



がき

網膜芽細胞腫

網膜芽細胞腫における癌抑制遺伝子

の発現とE1A蛋白-ウイルス発癌モジュールを

用いた分子病理学的研究

(研究課題番号:02670147)

平成4年度科学研究費補助金

一般研究(C)研究成果報告書

平成5年3月



研究代表者 小林 慎雄

(東京女子医科大学病理学教室 教授)

網膜芽細胞腫における癌抑制遺伝子の発現とE1A蛋白

東京女子医科大学 研究代表者 小林慎雄 平成五年二月

はし が き

網膜芽細胞腫（以下RBと略）関連遺伝子RB geneは、RB患者の染色体分析により13番染色体ゲノムライブラリーから分離された全長約4.7kbのDNA断片（H3-87<sup>0</sup>-7<sup>0</sup>）で、その後RB geneクローニングが行なわれた。このうち翻訳部位は928アミノ酸で構成される遺伝子産物（RB蛋白）をコードし、27のエクソンからなる200kbのゲノムが確認された。また、RB以外の腫瘍（骨肉腫、肝細胞癌、線維肉腫、乳癌）での存在も判明した。我々はこれまでアデノウイルス12型誘発網膜腫瘍についてヒトRBに類似した形態特性、分化誘導に伴う形態変化を明らかにしてきたが、腫瘍化に直接関わる遺伝子レベルの異常に関しては未検討の課題であった。本研究の目的は、再現性の高い我々の発癌モデルを用いて初期過程からのRB geneの発現とE1A蛋白、核内oncogeneとの相互作用、細胞増殖、造腫瘍性に及ぼす影響を分子病理学的に検討することにある。

## 研究組織

研究代表者	小林 槇雄	東京女子医科大学 医学部 教授 病理学講座
研究分担者	沢田 達男	日本大学医学部 助教授 病理学講座

## 研究経費

平成 2 年度	1 1 0 0 千 円
平成 3 年度	7 0 0 千 円
平成 4 年度	4 0 0 千 円
計	2 2 0 0 千 円

## 研究 発表

### 1 学会誌等発表

- 1) T. Sawada, M. Niihashi, I. Sakurai.;  
An immunohistochemical study of  
neovasculature in human brain tumors  
Acta Pathol. Jpn. 38(6):713-721 1988
- 2) M. Afreen, K. Asayama, N. Uchida, K.  
Dobashi, H. Hayashibe, M. Kobayashi,  
K. Suzuki, A. Kawaoi, Y. Kato.;  
Immunohistochemical localization of  
copper zinc and manganese superoxide  
dismutases in human tissues.  
Yamanashi Medical J. 5:181-188 1990
- 3) Y. Katoh, H. Matsumoto, M. Kobayashi,  
Y. Okada, A. Kawaoi.; Genomic DNA  
analysis of rat retina tumor induced  
by adenovirus type 12. Acta Pathol.  
Jpn. 41(11):811-817 1991

- 4) K. Suzuki, H. Matsumoto, M. Kobayashi, A. Kawaoi, K. Asayama, S. Moriyama.; Immunohistochemical localization of copper zinc and manganese superoxide dismutase in diisopropanolnitrosamine-induced rat thyroid lesions. Acta Histochem. Cytochem. 24(1):69-75 1991
- 5) 加藤陽一郎、岡田芳家、川生明：網膜芽細胞腫のハ<sup>3</sup>ラファイソ包埋組織を用いたDNA解析 東女医大誌 62(2):107-111 1992
- 6) T. Sawada, Y. Kusumi, M. Niihashi, I. Sakurai.; A kinetic study of the neovascularization in subcutaneous tumors of rats with cultured cell transplants from MNU-induced gliosarcoma and adenovirus 12-induced retinal tumor Neuropathol. 12:39-46 1992

7) M. Yamamoto, M. Jimbo, M. Kobayashi, C. Toyoda, M. Ide, N. Tanaka, C. Lindquist, L. Steiner.; Long-term results of radiosurgery for arteriovenous malformation: Neurodiagnostic imaging & histological studies of angiographically confirmed nidus obliteration Surg. Neurol. 37:219-230 1992

