



Nagoya City University Academic Repository

学位の種類	博士(薬学)
報告番号	甲第1442号
学位記番号	第303号
氏名	坂井 勇斗
授与年月日	平成26年3月31日
学位論文の題名	がんの発生及びその特性における TRB3 の機能解析
論文審査担当者	主査： 服部 光治 副査： 林 秀敏, 平嶋 尚英, 長田 茂宏

名古屋市立大学学位論文

マウス乳がん細胞における
キナーゼ様遺伝子 **TRB3** 発現の影響解析

2014 年

坂井 勇斗

名古屋市立大学大学院薬学研究科

医薬品代謝解析学分野

Ph. D. Dissertation

Functional analysis of pseudokinase TRB3
in mouse mammary tumor cell line

2014

Yuto Sakai

Department of Drug Metabolism and Disposition,
Graduate School of Pharmaceutical Sciences,
Nagoya City University

1. 本論文は、2014年3月に名古屋市立大学大学院薬学研究科において審査されたものである。

主査 服部 光治 教授

副査 平嶋 尚英 教授
長田 茂宏 准教授
林 秀敏 教授

2. 本論文は学術雑誌に掲載された次の報文を基礎とするものである。

(I) Sakai Y, Fukamachi K, Futakuchi M, Hayashi H, Suzui M.

Promotive effects of cell proliferation and chromosomal instability induced by tribbles-related protein 3 in mouse mammary tumor cells.

Oncol Rep., 30; 64-70, 2013.

(II) Sakai Y, Fukamachi K, Futakuchi M, Miyoshi I, Tsuda H, Suzui M, Hayashi H.

A novel transgenic mouse model carrying human Tribbles related protein 3 (TRB3) gene and its site specific phenotype.

Biol Pharm Bull., 37; 1068-1074, 2014.

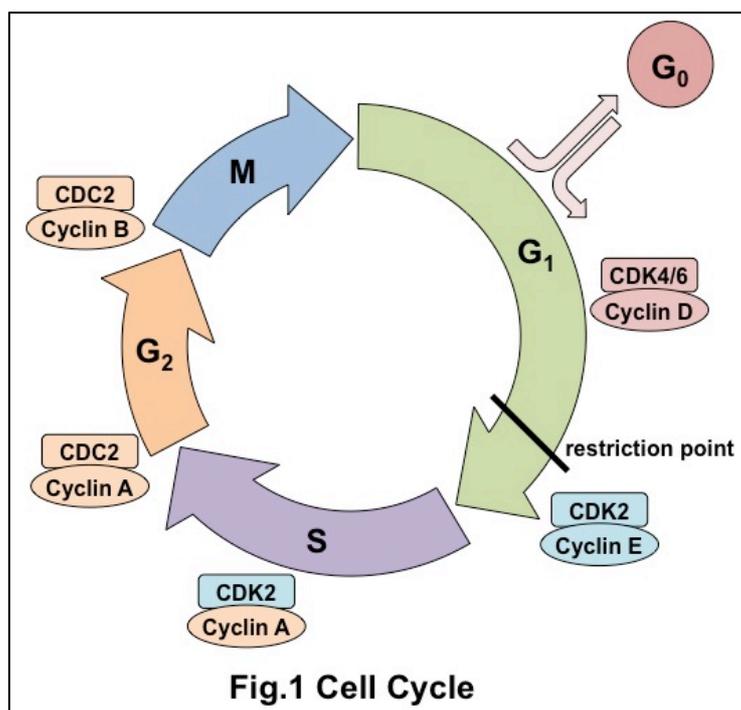
3. 本論文の基礎となる研究は、林 秀敏 教授の指導のもとに名古屋市立大学大学院薬学研究科において行われた。

目次

第1章	序論	3
第2章	マウス乳がん細胞を用いた TRB3 発現による細胞増殖と染色体安定性への影響	8
第3章	TRB3 遺伝子発現新規トランスジェニックマウスとその組織特異的表現型	17
第4章	総括	26
第5章	結論	32
第6章	実験材料及び方法	33
	謝辞	40
	引用文献	41

第1章 序論

細胞は外界を隔離する膜構造に囲まれ、内部に自己再生能を備えた遺伝情報とその発現機能を持つ生命体である。細胞が増殖するには、まず遺伝情報の担い手である DNA が複製され、引き続き、染色体の分配、核分裂、細胞質分裂が順に起こることが必要である。すべての細胞は既に存在していた細胞が分裂することにより生じており、細胞や生物の進化は細胞分裂による遺伝情報の伝達に依存してきたといっても過言ではない。これら一連のイベントは細胞周期 (cell cycle) と呼ばれ、G₁、S、G₂、M の 4 期に分けることができる (Fig.1)。細胞は S 期に DNA を合成し (DNA synthesis)、M 期に分裂する (mitosis)。G₁、G₂ はそれぞれ、S 期や M 期に入るための準備とチェックが行われる時期 (gap) である。増殖を停止した休止期は G₀ 期と呼ばれる。



細胞周期は発生・分化・増殖などさまざまな生命現象に関与している。この細胞周期に異常が生じると、異常を解消するまで細胞周期を停止し、異常を解消できない場合、細胞はアポトーシスが誘導される。この異常が残ったまま細胞増殖が繰り返されると、細胞にがん化が誘導されることがある。細胞の終末分化は細胞周期を停止させ、細胞

老化は細胞周期の終焉を迎える。このように細胞周期は様々な生命現象の基礎となっている。

細胞周期には多くのタンパク質が関与しているが、その中心的な役割を担っているのが Cyclin-Cdk (cyclin dependent kinase) である。リン酸化酵素である Cdk は細胞周期の進行において Cyclin と結合することが活性化に必須である。Cyclin は現在 20 種類以上が同定されており、その中で Cyclin A、B、D、E が細

胞周期に直接関与している。これらは細胞周期の特定の時期に発現が上昇するので、特定の **Cyclin-Cdk** 複合体が時期特異的に形成されることになる。

多細胞生物は多数の分化した細胞の集合体であり、その細胞増殖は個体としての必要性に応じて調節される。個体の恒常性が維持されるためには、構成細胞の数、役割、位置関係が適切に調節されている必要がある。多細胞生物の適切な増殖にはこれを指令する因子の刺激を必要とする。このようなシグナルを担う一群のタンパク質が **EGF (epidermal growth factor、上皮増殖因子)** などの細胞増殖因子である。

細胞周期の **G₁** 後期には **restriction point** という時期があり (Fig.1)、ここで次の周期に入るか否かが決定される。細胞増殖因子の刺激は細胞周期が **G₁** 期を進行して **restriction point** を超えるのに必要とされ、いったんここを超えると刺激が継続していなくても細胞周期は進行し、細胞分裂まで進んで細胞周期を一周することができる。細胞増殖因子シグナルの標的遺伝子の一つである **Cyclin D** は **G₁** 期が **restriction point** を超えて進行するうえで重要な役割を果たす。また、**G₀** 期にある細胞が細胞周期を開始するときにも細胞増殖因子による刺激が必要とされる。

Drosophila における **Tribbles** というキナーゼ様タンパクがプロテアソーム経路を介して、細胞周期の **G₂/M** 移行期に関わる制御因子の一つである **String** の分解を誘導していることが報告されている (Mata *et al.*, 2000)。*Drosophila* の胚での **Tribbles** による **String** の発現制御は発生時の **G₂** 期での **String** のダウンレギュレーションにともなう分化促進に重要であると考えられている。このように **Tribbles** は **String** の発現や活性を制御して **M** 期移行を停止したり、遅延させたりすることにより細胞周期、及び増殖に関与していると考えられる。その他には神経細胞の分化、細胞増殖などに関連する **Notch** も **String** の機能を制御していると報告されている (Shcherbata *et al.*, 2004、Grobhans *et al.*, 2000、Thomas *et al.*, 2000)。**Tribbles** は、セリン/スレオニンキナーゼと高い相同性を持ち、セリン/スレオニンキナーゼの 12 の sub-domain からなる **kinase catalytic core domain** のコンセンサス配列のほとんど全てを持つが、キナーゼ活性に必要な **ATP** 結合部位におけるコンセンサス配列が保存されておらず、**Tribbles** のキナーゼとしての機能は否定的である (Johnston *et al.*, 2000)。**Tribbles** の哺乳類でのホモログ (dog; C5FW、rat; NIPK、human; TRB) も種を越えて同定されているが、それらの機能や発現調節がどのように行われているかはほとんど明らか

にされていなかった (Bowers *et al.*, 2003)。ヒトでの Tribbles のホモログである TRB (tribbles related protein) は現在のところ 3 種類 (TRB1、TRB2、TRB3) 同定されており、Tribbles 同様にセリン/スレオニンキナーゼの基質結合触媒ドメインを持つが、ATP 結合ドメインやキナーゼ活性に不可欠な触媒モチーフを持たない (Bowers *et al.*, 2003) ことから pseudokinase の一つと定義されている (Fig.2)。既に TRB3 が Akt/PKB に結合し、そのキナーゼ活性を阻害するこ

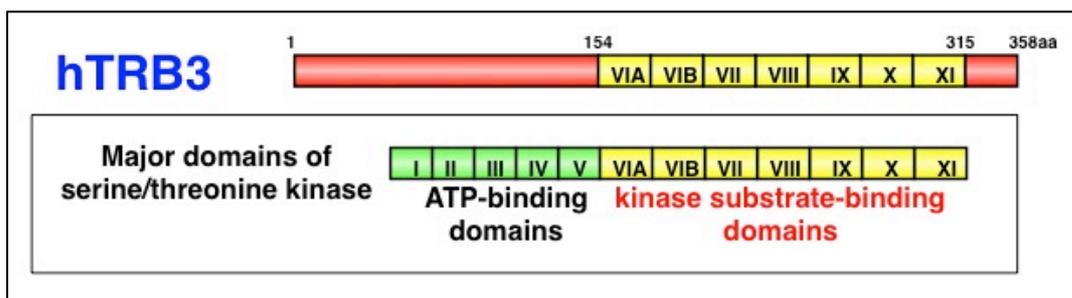


Fig. 2 TRB3 contains the classic substrate-binding domains of a protein kinase but not ATP-binding and kinase-activating domains.

とによりインスリン抵抗性獲得で重要な役割を果たす分子であることが明らかにされている (Du *et al.*, 2003)。TRB3 は MAPKK (mitogen-activated protein kinase kinase) と結合し MAPK (mitogen-activated protein kinase) シグナルを阻害することが報告されており (Kiss-Toth *et al.*, 2004)、内在性のキナーゼインヒビターとして機能している可能性が考えられている。また、当研究室の Ohoka らも小胞体ストレスと呼ばれるストレス応答で TRB3 が発現誘導され小胞体ストレス依存的な細胞死に貢献していること (Ohoka *et al.*, 2005)、脂肪細胞分化に重要な PPAR γ (peroxisome proliferators-activated receptor γ) の転写活性を抑制すること (Takahashi *et al.*, 2008) を明らかにしており、TRB3 は転写の制御も担っていることも考えられる。TRB3 は飢餓状態に応じて蓄積し、肝臓で Akt の活性化を抑制すること (Du *et al.*, 2003、Koo *et al.*, 2004)、TRB3 は脂肪組織で ACC (acetyl-coenzyme A carboxylase) の分解を誘発することによって脂肪分解を促進することも報告されている (Qi *et al.*, 2006)。また、Cdk の活性化に不可欠な cell division cycle 25A (Cdc25A) の安定性を TRB3 が制御することも報告しており (Sakai *et al.*, 2010)、TRB3 の細胞周期への関与も考えられている。

正常な細胞が性質を変えてしまい、増殖制御機構が欠落し、自立的に増殖しつ

づけるようになった細胞集団を腫瘍と呼ぶ。腫瘍細胞はその増殖に必要な酸素や栄養素を宿主個体に依存しており、酸素や栄養素を宿主の正常細胞から奪い取ることになるため宿主の健康状態は悪化する。また、腫瘍細胞は協調性を欠いているため細胞間コミュニケーションを無視し局所環境や宿主の栄養状態が悪化しても増殖を続け、最終的に宿主の生命を脅かすことになる。腫瘍は臨床上の特徴に基づき良性腫瘍 (benign tumor) と悪性腫瘍 (malignant tumor) に分類される。良性腫瘍は顕微鏡的にも肉眼的にも正常に近い特徴を持ち、細胞の異型性が乏しい。増殖は比較的ゆっくりで局所に留まり、大きくなると周囲の組織を圧迫することもあるが、腫瘍と隣接組織との境界がはっきりしている (膨張性発育)。転移や浸潤がないため、一般的には腫瘍領域を切除すれば治癒は可能である。一方、悪性腫瘍は異型性が強く、隣接組織を破壊して周囲に浸潤してから増殖し (浸潤性発育)、さらには遠隔臓器にも転移する。切除しても再発の可能性があるが、死亡の原因になることが多い。上皮性と非上皮性悪性腫瘍を合わせたものが「がん」である。

がんは、日本人の主要な死因が感染症から生活習慣病へと移行する中で、1981年以來日本人の死亡原因の第1位となり、疾病対策上の最重要課題として対応が進められている。また、生活習慣や食生活の変化に伴い発生するがんの種類は多様化してきており、がんは人類を悩ます共通かつ最強の敵とも言うべき疾患であり、その制圧は全世界的な課題となっている。近年、がんの病態の遺伝子レベルでの解析が進み、「がんは遺伝子の異常によっておこる病気である」という概念が確立する等、本態解明の進展とともに、各種悪性腫瘍の早期発見手法の確立、標準的な治療法の確立等、診断・治療技術も目覚ましい発展を遂げており、現在も予防、診断、治療に関する研究が多く推進されている。がん細胞における細胞周期のチェックポイント機能の異常やアポトーシスに対する抵抗性の獲得など、その増殖の制御機構や異常時の修復機構が破綻することによって、がんが発生することが明らかにされているが、依然としてその病態には不明な部分が多い。

がん細胞の特徴の一つは自律的細胞増殖である。外来性のシグナルがなくても増殖が無制限に持続してしまう。そのメカニズムは多種多様であり、自分自身で細胞増殖因子を大量に産生して増殖する例もあれば、細胞増殖因子受容体あるいはその下流のシグナル伝達因子が変異して機能変化することにより、外来性シグナルがない状態でも細胞増殖の指令をだしつづけることもある。このよ

うに、細胞増殖因子のシグナル伝達経路の破綻によっても異常な細胞増殖が引き起こされていることが考えられている。

近年、先述した TRB3 が腫瘍形成における重要な修飾因子であることが報告されている。例えば、TRB1 及び TRB2 は骨髄性白血病に関与することが示唆されている (Keeshan *et al.*, 2006、Jin *et al.*, 2007)。なかでも、TRB3 は大腸がん細胞株において siRNA によって発現をノックダウンさせるとその増殖が有意に抑制されること、また、がん組織において TRB3 が高発現していた大腸がん患者は、術後の予後が悪く、がん組織において TRB3 の発現レベルが低かった患者に比べ、生存率が有意に低下することが報告されている (Fig.3、Miyoshi *et al.*, 2009)。さらに、TRB3 は大腸がんを含めた各種ヒトがん細胞株、がん組織で過剰発現していることが報告されている (Bowers *et al.*, 2003、Xu *et al.*, 2007)。このように、がんの形成や増殖、悪性化に TRB3 の関与が強く疑われるが、その明確な役割は未だ明らかになっていない。

