

第5章 環境科学技術研究所自主研究

5.1 キメラマウスを用いた新規発がん解析系の構築

Construction of a Novel System for Analysis of Carcinogenesis Using Chimeric Mice

山内 一己, 綾部 慈子

生物影響研究部、環境影響研究部

Kazumi YAMAUCHI, Yoshiko AYABE

Department of Radiobiology, Department of Radioecology

Abstract

Most of the previous mouse models of carcinogenesis have used genetically engineered mice in which all the cells contain certain genetic mutations and are prone to cancer, but they do not reflect actual human bodies in which wild-type cells and cancer-prone mutant cells are intermingled. In this study, we have generated chimeric mice from wild-type mice and cancer-prone mutant mice. In the chimeric mice, wild type cells and mutant cells express green fluorescence protein (EGFP) and red fluorescence protein (mCherry), respectively, which will enable the direct visualization of competition between the wild type cells and the mutant cells. The distribution of tumor cells in the small intestine and the crypt of the small intestine in chimeric mice of mutant and wild-type mice could be easily distinguished from each other by fluorescence microscopy. In conclusion, this analysis method can be used to easily determine the distribution of tumor and normal tissue-derived cells in chimeric mice expressing fluorescent proteins.

1. 目的

これまでの発がんマウスモデル実験では、すべての細胞に遺伝子変異が入り、がん化しやすい遺伝子改変マウスを用いた研究が大半であり、正常細胞とがん化細胞が混在した我々の体を反映していない。本研究は、野生型マウスとがんを発症しやすい遺伝子変異マウスからキメラマウスを作製し、正常細胞とがん化しやすい細胞の混在環境下で、がんはどのように発生するかその過程を解析することで、細胞競合によりがんの発生は遅延するのか、それとも変わらないのかを解析することで、新規の発がん解析系の構築を目的とした。

2. 方法

本研究ではヒト大腸腺腫症のモデルマウス（A遺伝子ヘテロ欠損マウス）を用意した。また遺伝子欠損マウスとEGFPマウスを掛け合わせ、遺伝子欠損マウス由来細胞を蛍光で区別できるようにした。この

遺伝子欠損マウスの胚とmCherryを持つC57BL/6系統の胚を顕微鏡下で共培養することでキメラ胚を作製した。キメラ胚は仮親に移植後18日目に帝王切開を行い、里親による保育を行った。このキメラマウスは、生後20週齢で麻酔による安楽死後に腸を採取した。腸の内容物をPBSで洗浄した後、腸を開いて濾紙に貼り付け、4%パラホルムアルデヒドに浸漬し、4°Cで一晩組織固定を行った。次に腸を実体蛍光顕微鏡（ライカThunderシステム）で撮影を行った。

3. 成果の概要

図1は、EGFPを持つA遺伝子ヘテロ欠損マウスとmCherryを持つC57BL/6野生型とのキメラマウスの腸を示した。正常な腸の絨毛部では、緑と赤の蛍光が混在していた。また正常なA遺伝子が欠損したことにより発生した腫瘍（白矢印）では、その大部分

が緑色蛍光を持つ細胞からなっていたため、腫瘍部位はA遺伝子ヘテロ欠損マウス由来であることがわかった。

図2は、小腸の凍結切片を作製して撮影した組織を示した。小腸の絨毛は同一蛍光から出来ているものや2色の細胞由来のものが見られた。また小腸の絨毛を作るクリプト細胞については多くが同一色であることがわかった。このことから緑と赤の2色を持つ絨毛は、隣り合った赤と緑のクリプト細胞由来であることが示唆された。

本研究は、正常細胞とがん化しやすい細胞の混在環境下で、がんはどのように発生するかその過程を解析するための解析系の構築を目的とした。そのため、まず遺伝子欠損マウスと野生型マウスのキメラマウスの作製を行い、つぎにキメラマウスの組織やがんの細胞構成を蛍光で解析するための検出系の構築を行った。

キメラマウスの作製については、遺伝子欠損マウス胚と複数の野生型マウスの胚とのキメラマウスを安定的に作製する方法の確立ができたことから、今後は同一もしくは異なるマウス系統の細胞からなるキメラマウスでがんの発生はどのように影響するかについて明らかに出来ると考えられる。またキメラマウスの臓器を用いた解析では、実体顕微鏡下や凍結切片による蛍光解析で組織を構築する細胞集団の由来の区別が出来ることから、今後は経時的な解剖を行い、がんの発生で遺伝子欠損マウス由来の細胞と正常細胞は、腫瘍発生時に細胞競合を起こすのか、また細胞競合が生じるときにはアポトーシスなどを正常細胞に誘発し除去することが報告されていることから、蛍光観察のほか、HE染色や免疫染色による組織解析をあわせることで、細胞競合の解析に用いることの出来る解析系を構築できた。

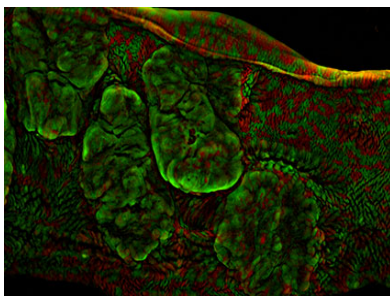


Fig.1 Small intestinal tumor of mutant and wild-type mouse chimeras.

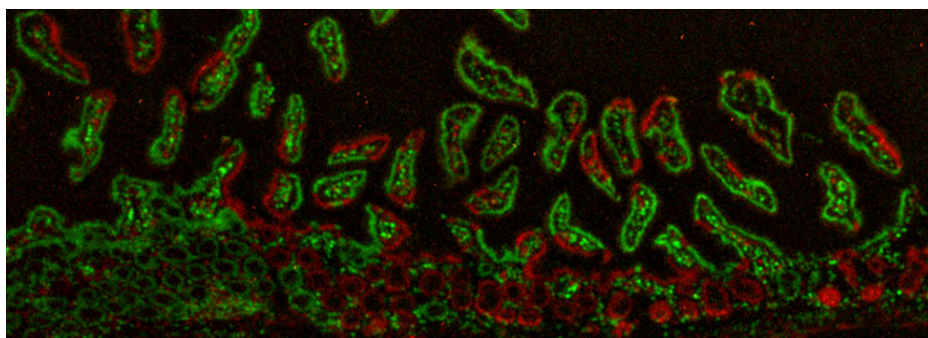


Fig.2 Small intestinal of mutant and wild-type mouse chimeras.