2 口 答 発 表

- 1) 加藤陽一郎、依田さつき、小林槇雄、川生明 ヒト網膜芽細胞腫における遺伝子発現 第79回日本病理学会秋季総会 平成2年 3月30日 福岡
- 2) 小林槇雄、沢田達男、加藤陽一郎、川生明 アテノウイルス12型誘発ラット網膜腫瘍におけるDNA解析 第80回日本病理学会総会 平成3年4月3日 大阪

- 3) 沢田達男、中村真理、斉藤誠、小林槇雄  
ラット実験中枢神経系腫瘍における Nuclear  
Organizer regions の検討 - BUdR 標識率と  
の比較検討 - 第32回日本神経病理学会総  
会学術研究会 平成3年5月9日 山形
- 4) 加藤陽一郎、森川智子、付強、柴田亮行  
金田良夫、豊田智里、小林槇雄 アテノ  
ウイルス12型誘発網膜培養細胞の分化誘導  
第81回日本病理学会総会  
平成4年5月16日 仙台

はじめに

網膜芽細胞腫（以下RBと略）関連遺伝子RB geneは、RB患者の染色体分析により13番染色体q11から分離された全長約4.7kbのDNA断片（H3-870-70）で、その後RB geneクローニングが行なわれた。このうち翻訳部位は928アミノ酸で構成される遺伝子産物（RB蛋白）をコードし、27のエクソンからなる200kbのゲノムが確認された。また、RB以外の腫瘍（骨肉腫、肝細胞癌、線維肉腫、乳癌）での存在も判明した。我々はこれまでアデノウイルス12型誘発網膜腫瘍についてヒトRBに類似した形態特性、分化誘導に伴う形態変化を明らかにしてきたが、腫瘍化に直接関わる遺伝子レベルの異常に関しては未検討の課題であった。ヒトRBにおいてはアデノウイルス12型DNA断片（E1A, E1B）は、サザンブロット法により組み込まれていないことが確認できたが、最近、RB蛋白とE1A蛋白とが複合体を形成して存在するという驚くべき発見がなされ（Whyte, 1988）、発癌におけるRB蛋白とE



1A 蛋白との関連が想定され注目されている。癌化のメカニズムの解明するためには、腫瘍化の初期でのこれら oncoprotein の発現を検討することが必要であるが、ttrB においてはその初期像を捉えることは難しい。本研究では、再現性の高い発癌モデルを用いて初期過程からの RB gene の発現と E1A 蛋白、核内 oncogene との相互作用、細胞増殖、造腫瘍性に及ぼす影響を分子病理学的に検討した。

腫瘍の誘発は、HEK 細胞で増殖させた ttrA 型ノウイルス 12 型 TW 株（東京大学医科学研究所癌ウイルス研究部白木和子博士の供与） $10^8$  PFU（感染力価）の濃縮液 0.005 ml を用い、Hamilton 注射筒に接続した硝子毛細管により、CDF 系新生仔ラット（生後 24 時間以内）7 匹の眼球内に接種して腫瘍を誘発した。結果は接種後 64 日までに 2 匹の動物に腫瘍が形成された。本実験系を用い、以下の検索を行なった。

1. ttrA 型ノウイルス 12 型誘発腫瘍組織からの E1A 領域の発現を ttrA 抗体を用いたサザンブロット法

及び *in situ hybridization* 法による検討

2. ウイルス接種後、経時的（3日、1週、2週、4週、6-30週）に網膜組織DNAを抽出、サザンブロット法あるいは *in situ hybridization* 法によるRB蛋白とE1A蛋白発現の検討 [平成2年度] 3. PCNAを用いた細胞増殖とオソコソソ(N-myc)の腫瘍組織内同定 [平成3-4年度] 実験成績を以下に述べる。

1. アデノウイルス12型誘発腫瘍組織からのE1A領域の発現の検討

[材料と方法] 腫瘍組織からのDNAの抽出は、Sambrookらの方法にしたがった。新鮮腫瘍組織からのDNAを制限酵素（EcoRI, HindIII）で切断し、1%アガロースゲルで電気泳動によりDNA断片を分離し、<sup>32</sup>P標識したプローブはラジカルプローブにより調整しサザンブロット法に供した。*in situ hybridization*法は、同じプローブをフォトリソグロフで標識し、小路らの方法に従い、4%PFA/PBSで固定した凍結試料を切片とし、プロテアーゼで前処理後に湿箱中で反応を行ない、酵素