本研究では、TRB3 の発現が *in vitro* / *in vivo* における細胞増殖、及び形態学的な特徴に影響を与えるかどうかについて解析することを目的とした。

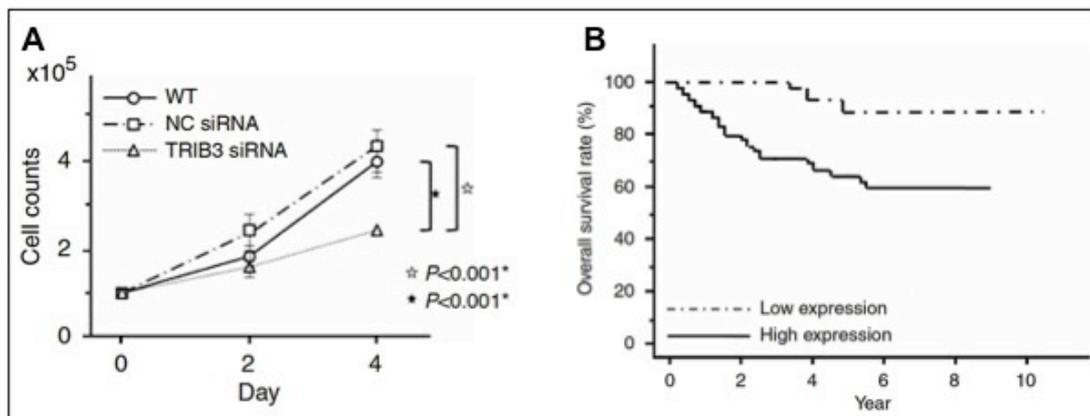


Fig. 3 (A) Proliferation assay with siRNA inhibition in colorectal cancer cell line. (B) Overall survival rates of patients with colorectal cancer on the basis of TRB3 mRNA expression status. (Miyoshi *et al.*, *Br. J. Cancer* (2009))

第 2 章 マウス乳がん細胞を用いた TRB3 発現による細胞増殖と染色体安定性への影響

2-1 序

Tribbles-related protein 3 (TRB3) (NIPK、SKIP3) は、*Drosophila* における Tribbles 遺伝子のヒトでのホモログである。Tribbles は、細胞増殖、細胞遊走や細胞の形態形成を調節する有糸分裂の抑制因子として特定されている (Grosshans *et al.* 2000、Mata *et al.*, 2000、Seher *et al.*, 2000)。Tribbles のホモログである TRB1、TRB2 及び TRB3 は、セリン/スレオニンキナーゼと同様の触媒ドメインを持っているが、ATP 結合サイトやキナーゼ活性に必要な触媒モチーフが欠落しているため pseudokinase ファミリーとして定義されている (Fig.2、Bowers *et al.*, 2003)。その中で TRB3 は、その相互作用のパートナーとして、転写因子、ユビキチンリガーゼ、bone morphogenetic protein (BMP) type II レセプターから mitogen-activated protein kinase (MAPK) のメンバーや phosphoinositide 3-kinase (PI3K) シグナル伝達関連分子等、広範囲に渡っていることがこれまでに報告されている。これらのタンパクと相互作用することによって、TRB3 は糖/脂質代謝、アポトーシス、脂肪細胞分化、細胞ストレスやコラーゲン発現調節等を含む重要な細胞プロセスに関与している (Bezy *et al.*, 2007、Chan *et al.*, 2007、Du *et al.*, 2003、Qi *et al.*, 2006、Tang *et al.*, 2008)。当研究室では以前に、TRB3 が C/EBP homologous protein (CHOP) や activating transcription factor 4 (ATF4) によって誘導され、これらの機能や小胞体ストレス誘導性の細胞死を調節することを報告している (Ohoka *et al.*, 2005)。また、TRB3 は Cdk の必須活性化因子である脱リン酸化酵素 Cdc25A の安定性を制御することを報告している (Sakai *et al.*, 2010)。最近では、前述のように Tribbles ホモログである三つのヒト TRB が、腫瘍形成の重要なモジュレーターであることが報告されている。特に、TRB3 は、広範囲に渡るヒトがん細胞株や数種類のヒトがん腫瘍で高発現していることが報告されている (Bowers *et al.*, 2003、Xu *et al.*, 2007) が、腫瘍形成における TRB3 の正確な役割は未だ不明である。そこで、本研究ではマウス乳がん細胞へのヒト TRB3 遺伝子の導入が、腫瘍細胞の細胞分裂過程や染色体安定性に影響を与えるかどうかを *in vitro* 及び *in vivo* にて検討することとした。

2-2 実験結果

1. M2TRB3 細胞株における TRB3 の発現レベル解析

細胞増殖における TRB3 の役割を解析するために、マウス乳がん細胞株 C166M2 (M2) にヒト TRB3 遺伝子をトランスフェクションすることによって、ヒト TRB3 遺伝子を安定して発現する細胞株 (M2TRB3) を作製した。また、空ベクター pcDNA3.1-Hygro を同様にトランスフェクションすることによって、コントロール細胞株 (M2mock) を作製した。ヒト TRB3 の mRNA 発現を確認すると、親株の M2 細胞及び M2mock 細胞株においては認められなかったが、M2TRB3 細胞株では、ヒト胎児腎細胞株 HEK293 及びヒト肝がん細胞株 HepG2 と同様に、ヒト TRB3 mRNA を発現していた (Fig.4A)。ヒト TRB3 mRNA を発現していた。ここでは、pcDNA3.1-Hygro-flag-human TRB3 発現ベクターを PCR で増幅されたものをポジティブコントロールとした (Fig.4A)。また、親株 M2 及び M2mock 各細胞株で見られたマウス TRB3 mRNA の発現は、ヒト TRB3 安定発現株 M2TRB3 細胞では、増加していることが明らかとなった。さらに、外因性のヒト TRB3 タンパクの発現レベルは、TRB3 に結合している Flag

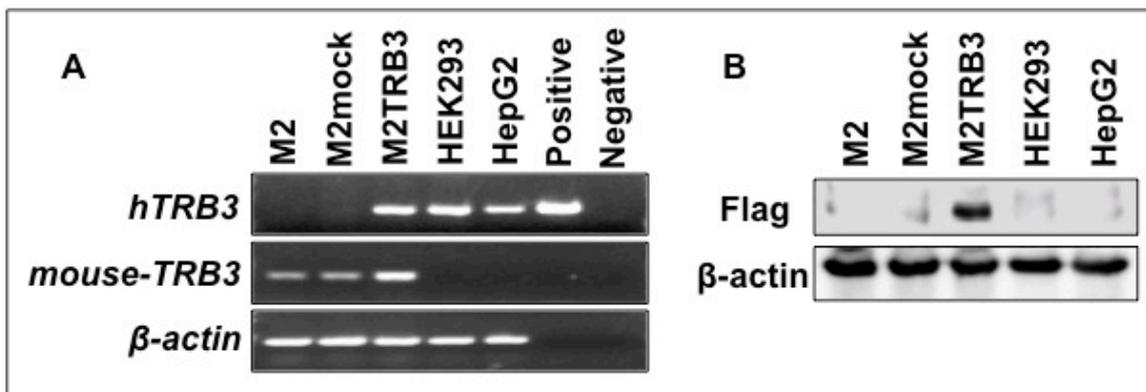


Fig. 4 Expression status of exogenous human TRB3 and endogenous mouse TRB3 in the indicated cell lines. (A) Representative results of the RT-PCR analysis. The band in the positive control was derived from DNA fragments that were PCR-amplified using pcDNA3.1-Hygro-flag-human TRB3 vector as a template and the pairs of gene-specific primers listed in Materials and Methods. No band was noted in the negative control since the empty vector (pcDNA3.1-Hygro) that does not carry specific sites for the primers was used as a template for PCR. Bands of β -actin were not observed in the positive and negative control samples due to the same reason as the negative control. (B) Representative results of the Western blot analysis. The exogenous human TRB3 (Flag-TRB3) protein was detected in the M2TRB3 cells by using anti-Flag antibody.

タグの抗体で検出すると M2TRB3 細胞株でのみ確認された (Fig.4B)。M2、M2mock、HEK293 及び HepG2 細胞株 (Fig.4B) では見られなかった。そこで、M2TRB3 細胞株と M2mock 細胞株を細胞増殖解析に使用した。

2. TRB3 遺伝子は細胞増殖と腫瘍体積を増大させる

TRB3 遺伝子の腫瘍形成能を検討するために、M2TRB3 細胞株及び M2mock 細胞株を使用して、細胞増殖、腫瘍成長への影響を解析した。M2TRB3 細胞数は、48h と 72h の時点で M2mock 細胞数に比べて有意に増加した ($P<0.01$ and 0.05 , respectively) (Fig.5A)。72h では、M2mock 細胞数に比べ M2TRB3 細胞数は、34%の増加が見られた。次に、マウス皮下組織に移植した M2TRB3 細胞株の細胞増殖を検討するために、異種移植マウスモデル (tumor xenograft mouse model) を使用した (「第 6 章 実験材料と方法参照」)。実験を通して全てのマウスの観察を週に 2 回行った。腫瘍の成長は、細胞の移植後 7 日後から 35 日後まで、目視で観察を行った。腫瘍体積 (mm^3) と体重 (g) は週 2 回計測を行った。

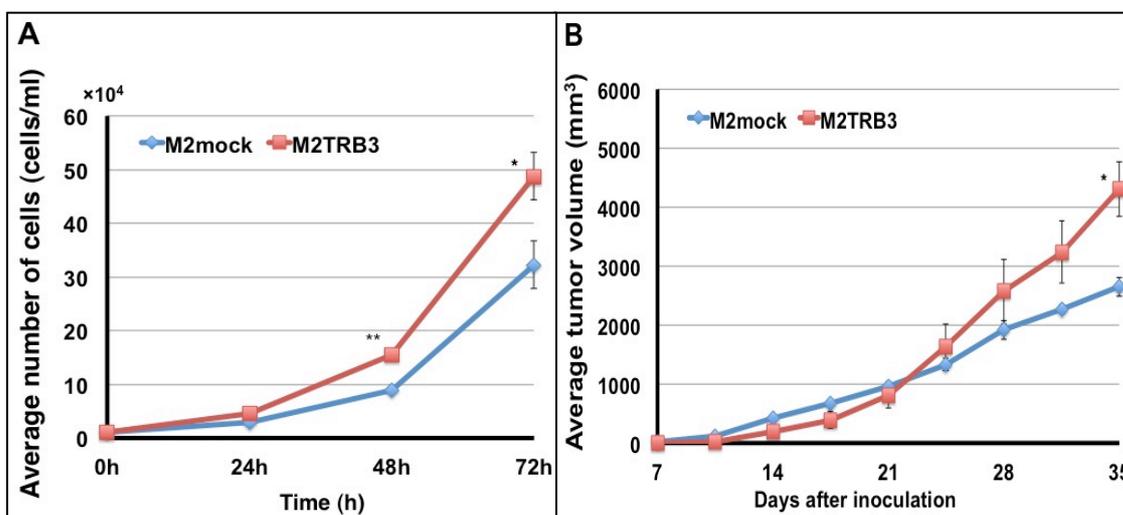


Fig. 5 Growth enhancing effects of the TRB3 gene. (A) Growth curve of the cell proliferation assay. Asterisk(s) indicate statistical significance between the two cell lines ($*P<0.05$, $**P<0.01$). (B) Volume of the M2TRB3 tumors and M2mock tumors. Asterisk indicates statistical significance in tumor volume between the two tumors ($*P<0.05$).

飼育期間を通じて特異的な身体的及び行動的变化は、どのマウスにも見られなかった。M2TRB3 腫瘍の平均体積は、M2mock 腫瘍の平均体積に比べて、実験 35 日目において 38%有意に増大した ($P<0.05$) (Fig. 5B)。

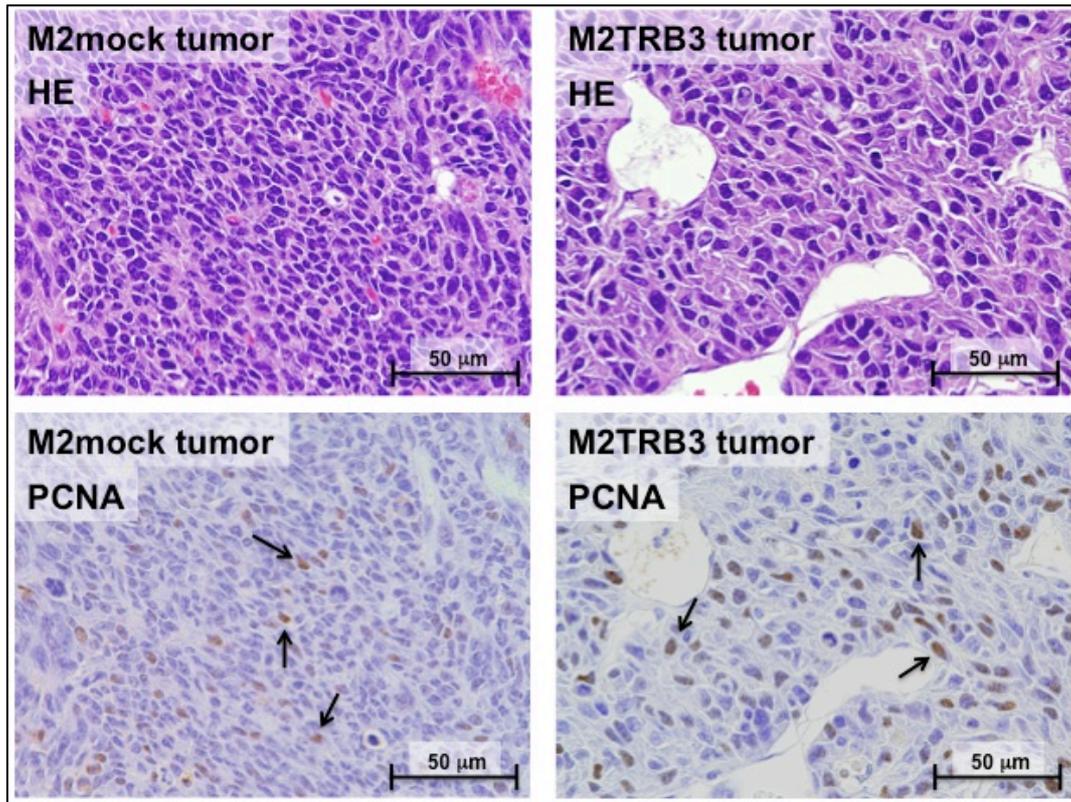


Fig. 6 Representative histological features of the M2mock (left rows) and M2TRB3 tumors (right rows). Upper panels were stained with hematoxylin and eosin (HE) and lower panels show immunohistochemical staining of proliferating cell nuclear antigen (PCNA). Approximately 20 and 35% of M2mock and M2TRB3 cells were PCNA-positive (arrows), respectively. Magnification was x400 in all four images.

