

8.3 がん抑制遺伝子*Apc*を標的とした新規突然変異解析系の構築

Construction of a Novel Mutation Analysis System Targeting the Cancer Suppressor Gene *Apc*

山内 一己,

生物影響研究部

Kazumi YAMAUCHI

Department of Radiobiology, Department of Radioecology

Abstract

Apc^{min/+} mice, an animal model for human colorectal cancer, show activated Wnt signaling and accumulate an excessive amount of intracellular β -catenin protein due to a second-hit mutation in the *Apc* gene in somatic cells. We established a novel mutation monitoring system using a cross between *Apc*^{min/+} and TCF/Lef:H2B-GFP transgenic mice. In resulting monitor mice (Tcf-*Apc*^{min/+}), GFP expression is induced by constitutively activated Wnt signaling (β -catenin accumulation) when the normal *Apc* gene is lost. To determine whether *Apc* mutations increase with radiation exposure, these Tcf-*Apc*^{min/+} mice were exposed to 4.2 Gy gamma-rays at a high dose-rate (0.65 Gy/min) at 1 week of age and GFP-reporter expression in cells was evaluated. Results show that GFP-expression in cells of the large intestine was significantly increased in irradiated mice. This means that GFP-reporter expression can be detected in the large intestine of the Tcf-*Apc*^{min/+} mice. This system will be useful in analyzing oncogenic mutations induced by radiation.

1. 目的

ヒト大腸腺腫症のモデルマウスである*Apc*^{min/+}マウスでは、正常*Apc*遺伝子に変異が発生することにより細胞内のWntシグナル活性化 (β -カテニンタンパク質の過剰蓄積) を生じる。この*Apc*^{min/+}マウスと、Wntシグナル活性化を緑色蛍光タンパク質 (GFP) の発現により検出することのできるTCF/Lef:H2B-GFPトランスジェニックマウス (以下Tcfマウス) とかけ合わせて使用することで、正常*Apc*遺伝子が欠損すると細胞のWntシグナルが恒常的に活性化し、GFP蛍光細胞としてマウス組織上で検出のできる新規突然変異解析系のマウスの作製を行う。またこのマウスに放射線照射を行い、放射線照射による*Apc*遺伝子の突然変異の増加が、GFP蛍光細胞数の増加として組織上に検出されるか明らかとする。

2. 方法

2.1. 突然変異検出系マウスの作製とガンマ線照射

Tcfマウス (TCF/Lef:H2B GFPトランスジェニックマウスIMSR_JAX:013752) のオスマウスを、ジャクソンラボより購入した。このマウスの精巣上体尾部より精子を採取し、超過排卵処理を行った*Apc*^{min/+}メスマウスから採取した卵子と体外受精を行い、受精卵を作製した。次に受精卵を偽妊娠処理ICRメスマウスに移植した。得られた仔マウスはPCR法により遺伝子型を決定し、野生型*Apc*のTcfマウス (以下、野生型Tcfマウス) と*Apc*^{min/+}バックグラウンドのTcfマウス (以下、Tcf-*Apc*^{min/+}) を得た。また生後1週齢の野生型TcfマウスとTcf-*Apc*^{min/+}マウスにそれぞれ4.2 Gy (0.65 Gy/分) のガンマ線照射を行った。

2.2. 突然変異検出系マウスの解剖と蛍光顕微鏡による組織解析

野生型TcfマウスとTcf-*Apc*^{min/+}マウスはそれぞれイソフルランで麻酔を行い、冷PBSならびに4%パラホルムアルデヒドで灌流固定を行った後、臓器をさらに4℃の4%パラホルムアルデヒドで24時間固定した。また肝臓は、SCALEVIEW-S（富士フィルム和光純薬工業）で透明化を行った。Thunderモデル生物蛍光実体顕微鏡（ライカマイクロシステムズ）で臓器組織上のGFPを発する細胞の検出を行った。また画像処理はiMac(2019)とAdobe Photoshop CCを用いて行った。

3. 成果の概要

非照射の野生型Tcfマウスは、小腸や大腸でWntシグナルが恒常的に発現していないためGFPタンパクを発現している細胞は観察されなかった。一方、Wntシグナルが恒常的に発現している肝臓や毛嚢ではGFPタンパクを持つ細胞が検出された（Fig. 1）。次にTcf-*Apc*^{min/+}マウスの大腸や小腸を解析したところ、少数のGFP蛍光細胞が検出された（Fig. 2A）。このことから、Tcf-*Apc*^{min/+}マウスで見

られたGFP蛍光細胞は、*Apc*遺伝子が欠損した細胞であることが示唆された。また生後1週齢のTcf-*Apc*^{min/+}マウスに4.2 Gyの高線量率（0.65 Gy/分）ガンマ線を照射し、4週齢で解剖を行い大腸と小腸の蛍光を観察したところ、非照射Tcf-*Apc*^{min/+}マウスより蛍光を持つ細胞数が顕著に増加したことが明らかとなった（Fig. 2B）。このことは、高線量率ガンマ線照射により正常*Apc*遺伝子の変異が増加したことを示唆している。また、腫瘍が多く見られる直腸では蛍光を持つ細胞が多く見られるのに対し、盲腸から直腸までの腫瘍がほとんど見られなかった領域については蛍光を持つ細胞が見られなかったことから、蛍光を持つ細胞と腫瘍の発生パターンには相関があることが示唆された。