抗体法で呈色した。フ<sup>レ</sup>ハイフ<sup>リ</sup>タ<sup>イ</sup>セ<sup>ー</sup>ションには50%ホルムアルミド<sup>ル</sup>、5xSSC、100-200 μg/mlサケ精巢DNA、50mM sodium phosphate (pH 6.5)、0.1%SDS、10xDenhardt液を用いた。

[結果と考察] 対照として、ラット血清アルブミンcDNAをフ<sup>ロ</sup>-フ<sup>ル</sup>とした場合、全てに抽出されたDNAと相補結合するハ<sup>ント</sup>が認められた(図1)。E1A断片をフ<sup>ロ</sup>-フ<sup>ル</sup>とした場合には、腫瘍組織より抽出したDNAにおいてのみハ<sup>ント</sup>が認められた(図2)。さらに、ヒトRB遺伝子cDNA(H3-8領域)では、対照動物から抽出したDNAとは反応が弱い、全てのDNAにおいてハ<sup>ント</sup>が同定できた(図3)。この実験結果からは、ウイルス誘発腫瘍組織ではヒトRBと同様のRB geneの不活性化は証明できなかった。アデノウイルスを接種して1週間後の腫瘍組織において、内顆粒層の細胞にE1Aの発現が確認できた。

2. RB 蛋白とE1A蛋白発現の経時的(3日、1週、2週、4週、6-30週)観察

[材料と方法] 同様の方法で腫瘍誘発を試み

たが、1/22(4.5%)に網膜腫瘍が誘発でき、期間は118日であった。経時的(3日、1週、2週、4週、6-30週)に網膜組織DNAを抽出、E1A蛋白の組み込みが確認できた腫瘍組織について、制限酵素をEcoR1としてtRB gene(H3-8)をプローブとしてサザンブロット法を行ない、また、ハットフィン包埋組織からDNAを抽出して、polymerase chain reaction(PCR)法で検討した。

[結果と考察] 1)の結果であきらかな様にtRB geneに関しては、腫瘍組織、対照共にハットフィンが同定できた。即ち、発癌過程でのtRB及びハットフィンに共通した遺伝子異常が示唆された。このプローブを用いRBにおける遺伝子異常を確認するためのPCR法で観察すると、tRB遺伝子のエクソン3と、RB遺伝子のエクソン20の位置に一例で欠損が証明できた。ウイルス接種して1週、2週後の網膜組織からのDNA発現をみると1週後の内顆粒層の細胞に既に発現が確認できた。

3. 細胞増殖能とN-mycの腫瘍組織内

同定

[材料と方法] ラット新生仔硝子体腔内にウイルス接種後3時間より経時的に眼球を摘出した。組織を4%PFAで固定後、パラフィン包埋切片を作成し、E1A遺伝子とヒトN-myc遺伝子をプローブとして *in situ hybridization* を行ない、同時に抗p53モノクローナル抗体(Oncogene Science社)と抗PCNAモノクローナル抗体(Novocastra社)を用いABC法で免疫染色をした。

[結果と考察] アデノウイルス E1A 遺伝子の mRNA はウイルス接種後3時間から同定することができ、その後持続的に発現していることが確認された(図4-6)。N-myc 遺伝子の mRNA は、6時間後より反応は弱いが発現していた。63時間後に最も顕著に陽性細胞を認めた(図7)。腫瘍組織はいずれも陽性細胞を観察できた(図8, 9) 免疫染色では、p53 の発現は全てにおいて陰性であったが、PCNAの標識率は63時間の組織で急激に増加した。このウイルス誘発実験系では、かなり早期からウイルス初期遺伝子の発現

があり、それに誘導される癌関連遺伝子 N-myc の発現が腫瘍化への重要な役割を担うことが示唆された。また、p53 遺伝子には、変異型が存在し癌遺伝子としての特徴も有することが明きらかにされているが、本研究での染色態度からは腫瘍発生に直接関与していないものと考えられた。