3. M2TRB3 腫瘍の特徴と組織学的特徴及び PCNA labeling index

ヒト TRB3 の強発現により、上記のような細胞増殖促進効果が見られたため、TRB3 遺伝子が腫瘍組織の形態学的変化を誘導するかどうかを次に解析した。M2TRB3 及び M2mock 細胞の各固形腫瘍をマウス皮膚より切除し、10%ホルマリンにて固定し、組織学的検討のためヘマトキシリンとエオジンにて染色を行った。腫瘍組織を、光学顕微鏡にて解析した。マウス側腹部に形成された M2TRB3 及び M2mock 腫瘍の形態は、円形有茎状を示した。組織学的に、M2mock 腫瘍は密な組織像を示した (Fig.6 左上)。また、腫瘍の中心部に壊死部分が認められた。M2TRB3 腫瘍もまた密な組織像を示し、乳頭状増殖が部分的に示された (Fig.6 右上)。興味深いことに M2TRB3 腫瘍の核の平均直径 ($9.4 \pm 0.3 \mu\text{m}$) が、M2mock 腫瘍の核の平均直径 ($7.0 \pm 0.2 \mu\text{m}$) に比べて有意に大きかった

($P < 0.001$)。細胞増殖率は、増殖細胞で発現の高い PCNA (proliferating cell nuclear antigen) を免疫染色し、PCNA labeling index を測定することによって評価を行った(「第 6 章 実験材料と方法参照」)。M2TRB3 腫瘍の PCNA labeling index は、M2 及び M2mock 腫瘍の PCNA labeling index よりも高かったが、統計的な有意差は無かった (Fig.6 下、Fig.7)。

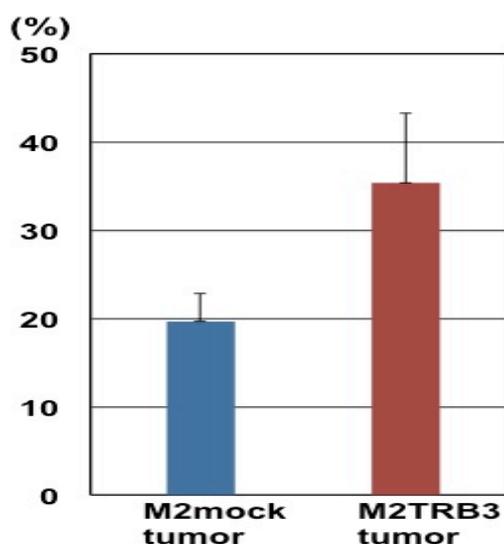


Fig. 7 PCNA labeling index in the M2, M2mock and M2TRB3 tumors. A marked difference was noted between M2mock and M2TRB3 tumors but this difference did not achieve statistical significance.

4. TRB3 はマウス乳がん細胞の倍数性分布に影響を与える

M2TRB3 腫瘍と M2mock 腫瘍の組織学的形態の違いが見られたため、M2mock 細胞及び M2TRB3 細胞の DNA 倍数性に対する TRB3 遺伝子の影響を検討した。G₀/G₁ 期に細胞を同調後、0h 及び 72h の時点でフローサイトメトリーを使用して実験を行った。Fig.8 に M2mock 細胞及び M2TRB3 細胞の解析より得られた代表的な DNA ヒストグラムを示した。また、Table I に DNA 倍数性の分布と分布率を示した。

まず、M2mock 細胞は、異数体核 (2N、4N 及び 8N) の細胞集団ピークを示したことから、様々な異数体核より成る染色体を内在する細胞集団であることが示された。M2mock 細胞の 2 倍体核の平均分布率は 12-16%であった。これと対照的に、M2TRB3 細胞では 2 倍体核が全く観察されなかった (Table I 及び Fig.8 右 (0h、72h))。また、M2mock 細胞と比較して、M2TRB3 細胞の 0h と 72h における 8 倍体核の割合はそれぞれ 19%、12%増加していた ($P < 0.05$)

(Table I)。同様に、M2TRB3 細胞の 4 倍体核の集団においても M2mock 細胞と比較して 4-19%増加した。これらの結果は、TRB3 がマウス乳がん細胞株の DNA 倍数性に影響を与えることを示唆している。

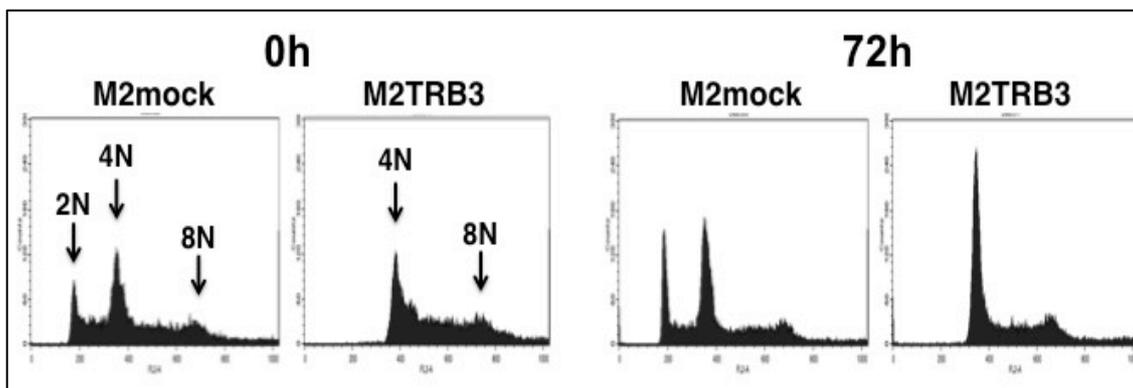


Fig. 8 Effects of the TRB3 gene on DNA ploidy. Representative results of the flow cytometric analysis. After synchronizing cells in the G₀/G₁ phase, ploidy status was determined by flow cytometric analysis at 0 (left two panels) and 72 h (right two panels) in the M2mock and M2TRB3 cell lines. Note three peaks (2N, diploid; 4N, tetraploid; 8N, octaploid) in different locations in the DNA histogram.

Cell line	Ploidy	Time (h) after starvation	
		0h	72h
M2mock	2N	12.1 ± 0.3	16.6 ± 0.1
M2TRB3	2N	0.0 ± 0.0**	0.0 ± 0.0***
M2mock	4N	37.0 ± 0.1	38.5 ± 0.2
M2TRB3	4N	41.6 ± 2.5	57.5 ± 0.5***
M2mock	8N	6.0 ± 0.1	3.5 ± 0.0
M2TRB3	8N	25.3 ± 1.8**	16.2 ± 0.3***

Table I Distribution and rate (%) of ploidy in the M2TRB3 and M2mock cell lines. Differences in the percentage of ploidy in M2TRB3 and M2mock cell lines. M2TRB3 vs. M2mock, **P<0.01 and ***P<0.001.

5. M2TRB3 細胞と M2mock 細胞における TRB3 及び細胞周期関連分子の発現状況について

TRB3 による増殖促進効果と M2TRB3 細胞での核の高倍数性を認めたため (Fig.8)、TRB3 は細胞周期関連分子の発現レベルに影響を及ぼしている可能性が考えられる。そこで、TRB3 のよる効果を調べるため、細胞周期関連分子であ

る Cyclin B1、Cyclin D1、Cdc2、Cdk2 及び Cdk4 についての各タンパクの発現を測定した。Fig.9 に示すように、M2TRB3 細胞ではヒト TRB3 の発現が見られたが、0h に比べ 72h ではその発現の上昇が見られた。また、内因性の TRB3 の発現は、M2mock 細胞、M2TRB3 細胞いずれでも観察でき、やはり、72h で強い発現が認められ、M2TRB3 細胞ではその傾向が強かった。

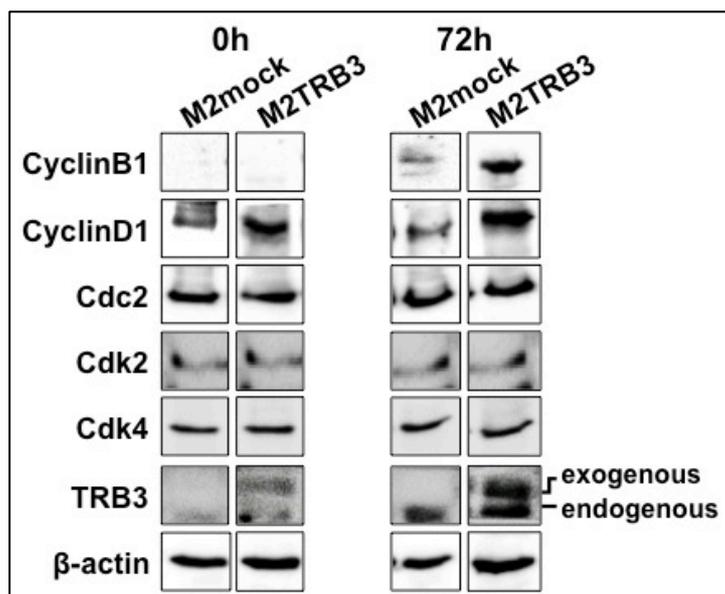


Fig. 9 Effects of the TRB3 gene on protein expression.

Protein expression status of cell cycle control molecules and TRB3 in M2mock and M2TRB3 cell lines. Cell lysates were extracted at the indicated times (h) of the cell culture and then examined by Western blot analysis for the indicated proteins, using the respective antibodies, as described in Materials and Methods. β -actin was used as an internal control. Exogenous human TRB3 and endogenous mouse TRB3 are describes as exogenous and endogenous, respectively.

72h の時点では同調が崩れているはずであるが、M2TRB3 細胞における Cyclin B1 及び Cyclin D1 の発現レベルは、M2mock 細胞の発現レベルに比べて増加していた (Fig.9)。一方、72h における Cdc2、Cdk2 及び Cdk4 の発現レベルは、M2TRB3 細胞と M2mock 細胞の間で違いは示されなかった。

2-3 考察

特定のヒト腫瘍組織は、TRB3 mRNA を高発現することが近年報告されている (Xu *et al.*, 2007)。また当研究室では、Cdks の活性化に不可欠な Cdc25A の安定性を TRB3 が制御していることを報告している (Sakai *et al.*, 2010)。しかしながら、TRB3 が細胞の機能や形態に与える影響、あるいは TRB3 の詳細な役割は未だ不明である。したがって、マウス乳がん細胞の細胞増殖及び形態学的変化に関する更なる科学的証左を得るために、TRB3 や細胞周期関連分子の発現レ

ベル、細胞核サイズ及び DNA 倍数性ステータスに注目して本研究を行った。M2TRB3 細胞は、コントロールである M2mock 細胞と比較して有意な細胞数の増加を示した。それぞれの doubling time を測定すると、M2TRB3 細胞株はおよそ 12h、M2mock 細胞株は 15h であった (Fig.5A)。マウスへの移植腫瘍においても TRB3 安定発現の同様の増加傾向が観察されており、この実験事実は TRB3 がマウス乳がん細胞の増殖に対し促進効果を持つことを示している。

細胞の体積が DNA 倍数性ととも増加することは多種多様な真核生物で観察されている (Jorgensen *et al.*, 2004)。DNA は、核サイズ、クロマチン含有量、及び特定の遺伝子の発現レベルを増加させることによって倍数性を増加させることができる (Jorgensen *et al.*, 2004)。今回の実験で M2TRB3 腫瘍の核の平均直径が、M2mock 腫瘍のものに比べ有意に大きいこと、また、M2mock 細胞の大部分の集団は 2 倍体もしくは 4 倍体核をもつものに対し、M2TRB3 細胞では 4 倍体もしくは 8 倍体核を持つ細胞が有意に増加をしていることを明らかにした (Fig. 8)。これらの知見は、直径が 6.0-7.5 μm の核は 2 倍体として、7.5-9.0 μm の核は 4 倍体として、そして 9.5-11.0 μm の核は 8 倍体として分類されるという Danielsen らの報告とも見事に一致している (Danielsen *et al.*, 1986)。これらの所見を合わせると、TRB3 は細胞増殖の過程で倍数体化促進の能力を有している可能性が高いと言える。

Cyclin は、細胞周期進行過程で特異的及び周期的な発現することによって、細胞周期をコントロールする重要な分子である。Cyclin D1 は Cdk 4 や Cdk 6 と複合体を形成し、RB をリン酸化し、有糸分裂を促進する転写制御因子 E2F との結合が解除され E2F が活性化し、その結果、G₁ 期から S 期への移行を調節している (Chellappan *et al.*, 1991、Hunter *et al.*, 1994、Johnson *et al.*, 1993、Weinberg *et al.*, 1995、Wilson *et al.*, 2001)。この Cyclin D1 の遺伝子増幅やタンパクの過剰発現は、様々なヒトがん細胞や動物モデルの腫瘍で起きていることが報告されている (Bartkova *et al.*, 1995、Staibano *et al.*, 2001)。一方、Cyclin B1 は、Cyclin D1 とは異なり Cdc 2 との複合体を形成することにより細胞周期の G₂/M 期の進行を担っている (Collecchi *et al.*, 2000)。今回、M2TRB3 細胞において、Cdc2、Cdk2 及び Cdk4 の発現レベルが変化せず、Cyclin B1 及び Cyclin D1 の発現レベルが亢進することを見出し (Fig.9)、M2TRB3 細胞は M2mock 細胞で見られた 2 倍体核が全く欠如していたことから、Cyclin B1 と Cyclin D1 の高発現が、TRB3 高発現細胞における染色体不安定性、さらには、高倍数体核の

生成を亢進しているとも考えられる。事実、Cyclin B1 や Cyclin D1 の過剰発現が 4 倍性もしくは異数性 (>2N) の亢進に関与するという結果は、ヒト乳がん細胞及びマウス骨髄細胞で既に報告されている (Collecchi *et al.*, 2000、Yin *et al.*, 2001)。Cyclin B1 の発現は主にタンパクレベルで行われており、APC/C^{Cdh1} (anaphase-promoting complex/cyclosome) というユビキチンリガーゼが活性化することにより、その標的の一つである Cyclin B1 がユビキチン化され分解される (Lukas *et al.*, 1999)。最近、当研究室において、この APC/C^{Cdh1} の活性が TRB3 によって抑制され、その結果、Cyclin B1 などの標的分子の発現が上昇することを明らかにしている (Ohoka *et al.*, 2010)。今回の研究においても、細胞や種は異なるが TRB3 の安定株である M2TRB3 細胞でも Cyclin B1 の発現が上昇しており、結果が一致している。このことは、様々なストレスで発現誘導される TRB3 が、多くの細胞に対しても普遍的な性質を示すかもしれない。この普遍的な性質の可能性、及び個体レベルでの TRB3 の役割を探る目的で TRB3 遺伝子導入動物モデルを使用した更なる検証を行った。次章ではその内容について述べる。

第 3 章 TRB3 遺伝子発現新規トランスジェニックマウスとその組織特異的表現型

3-1 序

前章における実験結果より、**TRB3** はマウス乳がん細胞の増殖を促進し、倍数性の変化を誘導することを明らかにした。この発見は **TRB3** が細胞の形態や機能に影響を及ぼすことを示している。そこで本研究では、ヒト **TRB3** 発現トランスジェニックマウスを作製し、**Cre** リコンビナーゼ発現組換えアデノウイルスを利用することにより、**TRB3** 遺伝子が特定の臓器に新規の形態学的変化を引き起こすか検討した。

