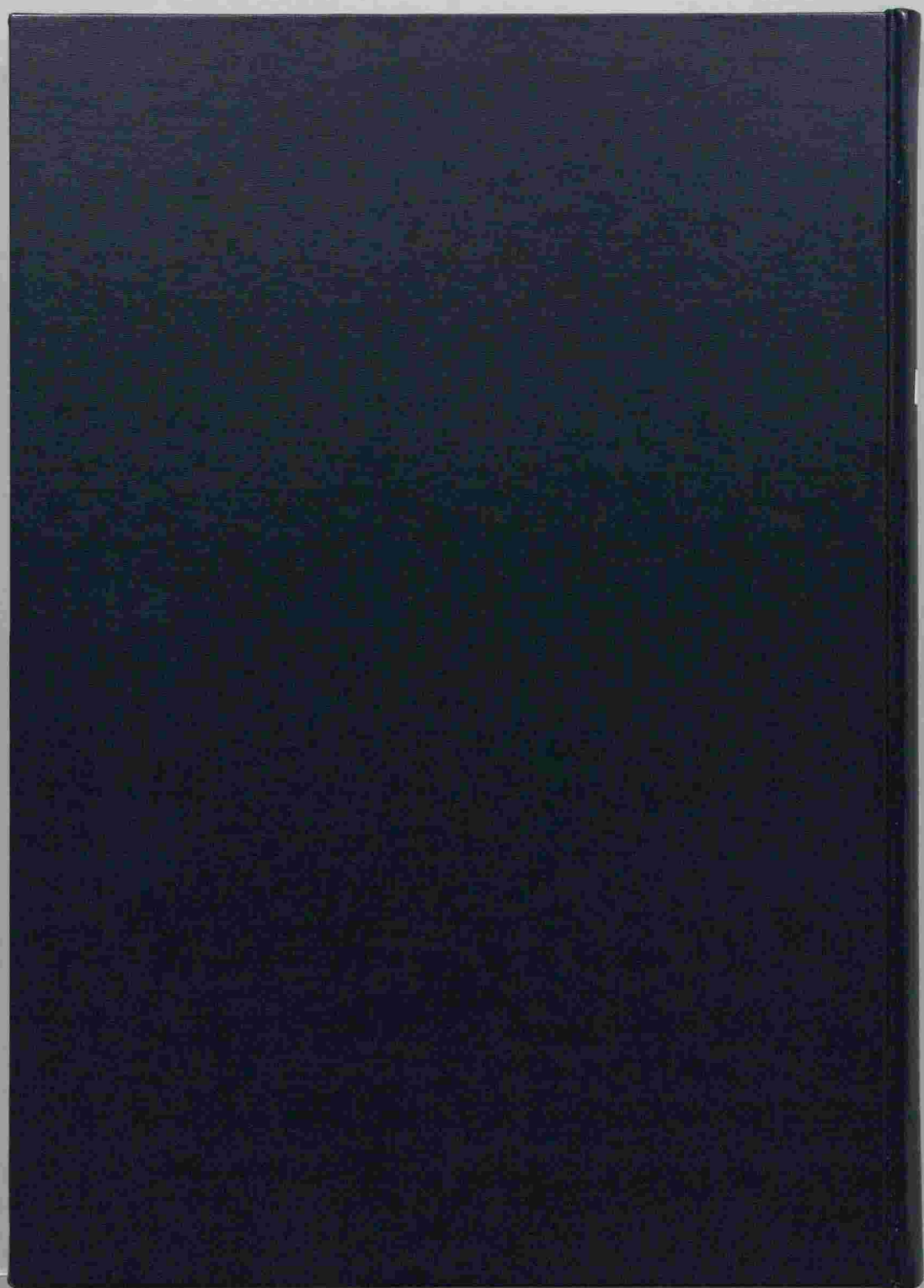
H(-/-)N(+/-)K(+/-)Tg^{h/ras}で発症が認められなかった。また、N(-/-)K(+/-)Tg^{h/ras}でも発症が認められず、N-RasやK-Rasの減少による発症がH-Rasの過剰発現によって抑えられることがわかった。

Ras間での発症への影響の差はRas間の機能や発現の何らかの差を反映していると考えられた。しかし、いずれのRasの減少によっても同一表現型の発症率の上昇が見られること、導入遺伝子によるH-Rasの過剰発現によってN-RasやK-Rasの減少による発症が抑えられることから、3つのRasの機能が重複していることが明らかになった。

発症したいずれの遺伝子型の新生仔においても、乳糜腹水の貯留と小腸粘膜下層の浮腫が併発する点、全身の組織学的解析で小腸粘膜下層の浮腫病変以外の変化が認められない点で同じであった。発症後死亡する個体や耐過して成長する個体の肉眼および組織学的観察結果も同様であった。ras遺伝子欠損マウス同様に、乳糜腹水の貯留や小腸粘膜下層の浮腫が見られる変異マウスやヒトの疾患との比較から、リンパ管の低形成が表現型の原因として最も可能性が高いと考えられた。しかし、腸間膜のリンパ管の観察や、新生仔小腸におけるリンパ管内皮細胞に特異的な遺伝子発現の検討では、低形成の証拠は見出せなかった。リンパ管の詳細な組織学的検討に加え、リンパ管以外の他の可能性についても検討の余地があり、なお解析を進めているところであるが、遺伝子型にかかわらず同じ表現型であることから、発症の原因となる変化の生じた細胞も同じであることが強く示唆された。

したがって、生体内において、少なくともこの表現型の原因となる変化の生じた細胞において、3つのRasがいずれも発現し、かつそれらの機能が重複している可能性が強く考えられた。

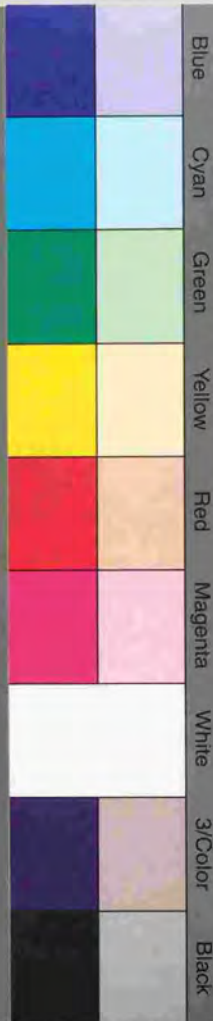
本研究では、ras遺伝子多重欠損マウスの生存性の解析により、発生におけるK-Rasの必須性が明らかになった。また、新生仔における乳糜腹水の貯留と小腸粘膜下層の浮腫という表現型の解析により、生体内におけるRas間の機能重複の存在が明らかになった。



inches 1 2 3 4 5 6 7 8
cm 1 2 3 4 5 6 7 8 9 10 11 12 13 14 15 16 17 18 19

Kodak Color Control Patches

© Kodak 2007 TM Kodak



Blue Cyan Green Yellow Red Magenta White 3/Color Black

Kodak Gray Scale



© Kodak 2007 TM Kodak

A 1 2 3 4 5 6 M 8 9 10 11 12 13 14 15 B 17 18 19