## 結 論

- 1) アデノウイルス12型誘発腫瘍組織ではヒト遺伝生網膜芽細胞腫の腫瘍化に関連すると考えられている RB gene の不活性化は証明できなかった。
- 2) ヒトRB geneに関しては、腫瘍組織、対照共にハットが同定できた。即ち、発癌過程でのヒト及びラットに共通した遺伝子異常が示唆された。このアプローチを用いRBにおける遺伝子異常を確認するため、PCR法で観察すると、ヒトプロモーター遺伝子のエクソン3と、RB遺伝子のエクソン20の位置に一例で欠損が証明できた。
- 3) このウイルス誘発実験系では、かなり早期からウイルス初期遺伝子の発現があり、それに誘導される癌関連遺伝子N-mycの増幅が腫瘍化への重要な役割を担うことが示唆された。
- 4) 癌抑制遺伝子の一つ p53はこの腫瘍発生には直接関与していないものと考えられた。

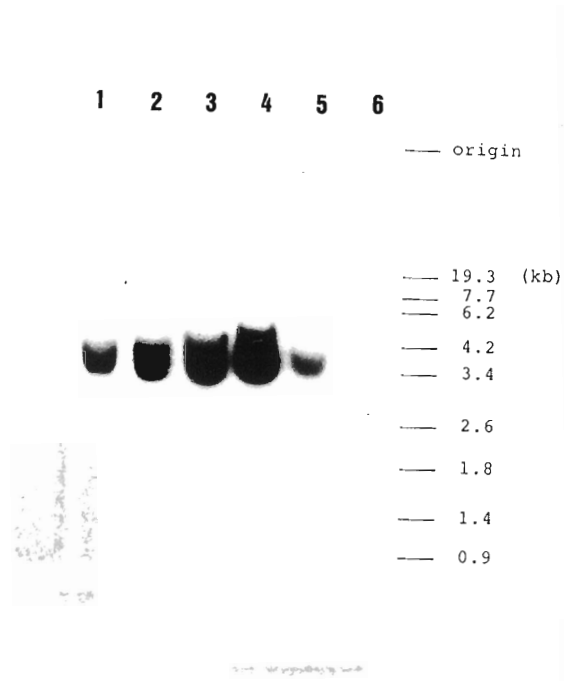


図 1. ラット血清アルファ<sub>2</sub>ミッソをプローブとした

southern blot analysis

- 1: 10  $\mu$ g DNA 担腫瘍動物
- 2: 10  $\mu$ g DNA 担腫瘍動物
- 3: 18  $\mu$ g DNA 対照動物 (網膜)
- 4: 26  $\mu$ g DNA 対照動物 (網膜)
- 5: 8  $\mu$ g DNA 対照動物 (肝)
- 6: 10  $\mu$ g DNA ヒト末梢血 (リンパ球)



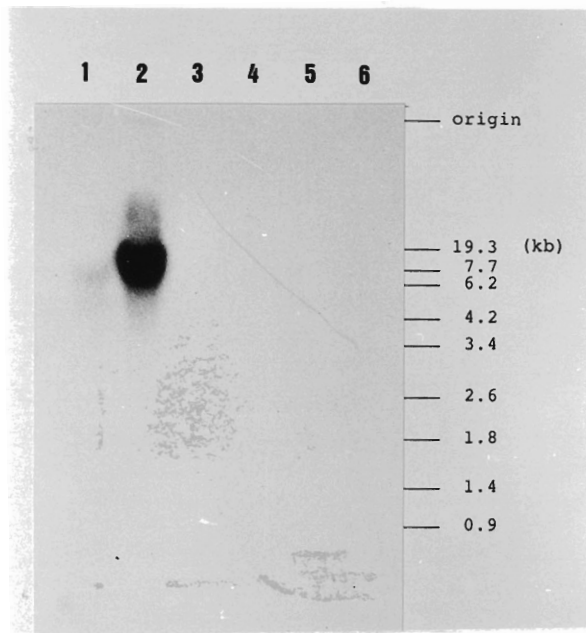


図 2. アデノウイルス12型 E1A をプローブとした

southern blot analysis

1: 10  $\mu$ g DNA 担腫瘍動物

2: 10  $\mu$ g DNA 担腫瘍動物

3: 18  $\mu$ g DNA 対照動物 (網膜)

4: 26  $\mu$ g DNA 対照動物 (網膜)

5: 8  $\mu$ g DNA 対照動物 (肝)

6: 10  $\mu$ g DNA ヒト末梢血 (リンパ球)