3-2 実験結果

1. ヒト TRB3 導入遺伝子の時期特異的な発現は Cre リコンビナーゼによって制御される

本研究では、マウス個体にヒト **TRB3** タンパクを強発現させるために、**Cre / loxP** システムを用いて新規トランスジェニックマウスモデルを開発した。本動物モデルの使用は **TRB3** 遺伝子が特定の臓器において、腫瘍細胞に新規の形態学的変化を引き起こすかどうかを確かめる方法として有用であると考えられる。

本遺伝子発現システムは現在までの多くの研究によって開発され (*Anton et al., 1995*、*Kanegae et al., 1995*)、培養細胞や遺伝子改変動物において遺伝子発現のオン/オフを時期及び臓器特異的に切り換える手段として多用されている。また、本遺伝子発現システムは、胚形成時と成体時に異なる機能を発揮することが疑われるタンパク、及び遺伝子が胚に発現した場合に致死性であるタンパクが関係する発達過程の実験に使用することが可能である。すでに **TRB3** のトランスジェニックマウスの報告はあるが、本システムを利用した時期・臓器特異的発現トランスジェニックマウスものはほとんど見られない。また、今まで報告されているものはいずれもヒト **TRB3** 遺伝子がマウス胚にもたらす致死性は知られていないが、本トランスジェニックマウスの作製を始めた当初はそのような知見が無く、胎生致死を避けるためにも **Cre / loxP** システムを選択し利用した (Fig.10)。

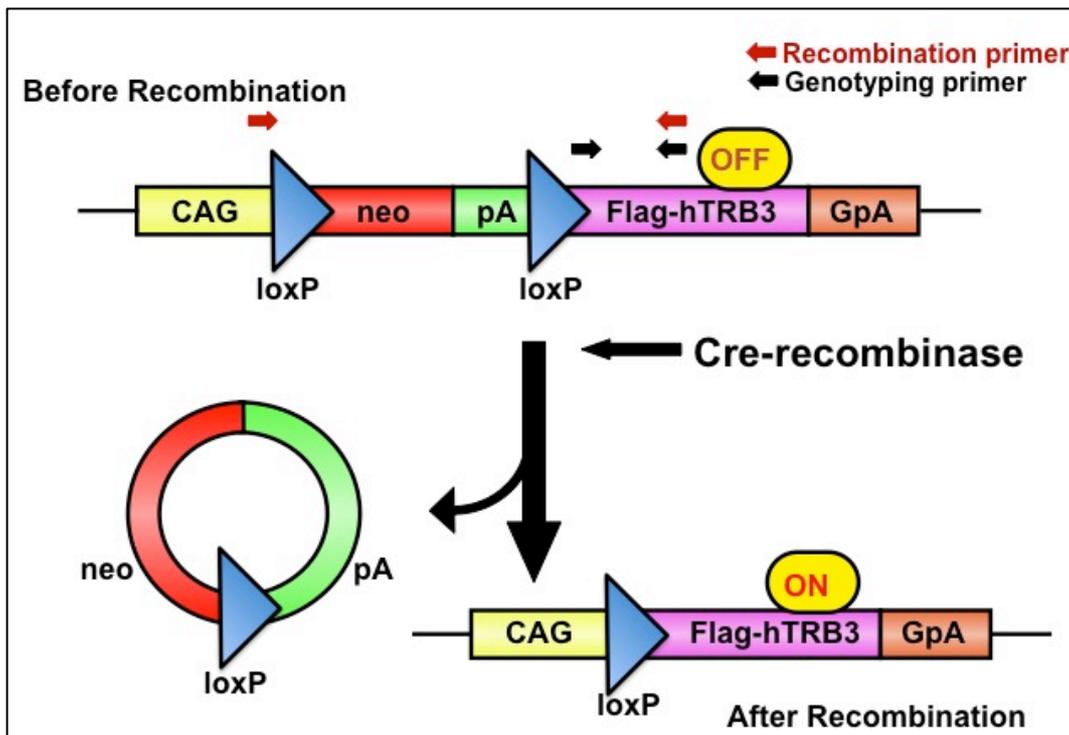


Fig. 10 Scheme of recombination of hTRB3 construct. The pCALNL-flag-hTRB3 construct is comprised of a hybrid CMV enhancer/chicken β -actin (CAG) promoter, a cassette for the neomycin resistance gene flanked by loxP sites, and a sequence containing a human TRB3 with a Flag-tag. Infection with the Cre expressing adenovirus results in recombination of hTRB3 construct, eventually generating a functional flag-hTRB3 gene expression unit. GpA, rabbit β -globin poly A site; pA, SV40 early poly A site.

ネガティブコントロール (lane 4) とポジティブコントロール (lane 5) は、それぞれ空ベクター (pCALNL5) とヒト TRB3 発現ベクター (pcDNA3.1-flag-hTRB3) を COS7 に導入したものである。Fig.11A において、lane 1 はヒト TRB3 導入遺伝子コンストラクト (pCALNL-flag-hTRB3) と Cre 発現ベクター (pxCAN-Cre) の両者を導入した COS7 細胞に由来するサンプルである。Lane 4 及び lane 5 のサンプルは、それぞれネガティブコントロールとポジティブコントロールとして使用した。COS7 細胞にヒト TRB3 導入遺伝子コンストラクトと Cre 発現ベクターの両者を導入したサンプル (lane 1) は、ポジティブコントロール (lane 5) においても見られるように、FLAG-hTRB3 の発現が見られた。これら結果から、ヒト TRB3 導入遺伝子の発現は Cre リコンビナーゼの存在によって制御され、Cre / loxP システムが正常に作働していることを示している。このヒト TRB3 導入遺伝子コンストラクトを下記におけるマイクロインジェクションに使用した。

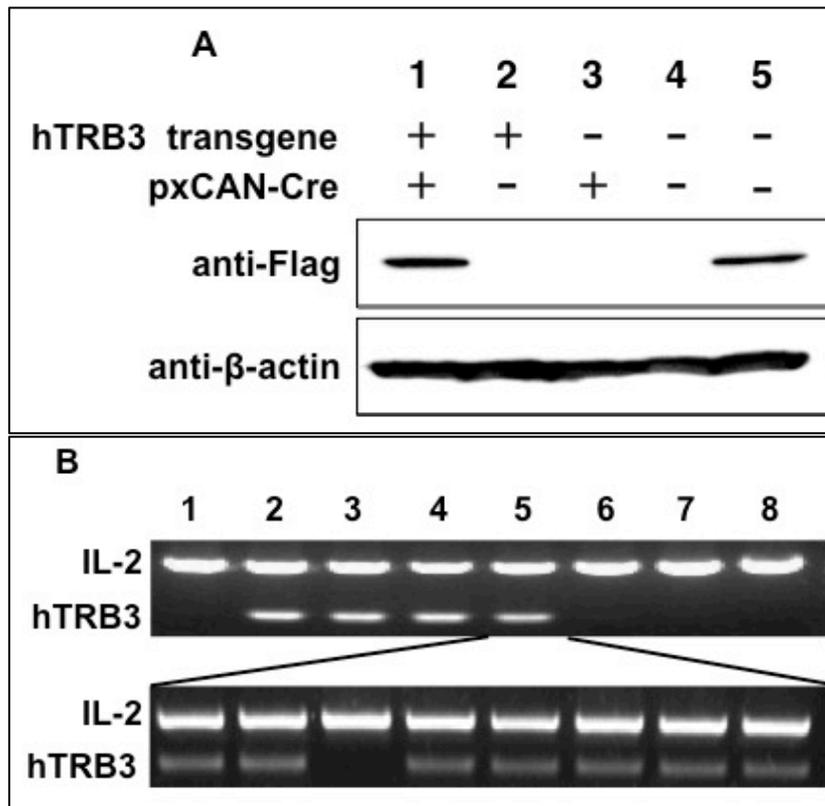


Fig. 11
Confirmation of hTRB3 protein expression and detection of hTRB3 DNA fragment.

(A) Conditional expression of hTRB3. Lysate sample in lane 1 was derived from COS7 cells that were transfected with both hTRB3 transgene construct (pCALNL-flag-hTRB3) and Cre expression vector (pxCAN-Cre). Lysate samples of lanes 2 and 3 consisted of COS7 cells transfected with hTRB3 construct and Cre expression vector, respectively. Lysate samples of lanes 4 and 5 were negative and positive controls, respectively. Negative and positive controls (lanes 4 and 5) consisted of COS7 cells transfected with empty vector (pCALNL5) and hTRB3 expression vector (pcDNA3.1-flag-hTRB3), respectively. The FLAG expression was present (lane 1) as seen in the positive control (lane 5). (B) Detection of hTRB3 DNA fragments by PCR assay. We used hTRB3 transgenic mice (hTRB3 mice) as described in the materials and methods section. Genomic DNA was extracted from mice tails and used for amplification of hTRB3 and IL-2 DNA fragments. (upper panel) hTRB3 DNA fragment was seen in 4 mice of 8 potential transgenic mice. The number indicates the individual mouse number. (under panel) hTRB3 DNA fragment was seen in 7 of 8 offspring generated by mating hTRB3 mice with wild mice.

5 were negative and positive controls, respectively. Negative and positive controls (lanes 4 and 5) consisted of COS7 cells transfected with empty vector (pCALNL5) and hTRB3 expression vector (pcDNA3.1-flag-hTRB3), respectively. The FLAG expression was present (lane 1) as seen in the positive control (lane 5). (B) Detection of hTRB3 DNA fragments by PCR assay. We used hTRB3 transgenic mice (hTRB3 mice) as described in the materials and methods section. Genomic DNA was extracted from mice tails and used for amplification of hTRB3 and IL-2 DNA fragments. (upper panel) hTRB3 DNA fragment was seen in 4 mice of 8 potential transgenic mice. The number indicates the individual mouse number. (under panel) hTRB3 DNA fragment was seen in 7 of 8 offspring generated by mating hTRB3 mice with wild mice.

2. ヒト TRB3 遺伝子発現トランスジェニックマウスの作製

Cre リコンビナーゼ発現アデノウイルスを感染させ、細胞内で Cre リコンビナーゼが発現すると、スタッファーDNA 領域である loxP-neo-poly A-loxP 部位が切除され、そして、ヒト TRB3 導入遺伝子の発現が始まる (Fig.10)。本研究では、ヒト TRB3 導入遺伝子コンストラクト (Fig.10) をマウス胚の前核に導入することによって、最終的に 4 匹のヒト TRB3 トランスジェニックマウスを獲得した (Fig.11B 上段)。Wagner らは、養母に移植した胚のうち生まれてくる仔の比率は約 23%であると報告している (Wagner *et al.*, 1981)。また、生まれ

てくる仔のうち導入遺伝子を発現する比率は 10-40%と報告されている (Hogan *et al.*, 1994)。本研究における Cre / loxP システムでは養母に移植した胚のうち導入遺伝子を発現する仔の数 (4 匹) の比率は $4 / 184 \times 100 = 2\%$ であった。これら 4 匹のヒト TRB3 トランスジェニックマウスを野生型マウスとそれぞれ交配させ、仔を産出させた。ヒト TRB3 遺伝子の伝搬確認は、産出された仔由来のゲノム DNA にて行い、確実にその仔がヒト TRB3 導入遺伝子を保有していることが確認できた (Fig.11 下段)。また、4 匹のうち 3 匹のトランスジェニックマウスにおいてヒト TRB3 遺伝子が次世代へ伝搬されることを確認した。

次に、Cre リコンビナーゼによる組換えが、ヒト TRB3 トランスジェニックマウスの胎児線維芽細胞 (MEF; mouse embrionic fibroblast) においても行われるか、確認するために、PCR 法によってヒト TRB3 導入遺伝子コンストラクト由来の DNA 断片の存在を調べた。ヒト TRB3 MEF 細胞と野生型 MEF 細胞はそれぞれヒト TRB3 トランスジェニックマウスと野生型マウスの 14 週齢の胎児より作製した。その後、これら細胞に「第 6 章 実験材料と方法」に記載してあるように Cre リコンビナーゼ発現アデノウイルスを感染させたところ、ヒト TRB3 MEF 細胞において組換えが起こっており、168-bp の DNA 断片が見られた (Fig.12A)。

一方、導入遺伝子の組換えが十分でない場合、つまり Cre 発現アデノウイルスの感染が少ない場合、ヒト TRB3 MEF 細胞ではより長い 1,374-bp の DNA 断片も見られた。また、ヒト TRB3 遺伝子の mRNA 及びタンパク発現状況についても RT-PCR 法、ウェスタンブロット法によって解析を行った。その結果、ヒト TRB3 導入遺伝子の mRNA 及びタンパクの発現は、Cre 発現アデノウイルスが感染したヒト TRB3 MEF 細胞においてのみ確認された (Fig.12B 左と C 左)。Cre 発現アデノウイルスを感染させても野生型 MEF 細胞においてはヒト TRB3 mRNA 及びタンパクの発現は全く見られなかった (Fig.12 B 右と C 右)。

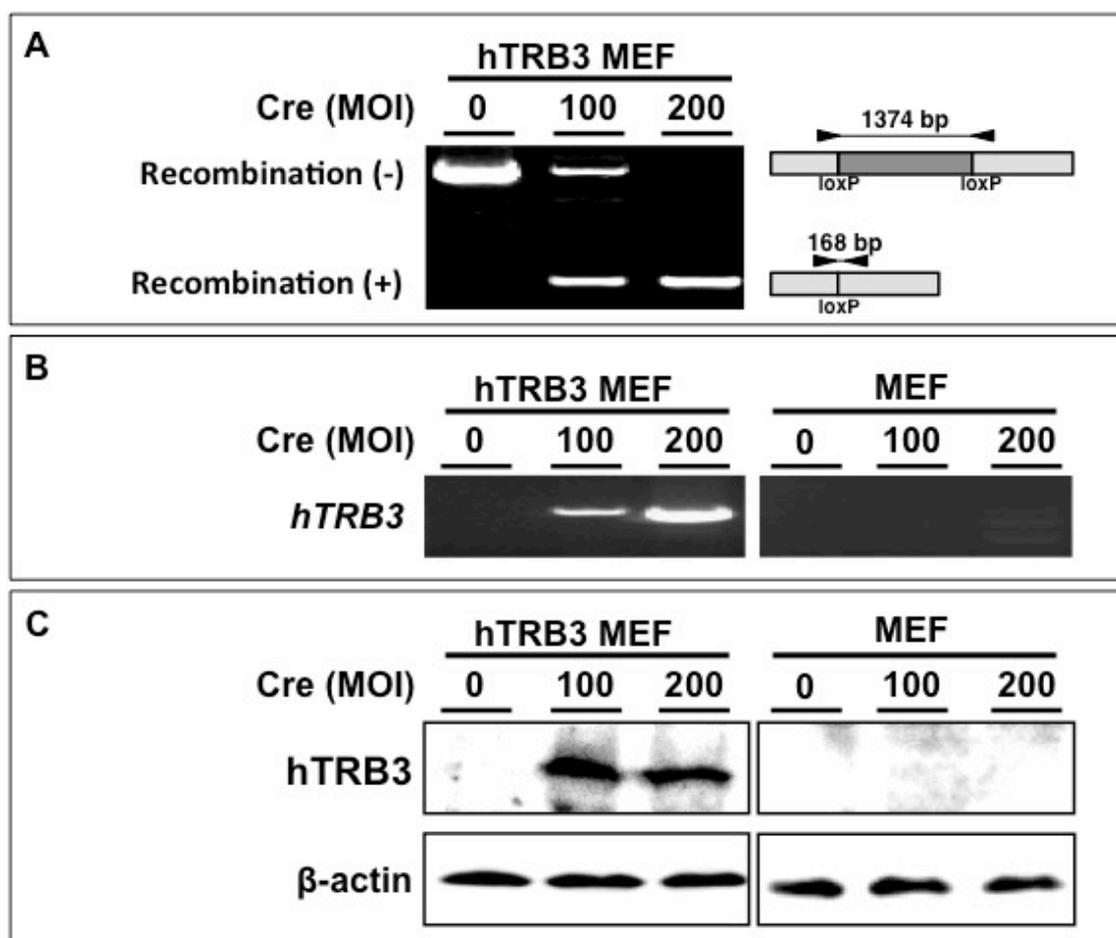


Fig. 12 Confirmation of recombination of hTRB3 construct and hTRB3 mRNA/protein expression in hTRB3 MEF cells. hTRB3 MEF and MEF cells were generated from hTRB3 and wild mice, respectively. These cells were treated with Cre expressing adenovirus (0, 100, 200 MOI). MOI indicates multiplicity of infection. (A) Confirmation of recombination of hTRB3 construct in hTRB3 MEF cells by PCR assay. A 168-bp DNA fragment derived from recombinant hTRB3 construct was seen in cells treated with Cre expressing adenovirus. hTRB3 DNA fragments were not PCR-amplified in MEF cells (data not shown). (B) Confirmation of hTRB3 mRNA expression in hTRB3 MEF/MEF cells by RT-PCR assay. Increasing mRNA expression was seen in hTRB3 MEF cells (left panel). No mRNA expression was seen in MEF cells (right panel). (C) Confirmation of hTRB3 protein expression by western blot assay. hTRB3 protein expression was observed in hTRB3 MEF cells but not in MEF cells. β -Actin was used as an internal control.