以上のことから、正常*Apc*遺伝子を標的とした新規突然変異解析系の構築を行うことができた結論される。今後、この蛍光細胞の出現が、照射する放射線の線量により、また被ばく時の週齢によりどのような変化を示すか、また蛍光細胞の発生数と肉眼的腫瘍数の相関や、正常*Apc*遺伝子のDNA変異パターンを調べることを計画している。

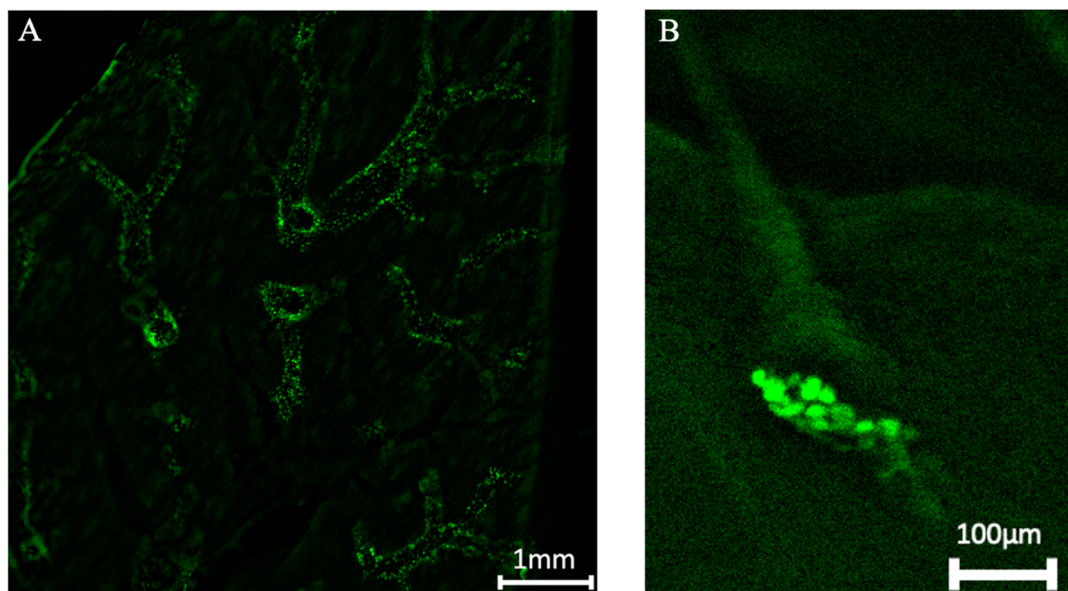


Fig. 1. Fluorescent images of cells in wild-type TCF/Lef:H2B-GFP mice.

- (A) Liver: The GFP- reporter expression in zone 3 hepatocytes with activated Wnt/ β -catenin signaling near the central vein.
- (B) Hair follicles: The GFP- reporter expression observed in actively proliferating cells.

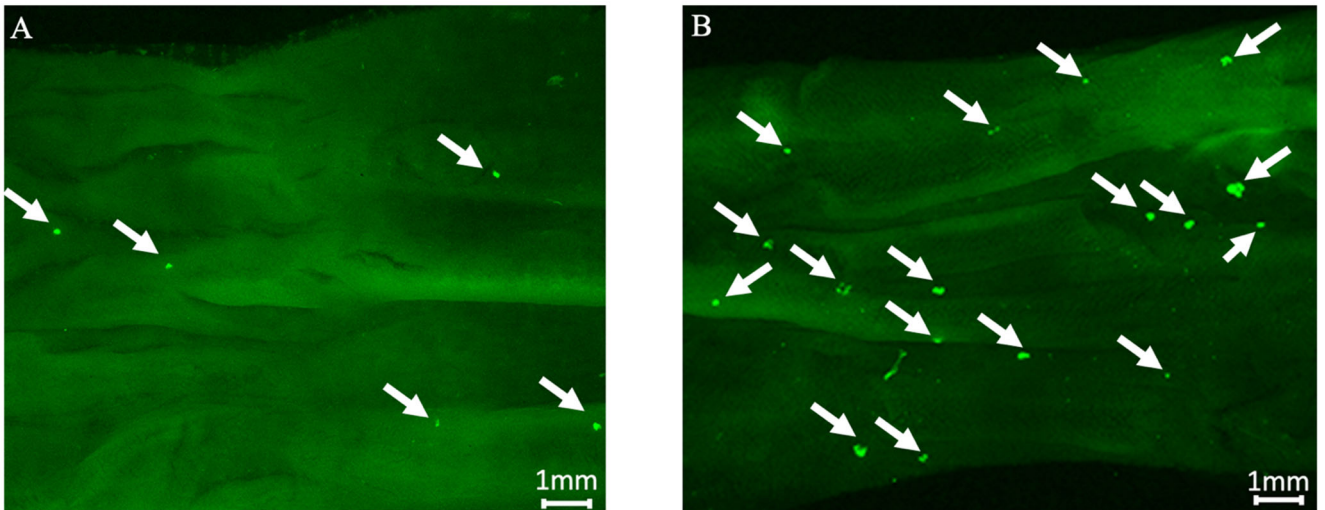


Fig. 2. Fluorescent images of the large intestine of Tcf- *Apc*^{min/+} mice.

(A) Large intestine from an 8-week-old non-irradiated control mouse.

(B) Large intestine from a 4-week-old mouse, exposed to 4.2 Gy gamma-rays at a high dose-rate (0.65 Gy/min) at 1 week of age. The increase in the number of GFP-positive cells in the irradiated mouse suggests that high dose-rate gamma irradiation increases the frequency of mutations in the *Apc* gene.