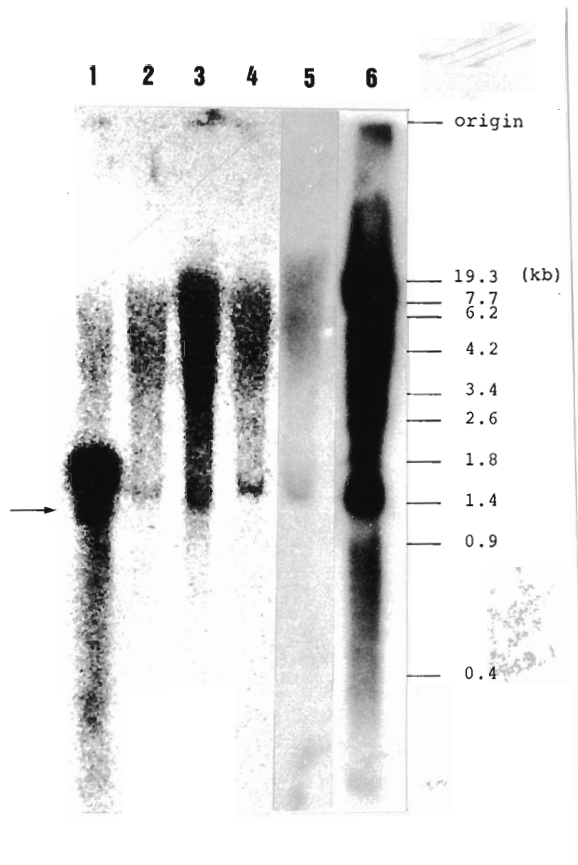


図 3. RB gene (H3-8) 領域をプローブとした southern blot analysis

1: 10  $\mu$ g DNA 担腫瘍動物

2: 10  $\mu$ g DNA 担腫瘍動物

3: 18  $\mu$ g DNA 対照動物 (網膜)

4: 26  $\mu$ g DNA 対照動物 (網膜)

5: 8  $\mu$ g DNA 対照動物 (肝)

6: 10  $\mu$ g DNA ヒト末梢血 (リンパ球)

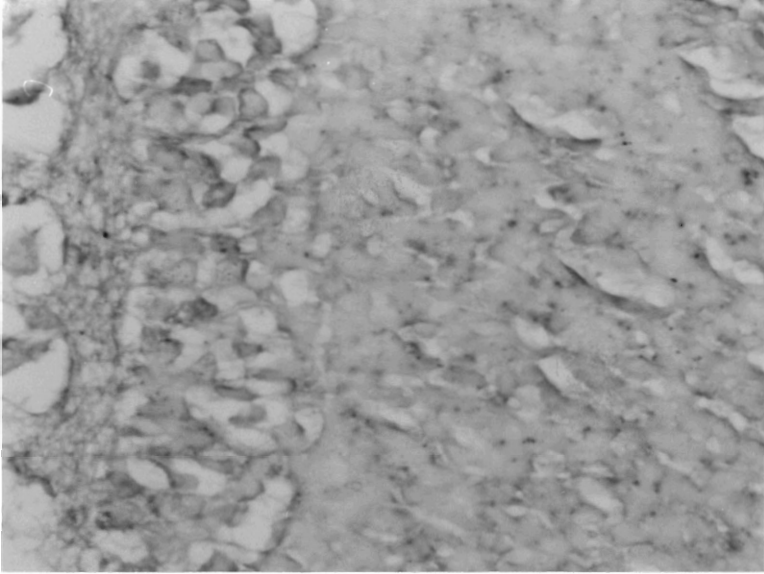


図 4. アデノウイルス接種後 3 時間

E1A oncoprotein mRNA

の局在

( in situ hybridization 法 )