3. ヒト TRB3 遺伝子は肝細胞の核サイズに影響を与える

次にヒト TRB3 遺伝子が、個体レベルでも腫瘍形成につながる新規の形態学的変化を引き起こすかどうかを検討するために、ヒト TRB3 トランスジェニックマウスを用いて、様々な組織での免疫組織学的解析及び病理組織学的な検討のため、ヘマトキシリン/エオジン染色を行った。本研究では、アデノウイルスの

尾静脈投与による感染をさせたことから、感染されやすい肝臓、脾臓、腎臓を中心に解析した。飼育期間を通して、ヒト TRB3 トランスジェニックマウス、野生型マウスのどちらも形態や挙動に明白な違いは見られなかった。Fig.13 に示すように、Cre 発現アデノウイルスを感染させていないヒト TRB3 トランスジェニックマウスと野生型マウスでは、肝臓、脾臓及び腎臓の組織において明らかな病理組織学的違いは見られなかった。

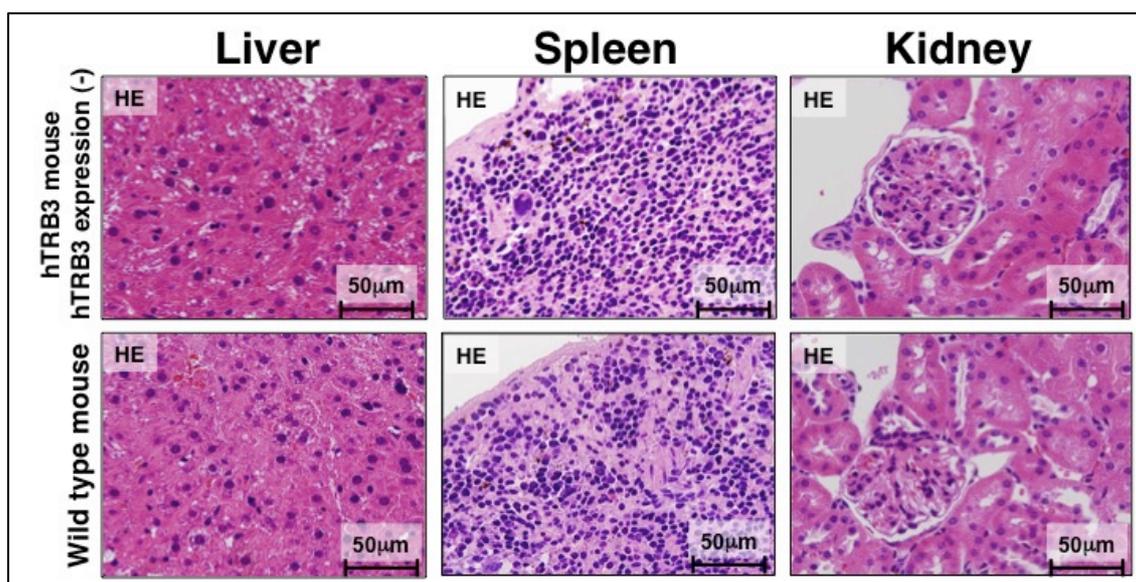


Fig. 13 Representative histological features of the liver, spleen, and kidney tissues of hTRB3 and wild mice without Cre treatment. Note that no apparent histological differences were observed between hTRB3 (upper panels) and wild (lower panels) mice, both of which were not introduced hTRB3 transgene. Magnification was x400 in all six images.

次に、Cre 発現アデノウイルスを感染させたところ、野生型マウスでは、全く FLAG 抗体で染まることはなかったが、ヒト TRB3 トランスジェニックマウスにおいては肝臓、脾臓、腎臓ともに FLAG 抗体陽性像が見られ、ヒト TRB3 タンパクの発現が確認された。これらの結果は、本トランスジェニックマウスの肝臓、脾臓及び腎臓で Cre / loxP 組換えシステムが機能していることを示している。肝臓では、80%の肝細胞は FLAG 染色性が極めて弱いのにに対し、約 20%の肝細胞は細胞質で FLAG 染色陽性を示した (Fig.15A、arrow)。FLAG タンパク陽性は肝組織の類洞にも見られた (Fig.15A、arrowhead)。脾臓組織では、約 10%のリンパ球が FLAG 陽性であった。腎臓では、尿細管と集合管の上皮細胞

の 20%が FLAG 陽性であった。同様に糸球体毛細管の内皮細胞も陽性に染まった。また、肝組織の血管周囲の炎症像も Cre 発現アデノウイルスを感染させたヒト TRB3 トランスジェニックマウスで見られた (Fig.15)。

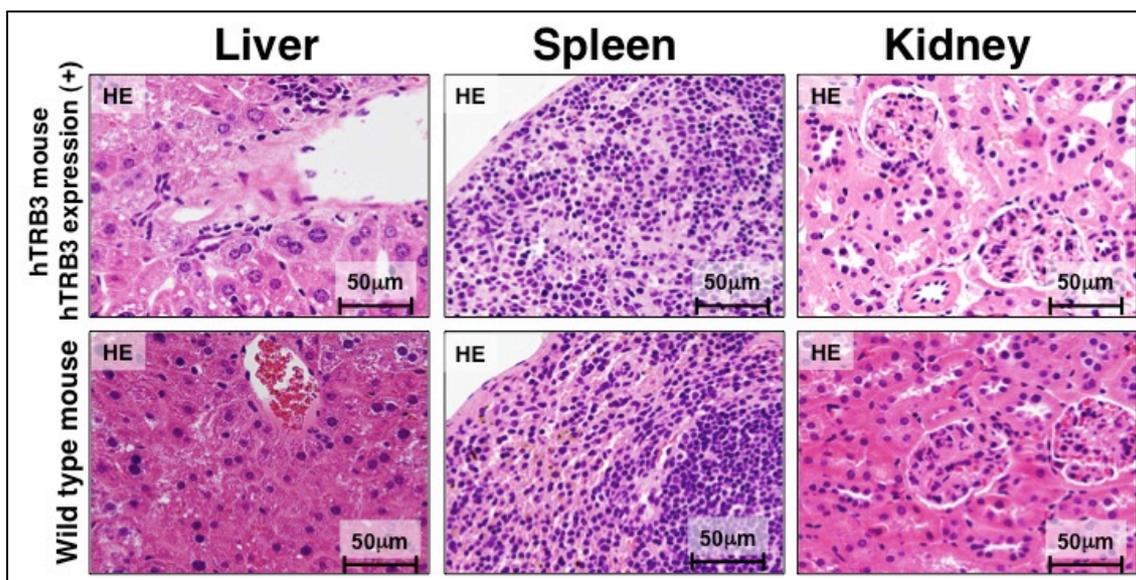


Fig. 14 Representative histological features of liver, spleen, and kidney tissues of hTRB3 and wild mice with Cre treatment. hTRB3 and wild mice were infected with Cre expressing adenovirus. (upper panels) HE staining of liver, spleen and kidney tissues derived from hTRB3 mouse. Note that nuclear size of hepatocyte increases compared to that of wild mouse. Slight perivascular inflammation is also seen in liver tissue. (under panels) HE staining of liver, spleen and kidney tissues derived from wild mouse. No apparent abnormality was seen. Magnification was x400 in all six images.

続いて、各臓器の組織像を観察してみると、ヒト TRB3 トランスジェニックマウスと野生型マウスの脾臓、腎臓の組織では、Cre 発現アデノウイルスを感染させても明らかな病理組織学的違いは見られなかった (Fig.14)。一方、Cre 発現アデノウイルスを感染させたヒト TRB3 トランスジェニックマウスの肝細胞においては、核の平均最大径が野生型マウスのものに有意に大きくなっていた (9.4 ± 0.19 versus $6.3 \pm 0.11 \mu\text{m}$, $p < 0.001$) (Fig.14)。このことは、ヒト TRB3 遺伝子は肝細胞の核肥大という形態学的変化を引き起こす可能性を示している。この核サイズの増大は、FLAG 陽性細胞だけでなく陰性細胞においても一部観察された (Fig.15)。

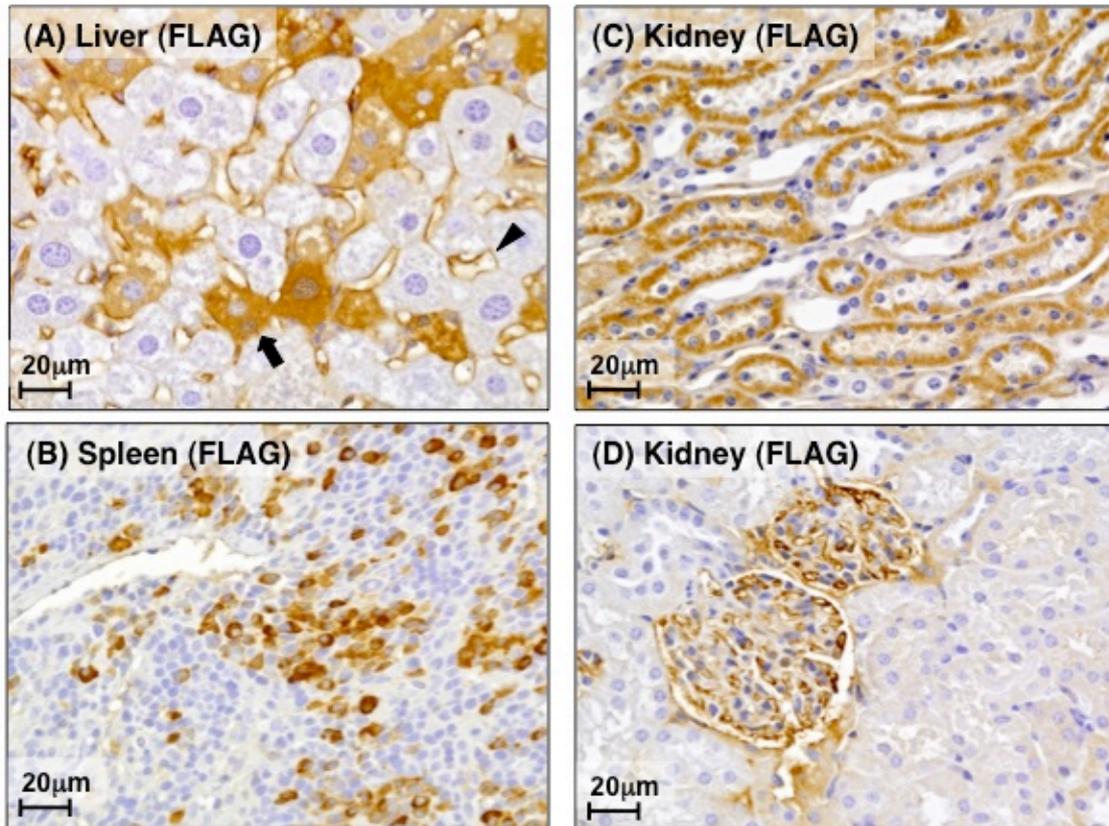


Fig. 15 Immunohistochemical analysis of liver, spleen and kidney tissues of hTRB3 mice with Cre treatment. hTRB3 mice were infected with Cre expressing adenovirus. (A) Immunohistochemical staining of liver tissue derived from hTRB3 mouse. Note that FLAG-mediated hTRB3 protein expression was seen in the cytoplasmic region of hepatocytes (arrow) and sinusoid of the liver tissue (arrowhead). FLAG-mediated hTRB3 protein expression was faintly or uncertainly stained in the remaining hepatocytes. (B) FLAG-mediated hTRB3 protein expression was seen in lymphocytes of spleen tissue. (C) In the kidney tissue of the hTRB3 mouse, hTRB3 was positively stained in epithelial cells of the tubules and collecting duct. (D) hTRB3 was also positively stained in endothelial cells of the capillary of glomeruli of the kidney. Magnification was x400 in all four images.

3-3 考察

ヒトの血清型 2 (Ad2) や 5 (Ad5) に由来する一般的に使用されるアデノウイルスは、45k-Da の coxsackie and adenovirus receptor (CAR) と相互作用することにより臓器の幅広い組織に感染する (Law *et al.*, 2005)。部位特異的に導入遺伝子を発現させるための課題は組織選択性である。マウスへ全身性に投与されたアデノウイルスは、まず肝細胞に感染し結果として肝毒性を惹起する

(Huard *et al.*, 1995、Law *et al.*, 2005、Wood *et al.*, 1999)。本研究では、アデノウイルスベクター (Ad5) を使用し、ヒト TRB3 導入遺伝子の FLAG 発現は肝臓、脾臓と腎臓の 3 つ臓器で見られ、発現量は肝臓が高かったが、ウイルス感染の組織選択性はそれほど高いとは言えない。

Cre 発現アデノウイルスを感染させたヒト TRB3 トランスジェニックマウスにおいて、FLAG 陽性の肝細胞の核径は、同様に処置を行った野生型マウスの核径に比べ有意に大きかった。正常細胞ががん化する過程でみられる大きな変化の一つとして核サイズの増大が知られている (Boon *et al.*, 1981、Boysen *et al.*, 1983)。さらに、核サイズは DNA 含有量とともに増加することも報告されている (Danielsen *et al.*, 1986)。前章で述べた研究結果及び本実験結果は、TRB3 は細胞の核サイズに影響を与えることを示唆している。また、形態学的変化と肝がん形成の関連性を示す報告もされており、肥大化した肝細胞は前がん病変であると捉えられている (Anthony *et al.*, 1973)。動物モデルでは発がん物質により肝細胞が核肥大を誘発することも報告されている (Clawson *et al.*, 1981、Enzmann *et al.*, 1995、Wiemann *et al.*, 1999)。特に、Clawson らは肝発がん物質による核肥大は、肝細胞が 2 倍体から 4 倍体へシフトしたと密接に関連しているとしている。

第4章 総括

本研究では、マウス乳がん細胞株を用いてこれまでに明らかにされていなかったがん細胞の増殖及び形態への TRB3 の影響について解析を行った。その結果、TRB3 ががん細胞の増殖を亢進し、移植腫瘍の体積を増大させることが明らかになった。さらに、TRB3 は腫瘍組織の細胞核を増大させ、その形態に影響を与えていることが示された。また、TRB3 はがん細胞の DNA 倍数性について高倍数化を引き起こし、染色体の安定性に影響を与えていることが示唆された。

Cre / loxp システムを用いたヒト TRB3 コンディショナルトランスジェニックマウスを作製したところ、その肝組織において細胞核が増大することが確認された。この結果は、マウス乳がん細胞を使った実験結果と矛盾しないものであった。このことから、TRB3 はがん細胞だけでなく肝組織においても細胞の形態に影響を与えることが判明した。

がん細胞の増殖と TRB3 発現の関連性については、ノックダウンによる影響が報告されている。例えば、大腸がん細胞株において siRNA によって TRB3 の発現をノックダウンさせると、その増殖が有意に抑制される (Miyoshi *et al.*, 2009)。肺がん細胞株においても同様にノックダウンによって増殖が抑制される (Zhou *et al.*, 2013)。本研究において、マウス乳がん細胞株にヒト TRB3 を発現させた安定発現株 M2TRB3 では細胞の増殖は逆に有意に促進され、tumor xenograft model の腫瘍体積の増大も確認された。これらのことから、TRB3 はがん細胞の増殖において非常に重要な役割を果たしていることが示唆される。

細胞の体積が DNA 倍数性ととも増加することはよく知られており、この相関は多様な真核生物で観察されている (Jorgensen *et al.*, 2004)。核の平均径は M2TRB3 腫瘍で $9.4 \pm 0.3 \mu\text{m}$ 、M2mock 腫瘍で $7.0 \pm 0.2 \mu\text{m}$ と有意な違いが見られた。さらにフローサイトメトリーの結果から、M2mock 細胞の大部分は 2 倍体もしくは 4 倍体核であったが、M2TRB3 細胞においては 4 倍体もしくは 8 倍体核を持っている細胞が有意に増加していた (Table I)。Danielsen らは核の大きさと倍数性の関連性を報告しており、2 倍体、4 倍体、8 倍体で核の直径が、それぞれ $6.0\text{-}7.5 \mu\text{m}$ 、 $7.5\text{-}9.0 \mu\text{m}$ 、 $9.5\text{-}11.0 \mu\text{m}$ としている (Danielsen *et al.*, 1986)。これらを総括的に考えると、TRB3 は細胞増殖の過程で高倍数体化の能力を有していることが示唆される。

本研究で使用したマウス乳がん細胞株 CI66M2 は、転移能を有する CI66 細胞

の亜種で、比較的悪性度が低く転移能が低いことが報告されている細胞である (Futakuchi *et al.*, 2009)。TRB3 の発現により、転移能及び浸潤能の獲得が見られるか、tumor xenograft model で観察したが、これらの能力の発現は見られなかった。しかし、大腸がん患者における臨床病理学的な解析では、がん組織で TRB3 が高発現している患者は、発現レベルが低かった患者に比べ、がん転移や浸潤が多く見られ、術後生存率も低いことが報告されている。そのため、患者の予後指標として TRB3 が有用であると提言されている (Miyoshi *et al.*, 2009)。したがって、がんの悪性度における TRB3 の影響について今後の解析が期待される。

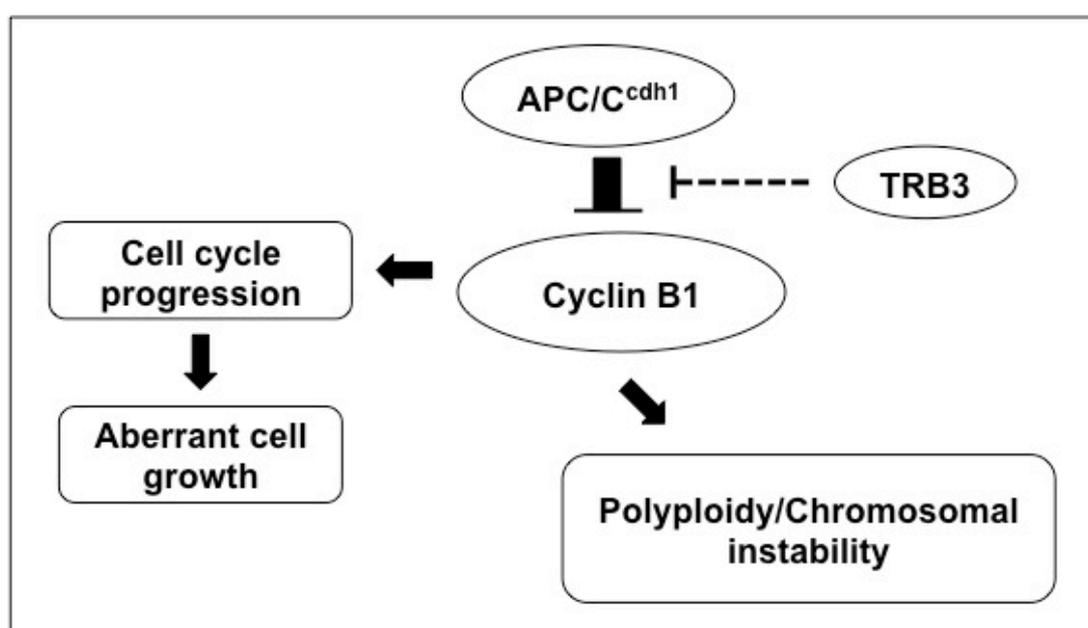


Fig. 16 Working hypothesis about the role of TRB3 in cell proliferation and chromosomal instability

TRB3 の細胞増殖及び DNA 倍数性、染色体不安定性に関連するメカニズムについては Fig. 16 のように考えている。M2TRB3 細胞では Cyclin B1 が TRB3 とともに高発現していた。Cyclin B1 は、Cdc 2 との複合体を形成することによって、G₂/M 期の進行にとって重要な役割を果たす。当研究室では、すでに Cyclin B1 の主要なユビキチンリガーゼである APC/C^{cdh1} (anaphase-promoting complex/cyclosome-cdh1) の活性を TRB3 が負に制御している可能性を報告している (Ohoka *et al.*, 2010)。また、TRB3 が過剰に発現させた HeLa 細胞は、細胞周期の中で M 期の短縮を引き起こすことも明らかにしている (未発表デー

タ)。つまり、TRB3 が APC/C^{cdh1} の活性を抑制することによって、Cyclin B1 のタンパク分解が抑制され安定化し、その発現量が増加することになり、細胞周期、特に M 期を促進し異常な細胞増殖につながる。また、機序はまだ不明であるが、TRB3 の過剰発現により発現増強した CyclinD1 は、既によく知られているように、Cdk 4 や Cdk 6 と複合体を形成し、RB タンパクをリン酸化することにより、細胞周期関連遺伝子の転写活性化を引き起こし、G₁ 期から S 期への移行を進行させる (Chellappan *et al.*, 1991、Hunter *et al.*, 1994、Weinberg *et al.*, 1995、Wilson *et al.*, 2001)。

さらに、Cyclin B 及び Cyclin D1 が過剰発現することによって、染色体が不安定化し、4 倍性、異数性 (>2N) が亢進するという結果や所見は既にマウス骨髄細胞株やヒト乳がん細胞株で報告されている (Collecchi *et al.*, 2000、Yin *et al.*, 2001)。今回示されたように、TRB3 の発現により、発現亢進した Cyclin B や Cyclin D1 が細胞の染色体の不安定化・高倍数化を引き起こし、2 倍体核の喪失と、核や細胞のサイズの増大を起こしている可能性が考えられる。

本研究では、Cre / loxP システムを用いてヒト TRB3 発現トランスジェニックマウスモデルを新たに開発した。本システムは、時期及び部位特異的にヒト TRB3 の発現を引き起こすことも可能であると同時に、胚形成時と成体時に異なる機能を発揮することが疑われるタンパク、遺伝子が胚に発現した場合に致死であるタンパクが関係する発生過程の実験に使用することが可能である。幸いにも、TRB3 の胚への致死的な効果は報告されていない。

マイクロインジェクション法により養母に移植した胚のうち生まれてくる仔マウスの比率は、約 23% であると報告されている (Wagner *et al.*, 1981)。また、生まれてくる仔マウスのうち導入遺伝子を発現する比率は 10-40% と報告されている (Hogan *et al.*, 1994)。これらの結果から仔マウスへの遺伝子導入効率は 2-9% と計算できる。本研究におけるマイクロインジェクション法では養母に移植した胚のうち導入遺伝子を発現する仔マウスの数の比率は $4 / 184 \times 100 = 2\%$ であり、上記報告と矛盾しない。

Cre 発現アデノウイルスを感染させたヒト TRB3 トランスジェニックマウスと野生型マウスを用いて、今回は、尾静脈からのアデノウイルス投与で感染されることが知られており、また、比較的観察が容易な肝臓、脾臓、腎臓、そして肺について、観察、および解析を行った。すると、脾臓、腎臓、ならびに肺 (data not shown) の組織では明らかな病理組織学的違いが見られなかった。しかしな

がら、肝組織においては、ヒト **TRB3** トランスジェニックマウスで核肥大という特徴的な組織学的変化が観察された。野生型マウスの肝組織の核の平均径が $6.4 \pm 0.1 \mu\text{m}$ であったのに対し、ヒト **TRB3** トランスジェニックマウスで肥大した核の平均径は $9.4 \pm 0.2 \mu\text{m}$ であり、前述のマウス乳がん細胞における結果に一致していた。この肝細胞の核肥大は、**thioacetamide** などの発がん物質の動物への投与で誘発されることも報告されている。さらに、**Clawson** らは肝発がん物質による核肥大が、肝細胞の 2 倍体から 4 倍体へのシフトに関係していることを報告している (**Clawson et al., 1981**)。

肝組織では **TRB3** の発現に加えて核肥大といった形態変化が観察されたのに対し、脾臓及び腎臓、肺 (**data not shown**) ではヒト **TRB3** は発現するが、形態変化は観察されず、形態の変化において組織特異性が観察された。**TRB3** は本来、他の **TRB** ファミリータンパク (**TRB1, TRB2**) に比べ、正常な組織及び細胞での発現は低く、小胞体ストレス飢餓ストレス、低酸素ストレスなどのストレス刺激により発現が誘導され、ストレス応答に関与していることが示されている (**Bowers et al., 2003, Ohoka et al., 2005**)。その中で、肝は他の組織に比べ、比較的 **TRB3** の発現量が高いことが報告されている (**Bowers et al., 2003**)。この詳細なメカニズムは明らかにされていないが、肝細胞が常に多くのタンパク質を生合成していることから恒常的に小胞体ストレスが起り、あるいは、糖や脂質、エネルギーなどの代謝の中心的役割を果たしている臓器であることから、産生される活性酸素などによる酸化ストレスなども恒常的に引き起こされるなどにより、発現が高くなっている可能性が考えられる。また、肝臓では **TRB3** を不安定化するしくみが抑制されているなどの可能性も考えられる。また、このように比較的 **TRB3** を高発現している肝細胞では、新たに外因性の **TRB3** の発現が加わることにより、**TRB3** の細胞増殖促進作用を発揮するに必要な量を獲得することになることも考えられる。

また、様々なストレスによって誘導される **CHOP** という転写因子は、ストレス誘導性の細胞死において重要な働きをしていることが明らかにされているが、**TRB3** はこの **CHOP** によって誘導されると同時に、**CHOP** の転写活性化能を強く抑制することを当研究室で明らかにしている。つまり、様々なストレスを受け、障害を受けて生じた異常細胞の細胞死を強発現している **TRB3** が抑制して、がん化を引きおこしている可能性も考えられる。

肝臓と比較して、脾臓及び腎臓、肺では形態の変化はほとんど見られず、組織

特異性が見られたのは、肝臓がアデノウイルスの尾静脈投与で感染効率の高いという特徴をもっているほかに、本来、内因性の **TRB3** の発現が肝臓では高いということも原因の一つと考えられる。さらに、マウス乳がん細胞株 **M2** 細胞において、ヒト **TRB3** の過剰発現により、内因性のマウス **TRB3** の発現が上昇している結果を得ており、**TRB3** 自身が、誘導、あるいは安定化などにより **TRB3** の発現を増加できることが、さらなる効果を引き起こしている可能性も考えられる。

本研究で行った尾静脈からのウイルス投与の場合、ウイルスが肝臓でトラップされやすく、肝臓以外の臓器で **TRB3** を高発現させることが難しいのかもしれない。脾臓、腎臓でもヒト **TRB3** の発現は観察されているが、肝臓に比べると発現は低く、腎臓や脾臓などで組織の変化が見られなかったのは、**TRB3** の発現量の問題である可能性も否定できない。脾臓や腎臓など、各臓器特異的に発現している **Cre** のトランスジェニックマウスと本ヒト **TRB3** トランスジェニックマウスを交配させ、各臓器での **TRB3** を高発現させる方法をとって、結論を出す必要がある。

肝臓組織を観察すると、必ずしもヒト **TRB3** が発現している肝細胞に核肥大が起こっているわけではなく、発現していない細胞でも核肥大がみられるものもある。これは免疫染色が不十分である可能性も否定はできないが、ヒト **TRB3** 発現細胞で起きた変化が、サイトカインなどの液性因子や細胞接触などを介して、隣接している細胞に伝達されて、組織変化が伝播している可能性も考えられる。

ヒトのがん組織やがん細胞株では **TRB3** の過剰発現が報告されている (**Bowers et al., 2003, Xu et al., 2007**)。原因は不明であるが、がん組織は、低酸素や低グルコースといった特有の微小環境にあり、このような状況下ではストレス応答が活性化し、がんの悪性化、薬剤耐性との関連も示唆されている。固形がんでは、増殖するためのエネルギーは主に血液から供給され、腫瘍が大きくなるには血管新生が必要である。しかし、急激に増殖するがん細胞では、血管新生が追いつかず、腫瘍内の血管から離れた所では十分に酸素や栄養が供給されない。このような場所の細胞は低酸素、低グルコース状態になっていると考えられており (**Tredan et al., 2007**)、酸素や栄養が不足しているにもかかわらず、がん細胞は増殖する。先述のように、低酸素や低グルコースによっても **TRB3** の発現誘導が生じることから、がん細胞の増殖亢進の原因として **TRB3** が関与してい

る可能性がある。

本研究では **TRB3** の新たな機能として、がん細胞の増殖促進と細胞核肥大という形態への影響が見出された。近年、発がんのメカニズムは多くの研究から少しずつ明らかにされてきているが、**TRB3** は新しいがん遺伝子の一つとして、注目に値する分子である可能性を秘めている。今後、化学発がんやウイルス発がんなどにおける **TRB3** の役割を解析して行くとともに、**TRB3** ががんや関節リウマチ、動脈硬化など、細胞の増殖亢進が関与するような疾患の治療標的分子となりうる可能性もあり、今後のさらなる研究に期待したい。