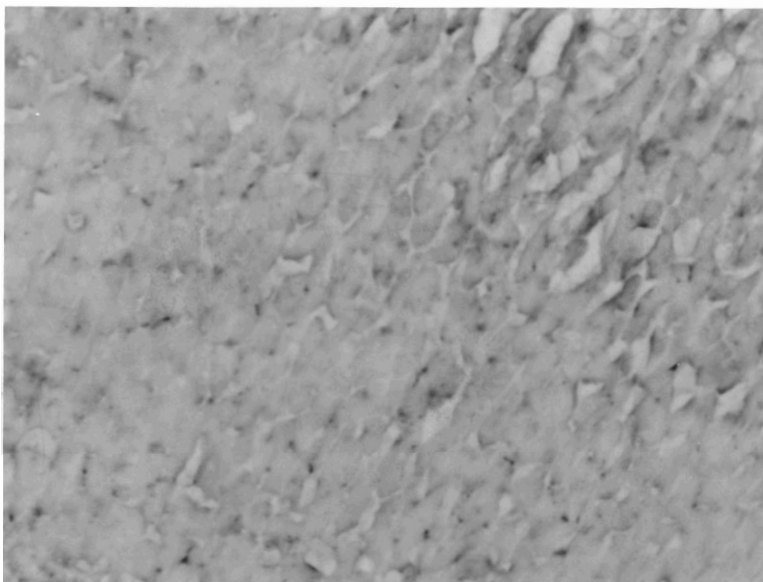


図 6. アデノウイルス接種後 24 時間

E1A oncoprotein mRNA

の局在

( in situ hybridization 法 )

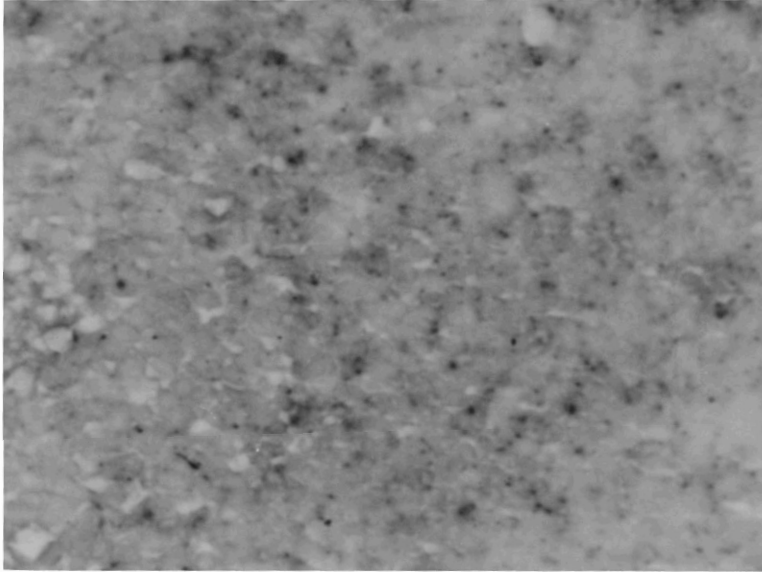


図 7. アデノウイルス接種後 63 時間

N-myc mRNA の局在

( in situ hybridization 法 )

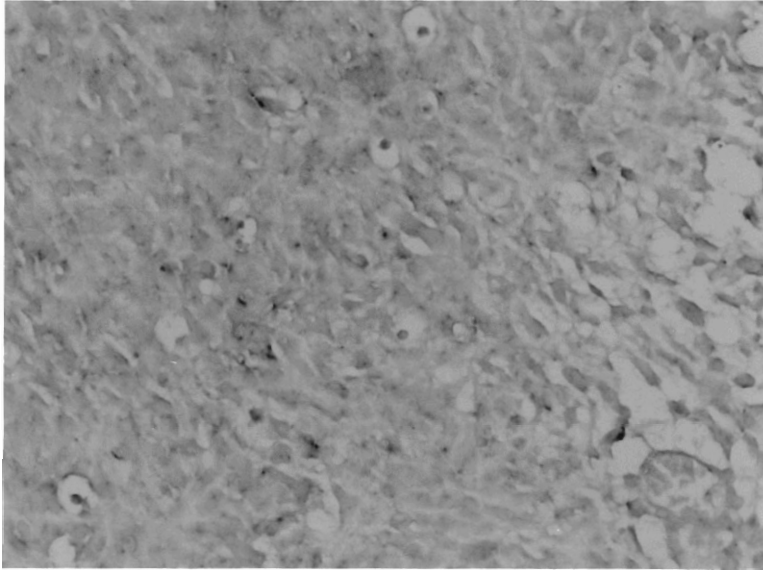


図 9. アデノウイルス接種後 118 日で

誘発された網膜腫瘍

N-myc の局在

( in situ hybridization 法 )