1. TRB3 は、マウス乳がん細胞の増殖を促進し、さらに移植腫瘍の体積を増大させる機能を持つ。
2. TRB3 は、核サイズの増大を誘導し、細胞の形態に影響を与える。
3. TRB3 は、細胞の高倍数化を誘導し染色体の安定性に影響する。
4. 作製したヒト TRB3 トランスジェニックマウスは、組織における TRB3 の影響を解析する手段として有用である。

細胞培養

293細胞（ヒト胎児腎細胞株）は、American Type Culture Collection (ATCC, Manassas, VA) より購入した。293細胞及びHepG2細胞（ヒト肝がん細胞株）は、Dulbecco's Modified Eagle's Medium (DMEM) (Wako Pure Chemical Industries, Ltd., Osaka, Japan) に10% fetal bovine serum (FBS) (Life Technologies, Inc., Rockville, MD) を加えて5% CO₂存在下37°Cで培養した。CI66M2 (M2) (マウス乳がん細胞株) は、Dr. Rakesh K. Singh (University of Nebraska Medical Center, Omaha, NE, USA) (Futakuchi *et al.*, 2009) より供与され、DMEM に5% FBS を加えて5% CO₂ 存在下37°Cで培養した。

発現プラスミド

Flag-TRB3 (Ohoka *et al.*, 2005) を制限酵素サイト *Bam*HI 及び *Xho*I を使用し、pcDNA3.1-Hygro ベクター (Life Technologies) に挿入し、pcDNA3.1-Hygro-Flag-hTRB3 を作製した。配列をDNAシーケンサーにて確認した。

TRB3 安定発現株 M2TRB3 の作製

M2細胞に Lipofectamine 2000 (Life Technologies, Inc.) を用いて pcDNA3.1-Hygro-Flag-hTRB3 (M2TRB3株) あるいは空ベクター (pcDNA3.1-Hygro) (M2mock株) をトランスフェクションした。ハイグロマイシン (Wako) を用いてトランスフェクション陽性株のセレクションを行い、M2TRB3株は限界希釈法によりクローニングした。TRB3の遺伝子発現およびタンパク発現をRT-PCR法及びウェスタンブロットにより確認した。

細胞増殖解析

M2TRB3及びM2mock細胞各 1.0×10^4 個を6 well plateの各wellに播種し、0.5% FBSを加えたDMEMで48時間培養した。48時間後10% FBSを加えたDMEMに培地を交換し、この時間を0時間とし細胞を0、24、48、72時間で回収した。回収した細胞は1 ml phosphate buffered saline (PBS) に懸濁し、血

球計算板 Burkert-Turk (Erma Inc., Tokyo, Japan) を用いて細胞数を計測した。計測した数値から細胞増殖曲線を作成した。解析は、三回以上行った。

Tumor xenograft study

4週齢、雄の BALB/cSlc-nu/nu マウスを Japan SLC, Inc. (Shizuoka Japan) より購入し使用した。M2TRB3 及び M2mock 細胞 1.0×10^6 個をマウス側腹部皮下に移植した。腫瘍サイズ (mm) 及び体重 (g) は週に2回測定した。腫瘍体積の計算式は $V \text{ (mm}^3\text{)} = \text{長さ} \times \text{幅} \times \text{厚さ} \times \pi/6$ で計算した。移植後35日ですべてのマウスを安楽死させ剖検した。剖検時に腫瘍サイズ、腫瘍重量、肝重量、及び体重を測定した。すべての動物実験は名古屋市立大学実験動物研究教育センターの指定規則に従って行われた。

免疫組織学的解析及び PCNA labeling index の測定

パラフィン切片 (3- μm) は、マウス側腹部皮下より切除した腫瘍、マウス肝、脾、腎より作製した。切片を 3% H_2O_2 で10分間処置し、内因性ペルオキシダーゼの除去を行った。切片を 0.1 M クエン酸バッファー (pH 6.0) で煮沸し、室温で 60分間抗 PCNA 抗体 (1:500希釈) (sc-56; Santa Cruz Biotechnology, Inc., Santa Cruz, CA) もしくは抗 FLAG 抗体 (Sigma, St. Louis, MO) で処理した。二次抗体で処理後、ABC kit (Vector Laboratories, Inc., Burlingame, CA) を使用して染色した。PCNA labeling index は、PCNA陽性核数/総細胞核数より計算した。各腫瘍について10視野、倍率 400倍にて 300個以上の細胞を計測した。M2TRB3 及び M2mock 腫瘍組織、マウス肝組織において、細胞の平均核径はOlympus DP70 system (Olympus Corp., Tokyo, Japan) を使用した画像解析によって測定した。各腫瘍及び各肝組織について4視野、倍率 400倍にて 100個以上の細胞を計測した。Cre発現アデノウイルスを感染させた野生型マウスは1匹、ヒト TRB3 トランスジェニックマウスは8匹使用した。未処置の野生型マウス及び未処置のヒト TRB3 トランスジェニックマウスは各1匹使用した。

Flow cytometric analysis

M2TRB3 及び M2mock 細胞各 7.5×10^4 個を 9-cm plates に播種し、0.5%FBS を加えた DMEM 培地で 48 時間培養することで細胞を G_0/G_1 期に同調させた。48時間後 10%FBS を加えた DMEM に培地を交換し、この時間

を0時間とし細胞を0、72時間で回収した。回収した細胞は 1 ml PBS で再懸濁し、5 ml の 70% エタノールを加え 4°C で 30分以上固定した。遠心後、上清を捨て、RNase (2 mg/ml) (Nacalai Tesque, Inc., Kyoto, Japan) を加えた PBSを400 µl及び400 µlのpropidium iodide (PI, 0.1 mg/ml) (Sigma) を添加、染色しサンプルとした。サンプルはPI添加後、暗所室温で30分以上染色し、60 µm メッシュにて濾過し解析に用いた。FACSCalibur (Becton Dickinson) を使用して測定後、CellQuest computer program (Becton Dickinson) を用いて解析を行った (Suzui *et al.*, 2005)。解析は三回以上行った。

RT-PCR and PCR assays

細胞から ISOGEN (Nippon Gene, Toyama, Japan) を用いて Total RNA を抽出した。抽出した RNA は 1 µg/µl に調製し使用した。RT reaction mixture (4 µg total RNA、1 µl 10 mM dNTP (Life Technologies)、1 µl Random primers (Life Technologies)、7 µl 蒸留水) を作製し、65°で 5 分間 熱変性させ、1 分間氷冷した。4 µl の 5 x RT buffer (Life Technologies)、1 µl 0.1 M dithiothreitol (DTT)、1 µl RNase out (Life Technologies) 及び 1 µl of Superscript III Reverse Transcriptase (Life Technologies) を加え、random primer のアニーリングを 50°C 60 分間、cDNA の伸長を 70°C 15 分間行い、cDNA の 1 µl を PCR に用いた。PCR に用いたプライマーの塩基配列は以下の通りである。

Cyclin B1-specific プライマーセット

CB1F : 5'-GGCTGACCCAAACCTCTGTA-3'

CB1R : 5'-TGCAATAAACATGGCCGTTA-3'

Cdc2-specific プライマーセット

Cdc2F : 5'-CTCGGCTCGTTACTCCACTC-3'

Cdc2R : 5'-TCCACTTGGGAAAGGTGTTC-3'

Cyclin D1-specific プライマーセット

CD1F : 5'-GCGTACCCTGACACCAATCT-3'

CD1R : 5'-CCACTTGAGCTTGTTACCA-3'

Cdk2-specific プライマーセット

Cdk2F : 5'-AAATTCATGGATGCCTCTGC-3'

Cdk2R : 5'-TTAGCATGGTGCTGGGTACA-3'

Cdk4-specific プライマーセット

Cdk4F : 5'-CCGGTTGAGACCATTAAGGA-3'

Cdk4R : 5'-CTGGTCGGCTTCAGAGTTTC-3'

p53-specific プライマーセット

p53F : 5'-TGGAAGACTCCAGTGGGAAC-3'

p53R : 5'-AGACTGGCCCTTCTTGGTCT-3'

p21-specific プライマーセット

p21F : 5'-ACGGTGGAACCTTTGACTTCG-3'

p21R : 5'-GCTCAGACACCAGAGTGCAA-3'

human TRB3-specific プライマーセット

hTRB3F : 5'-CAAGTCGCTCTGAAGGTTCC-3'

hTRB3R : 5'-CCATCCTACTCTGGCAAAGC-3'

mouse TRB3-specific プライマーセット

mTRB3F : 5'-GTATCTCTGGTCCCACGTAG-3'

mTRB3R : 5'-CCTTTTGGAAACGAGAGCAAG-3'

β -actin-specific プライマーセット

actinF : 5'-CCGTAAAGACCTCTATGCCAACA-3'

actinR : 5'-CGGACTCATCGTACTCCTGCTT-3'

Cre / loxP recombination プライマーセット

CAGpF : 5'-CGTGCTGGTTGTTGTGCTGTCT-3'

geno-hTRB3R : 5'-ATCCGTCGACCCTTGTCATC-3'

Interleukin-2 (IL-2) -specific プライマーセット

IL2F : 5'-CTAGGCCACAGAATTGAAAGATCT-3'

IL2R : 5'-GTAGGTGGAAATTCTAGCATCATCC-3'

ゲノム DNA はヒト TRB3 トランスジェニックマウス及び野生型マウス由来の MEF 細胞より抽出した。PCR サイクルはすべて熱変性を 0.5 分 94°C、primer アニーリングを 0.5 分 60°C、伸長反応を 1 分 72°C、26~30 サイクルで iCycler (Bio-Rad Laboratories, Inc., Hercules, CA) を用いて行った。PCR 後の DNA 断片は ethidium bromide で染色後、2%アガロースゲルで電気泳動し解析を行った。解析は三回以上行った。

ウェスタンブロット

細胞は radioimmunoprecipitation assay (RIPA) buffer (50 mM Tris-HCl, pH 8.0、150 mM NaCl、0.1% sodium dodecyl sulfate (SDS)、0.5% deoxycholate、1% Triton X-100) を用いて溶解させ、タンパクを抽出し 1 µg/µl に調製後サンプルとした。サンプルは SDS-polyacrylamide gel electrophoresis (PAGE) (12.5%) で電気泳動、polyvinylidene difluoride (PVDF) membrane (Immobilon P, Millipore Corp., Bedford, MA) に転写し、一次抗体及び horse radish peroxidase (HRP) でラベルされた二次抗体で処理した。用いた一次抗体は以下の通りである。

- anti-β-actin monoclonal antibody (AC-15) (Sigma, St. Louis, MO)
- anti-CyclinB1 monoclonal antibody (sc-245) (Santa Cruz Biotechnology Inc., Santa Cruz, CA)
- anti-Cdc2 monoclonal antibody (sc-54) (Santa Cruz Biotechnology Inc.)
- anti-Cdk2 polyclonal antibody (sc-163) (Santa Cruz Biotechnology Inc.)
- anti-Cdk4 polyclonal antibody (sc-260) (Santa Cruz Biotechnology Inc.)
- anti-p53 monoclonal antibody (sc-126) (Santa Cruz Biotechnology Inc.)
- anti-p21 monoclonal antibody (sc-817) (Santa Cruz Biotechnology Inc.)
- anti-TRB3 polyclonal antibody (sc-34211) (Santa Cruz Biotechnology Inc.)
- anti-CyclinD1 monoclonal antibody (556470) (Becton Dickinson, San Jose, CA)
- anti-Flag monoclonal antibody (018-22381) (Wako)
- anti-FLAG monoclonal antibody (M2, Sigma, St. Louis, MO)。

抗 hTRB3 ウサギ抗血清は我々が以前に作製したものを使用した (Ohoka *et al.*, 2005)。抗体処理後、immunoStar Zeta (Wako) を用いて可視化し、発光を Light-capture II (ATTO Corp., Tokyo, Japan) にて検出した。解析は三回以上行った。

ヒトTRB3 トランスジェニックマウスの作製

pCALNL5 ベクター (DNA Bank, RIKEN Bio Resource Center, Ibaraki, Japan) (Kanegae *et al.*, 1995、Tanaka *et al.*, 2010、Niwa *et al.*, 1991) の制限酵素サイト *KpnI* 及び *SwaI* に Flag-TRB3 (Ohoka *et al.*, 2005) を挿入し pCALNL-flag-hTRB3 を作製した。pCALNL-flag-hTRB3 は制限酵素サイト *SspI/HindIII* で切除した。コンストラクトの配列をDNAシーケンサーにて確認し

た。COS7 (アフリカミドリザル線維芽細胞株) は ATCC (Manassas, VA) より購入し、DMEM に 10%FBS を加えて 5% CO₂ 存在下 37°C で培養した。発現プラスミド pCALNL-flag-hTRB3及びpcDNA3.1-flag-hTRB3 (ポジティブコントロール)、pxCANC_{Cre} (DNA Bank, RIKEN Bio Resource Center)、空ベクターpCALNL5 (ネガティブコントロール) を COS7 細胞に FuGENE6 reagent (Roche Diagnostics Corp., Indianapolis, IN) を使用してトランスフェクションした。6-cm culture dish を使用して培養し、タンパク抽出後ウェスタンブロットに使用した。

hTRB3 (Flag) の発現状況を解析し、Cre / loxP システムが正常に機能していることを確認した。精製したヒト TRB3 導入遺伝子コンストラクト (Fig.9) を C57BL/6NcrSlc マウス (CLEA Japan, Tokyo, Japan) の受精卵前核にマイクロインジェクションした。総計184個の胚を偽妊娠 C57BL/6NcrSlc マウスに移植した。8匹のファウンダーマウスが得られ、PCR によって導入遺伝子の確認を行った。得られた4匹のトランスジェニックファウンダーマウスを野生型の C57BL/6NcrSlc マウスとそれぞれ交配させた。産出された3週齢の仔の尾よりゲノム DNA を抽出し、遺伝子型の確認に使用した。PCR には以下のプライマーを使用した。

geno-hTRB3F : 5'-TGTCTGGATCAAATCCGAAC-3'

geno-hTRB3R : 5'-ATCCGTCGACCCTTGTCATC-3'

本研究において、作製されたトランスジェニックマウスを NCrSlcBL6-TgN (hTRB3) マウス (hTRB3 マウス) と名付け使用した。マウスは 12h light/12h dark cycle の下、温度管理及び空調調節された部屋にて、プラスチックケージを使用して飼育された。

hTRB3 マウス胎児線維芽細胞株 (hTRB3 MEF) は hTRB3 マウスより、MEF は野生型マウスより作製した。雌マウスを交尾後、14日で安楽死させ、胎児を胎盤より切除した。頭部及び内臓を除去後、ピペッティングが可能な大きさまで胎児を細かく刻んだ。その後、1 ml の trypsin/EDTA (Life Technologies) を加え、37°Cで15分間 incubation した。続いて 10% FBS 添加 DMEM を加え、遠心分離後MEF細胞を含んだ上清を培養に使用した。MEF 細胞は10% FBS 添加 DMEM を使用して培養した。

hTRB3 マウスにおいて Cre / loxP システムが正常に機能していることを確認するために、hTRB3 MEF 及び MEF 細胞の hTRB3 mRNA 及びタンパク発

現状況を解析した。アデノウイルス Ad-CAG-Cre (Kanegae *et al.*, 1995, Tanaka *et al.*, 2010) は、10% FBS 添加 DMEM を使用して培養した293細胞に感染増幅後、Vivapure Adenopack (Vivascience, Hannover, Germany) を使用して精製した。ウイルス濃度は Rapid titer kit (Clontech, Mountain View, CA) を使用して測定し、 1.0×10^{10} pfu/mlに調製した。hTRB MEF 及び MEF 細胞を Cre リコンビナーゼ (Cre) 発現アデノウイルス (0, 100, 200 multiplicity of infection (MOI)) に2時間感染させた。感染後、48時間10% FBS 添加 DMEM を使用して培養し、ゲノムDNA、Total RNA 及びタンパクを抽出して PCR、RT-PCR、及びウェスタンブロットに使用した。

hTRB3 マウスにて Cre / loxP システムが正常に機能していることを確認した後、Cre 発現アデノウイルス (1×10^8 pfu/マウス) を4週齢のマウス尾静脈より投与した。投与後10日で全てのマウスを安楽死させ剖検した。肝、脾及び腎を肉眼的所見と病理組織学及び免疫組織学的解析のために丁寧に切除し処理した。すべての動物実験は名古屋市立大学実験動物研究教育センターの指定規則に従って行われた。

Statistical analysis

M2TRB3 及び M2mock 細胞の細胞数の比較、各細胞の平均核径の比較、ヒト TRB3 トランスジェニックマウス及び野生型マウスの肝細胞の平均核径の比較は Student's もしくは Welch's t-test を使用して解析し、P値 < 0.05 を有意であるとした。

謝辞

本研究の全般にわたり、始終御懇篤なる御指導ならびに御鞭撻を賜りました名古屋市立大学大学院薬学研究科・医薬品代謝解析学分野の林 秀敏 教授に深甚なる謝意を表します。

本論文の作成に際し、有益な御助言と御高閲を賜りました名古屋市立大学大学院薬学研究科の服部 光治 教授、平嶋 尚英 教授、長田 茂宏 准教授に深く感謝いたします。

本研究を遂行するにあたり、有益な御助言、御討論、御指導を頂きました名古屋市立大学大学院医学研究科・分子毒性学分野の酒々井 真澄 教授に深く感謝致します。

トランスジェニックマウスの作製にあたり、有益な御助言、御指導、御協力を賜りました名古屋市立大学津田特任研究室の津田 洋幸 教授、名古屋市立大学大学院医学研究科・病体モデル医学分野の三好 一郎 教授に深く感謝致します。

本研究を遂行するにあたり、多大な御協力を賜りました名古屋市立大学大学院薬学研究科・医薬品代謝解析学分野の井上 靖道 准教授、伊藤 友香 助教、名古屋市立大学大学院医学研究科・分子毒性学分野の二口 充 准教授、同分野の深町勝巳 講師、名古屋市立大学大学院医学研究科・実験動物研究教育センターの宮本 智美 衛生技師に深く感謝致します。

日々御協力を頂きました名古屋市立大学大学院薬学研究科・医薬品代謝解析学分野、名古屋市立大学大学院医学研究科・分子毒性学分野の皆様にご心より感謝致します。

- Anthony PP, Vogel CL, Barker LF: Liver cell dysplasia: a premalignant condition. *J Clin Pathol* **26**: 217-223, 1973.
- Anton M, Graham FL: Site-specific recombination mediated by an adenovirus vector expressing the Cre recombinase protein: a molecular switch for control of gene expression. *J Virol* **69**: 4600-4606, 1995.
- Bartkova J, Lukas J, Strauss M, Bartek J: Cyclin D1 oncoprotein aberrantly accumulates in malignancies of diverse histogenesis. *Oncogene* **10**: 775-778, 1995.
- Bezy O, Vernochet C, Gesta S, Farmer SR, Kahn CR: TRB3 blocks adipocyte differentiation through the inhibition of C/EBPbeta transcriptional activity. *Mol Cell Biol* **27**: 6818-6831, 2007.
- Boon ME, Kurver PJ, Baak JP, Thompson HT: The application of morphometry in gastric cytological diagnosis. *Virchows Arch A Pathol Anat Histol* **393**: 159-164, 1981.
- Bowers AJ, Scully S, Boylan JF: SKIP3, a novel *Drosophila* tribbles ortholog, is overexpressed in human tumors and is regulated by hypoxia. *Oncogene* **22**: 2823-2835, 2003.
- Boysen M, Reith A: Discrimination of various epithelia by simple morphometric evaluation of the basal cell layer. A light microscopic analysis of pseudostratified, metaplastic and dysplastic nasal epithelium in nickel workers. *Virchows Arch B Cell Pathol Incl Mol Pathol* **42**: 173-184, 1983.
- Chan MC, Nguyen PH, Davis BN, Ohoka N, Hayashi H, Du K, Lagna G, Hata A: A novel regulatory mechanism of the bone morphogenetic protein (BMP) signaling pathway involving the carboxyl-terminal tail domain of BMP type II receptor. *Mol Cell Biol* **27**: 5776-5789, 2007.
- Chellappan SP, Hiebert S, Mudryj M, Horowitz JM, Nevins JR: The E2F transcription factor is a cellular target for the RB protein. *Cell* **65**: 1053-1061, 1991.
- Clawson GA, Moody DE, James J, Smuckler EA: Nuclear envelope alterations accompanying thioacetamide-related enlargement of the nucleus. *Cancer Res* **41**: 519-526, 1981.

- Collecchi P, Santoni T, Gnesi E, Giuseppe Naccarato A, Passoni A, Rocchetta M, Danesi R, Bevilacqua G: Cyclins of phases G₁, S and G₂/M are overexpressed in aneuploid mammary carcinomas. *Cytometry* **42**: 254-260, 2000.
- Danielsen H, Lindmo T, Reith A: A method for determining ploidy distributions in liver tissue by stereological analysis of nuclear size calibrated by flow cytometric DNA analysis. *Cytometry* **7**: 475-480, 1986.
- Du K, Herzig S, Kulkarni R.N, Montminy M: TRB3: a tribbles homolog that inhibits Akt/PKB activation by insulin in liver. *Science* **300**: 1574-1577, 2003.
- Enzmann H, Kühlem C, Löser E, Bannasch P: Dose dependence of diethylnitrosamine-induced nuclear enlargement in embryonal turkey liver. *Carcinogenesis* **16**: 1351-1355, 1995.
- Futakuchi M, Nannuru KC, Varney ML, Sadanandam A, Nakao K, Asai K, Shirai T, Sato SY, Singh RK: Transforming growth factor-beta signaling at the tumor-bone interface promotes mammary tumor growth and osteoclast activation. *Cancer Sci* **100**: 71-81, 2009.
- GroBhans, J.,and Wieschaus, E. A Genetic Link between Morphogenesis and Cell Division during Formation of the Ventral Furrow in *Drosophila*. *Cell* **101**, 523-531, 2000.
- Grosshans J, Wieschaus E: A genetic link between morphogenesis and cell division during formation of the ventral furrow in *Drosophila*. *Cell* **101**: 523-531, 2000.
- Hogan B, Beddington R, Costantini F, Lacy E: Manipulating the mouse embryo: a laboratory manual. -- *2nd ed CSHL Press New York* pp 220, 1994.
- Huard J, Lochmüller H, Acsadi G, Jani A, Massie B, Karpati G: The route of administration is a major determinant of the transduction efficiency of rat tissues by adenoviral recombinants. *Gene Ther* **2**: 107-115, 1995.
- Hunter T, Pines J: Cyclins and cancer. II: Cyclin D and CDK inhibitors come of age. *Cell* **79**: 573-582, 1994.
- Jin G, Yamazaki Y, Takuwa M, Takahara T, Kaneko K, Kuwata T, Miyata S, Nakamura T: Trib1 and Evi1 cooperate with Hoxa and Meis1 in myeloid leukemogenesis. *Blood* **109**: 3998-4005, 2007.

- Johnson DG, Schwarz JK, Cress WD, Nevins JR: Expression of transcription factor E2F1 induces quiescent cells to enter S phase. *Nature* **365**: 349-352, 1993.
- Johnston LA. The trouble with tribbles. *Curr Biol.* 10: 502-504, 2000.
- Jorgensen P, Tyers M: How cells coordinate growth and division. *Curr Biol* **14**: 1014-1027, 2004.
- Kanegae Y, Lee G, Sato Y, *et al*: Efficient gene activation in mammalian cells by using recombinant adenovirus expressing site-specific Cre recombinase. *Nucleic Acids Res* **23**: 3816-3821, 1995.
- Kato S, Du K: TRB3 modulates C2C12 differentiation by interfering with Akt activation. *Biochem Biophys Res Commun* **353**: 933-938, 2007.
- Keeshan K, He Y, Wouters BJ, Shestova O, Xu L, Sai H, Rodriguez CG, Maillard I, Tobias JW, Valk P, Carroll M, Aster JC, Delwel R, Pear WS: Tribbles homolog 2 inactivates C/EBPalpha and causes acute myelogenous leukemia. *Cancer Cell* **10**: 401-411, 2006.
- Kiss-Toth E, Bagstaff SM, Sung HY, Jozsa V, Dempsey C, *et al*: Human tribbles, a protein family controlling mitogen-activated protein kinase cascades. *J Biol Chem* **279**: 42703-42708, 2004.
- Koo SH, Satoh H, Herzig S, Lee CH, Hedrick S, Kulkarni R, Evans RM, Olefsky J, Montminy M: PGC-1 promotes insulin resistance in liver through PPAR-alpha-dependent induction of TRB-3. *Nat Med* **10**: 530-534, 2004.
- Kudoh H, Ikeda H, Kakitani M, Ueda A, Hayasaka M, Tomizuka K, Hanaoka K: A new model mouse for Duchenne muscular dystrophy produced by 2.4 Mb deletion of dystrophin gene using Cre-loxP recombination system. *Biochem Biophys Res Commun* **328**: 507-516, 2005.
- Law LK, Davidson BL: What does it take to bind CAR? *Mol Ther* **12**: 599-609, 2005.
- Lukas C, Sørensen CS, Kramer E, Santoni-Rugiu E, Lindeneg C, Peters JM, Bartek J, Lukas J: Accumulation of cyclin B1 requires E2F and cyclin-A-dependent rearrangement of the anaphase-promoting complex. *Nature* **401**: 815-818, 1999.

- Mata J, Curado S, Ephrussi A, Rørth P: Tribbles coordinates mitosis and morphogenesis in *Drosophila* by regulating string/CDC25 proteolysis. *Cell* **101**: 511-522, 2000.
- Miyoshi N, Ishii H, Mimori K, Takatsuno Y, Kim H, Hirose H, Sekimoto M, Doki Y, Mori M: Abnormal expression of TRIB3 in colorectal cancer: a novel marker for prognosis. *Br J Cancer* **101**: 1664-1670, 2009.
- Niwa H, Yamamura K, Miyazaki J: Efficient selection for high-expression transfectants with a novel eukaryotic vector. *Gene* **108**: 193-199, 1991.
- Ohoka N, Yoshii S, Hattori T, Onozaki K, Hayashi H: TRB3, a novel ER stress-inducible gene, is induced via ATF4-CHOP pathway and is involved in cell death. *EMBO J* **24**: 1243-1255, 2005.
- Ohoka N, Sakai S, Onozaki K, Nakanishi M, Hayashi H: Anaphase-promoting complex/cyclosome-cdh1 mediates the ubiquitination and degradation of TRB3. *Biochem Biophys Res Commun* **392**: 289-294, 2010.
- Ord D, Ord T: Mouse NIPK interacts with ATF4 and affects its transcriptional activity. *Exp Cell Res* **286**: 308-320, 2003.
- Qi L, Heredia JE, Altarejos JY, Screaton R, Goebel N, *et al*: TRB3 links the E3 ubiquitin ligase COP1 to lipid metabolism. *Science* **312**: 1763-1766, 2006.
- Sakai S, Ohoka N, Onozaki K, Kitagawa M, Nakanishi M, Hayashi H: Dual mode of regulation of cell division cycle 25 A protein by TRB3. *Biol Pharm Bull* **33**: 1112-1116, 2010.
- Seher TC, Leptin M: Tribbles, a cell-cycle brake that coordinates proliferation and morphogenesis during *Drosophila* gastrulation. *Curr Biol* **10**: 623-629, 2000.
- Shcherbata, H.R., Althausen, C., Findley, S.D., and Hannele, R.B. The mitotic-to-endocycle switch in *Drosophila* follicle cells is executed by Notch-dependent regulation of G₁/S, G₂/M and M/G₁ cell-cycle transition. *Development* **131**: 3169-3181, 2004.
- Staibano S, Lo Muzio L, Pannone G, Mezza E, Argenziano G, Vetrani A, Lucariello A, Franco R, Errico ME, De Rosa G; DNA ploidy and cyclin D1 expression in basal cell carcinoma of the head and neck. *Am J Clin Pathol* **115**: 805-813, 2001.

- Suzui M, Inamine M, Kaneshiro T, Morioka T, Yoshimi N, Suzuki R, Kohno H, Tanaka T: Indole-3-carbinol inhibits the growth of human colon carcinoma cells but enhances the tumor multiplicity and volume of azoxymethane-induced rat colon carcinogenesis. *Int J Oncol* **27**: 1391-1399, 2005.
- Takahashi Y, Ohoka N, Hayashi H, Sato R: TRB3 suppresses adipocyte differentiation by negatively regulating PPARgamma transcriptional activity. *J Lipid Res* **49**: 880-892, 2008.
- Tanaka H, Fukamachi K, Futakuchi M, David B. Alexander, Long N, Tamamushi S, Minami K, Seino S, Ohara H, Joh T and Tsuda H: Mature acinar cells are refractory to carcinoma development by targeted activation of Ras oncogene in adult rats. *Cancer Sci* **101**: 341-346, 2010.
- Tang M, Zhong M, Shang Y, Lin H, Deng J, Jiang H, Lu H, Zhang Y, Zhang W: Differential regulation of collagen types I and III expression in cardiac fibroblasts by AGEs through TRB3/MAPK signaling pathway. *Cell Mol Life Sci* **65**: 2924-2932, 2008.
- Thomas, C.S., and Leptin, M. Tribbles, a cell-cycle brake that coordinates proliferation and morphogenesis during Drosophila gastrulation. *Curr Biol* **10**: 623-629, 2000.
- Tredan O, Galmarini CM, Patel K, Tannock IF. Drug resistance and the solid tumor microenvironment. *J Natl Cancer Inst* **99**: 1441-1454, 2007.
- Wagner TE, Hoppe PC, Jollick JD, Scholl DR, Hodinka RL, Gault JB: Microinjection of a rabbit beta-globin gene into zygotes and its subsequent expression in adult mice and their offspring. *Proc Natl Acad Sci U S A* **78**: 6376-6380, 1981.
- Weinberg RA: The retinoblastoma protein and cell cycle control. *Cell* **81**: 323-330, 1995.
- Wiemann C, Enzmann H, Löser E, Schlüter G. Nonlinearity of nuclear enlargement in hepatocytes induced by the carcinogen N¹-nitrosomorpholine in Ovo. *Cancer Detect Prev* **23**: 485-495, 1999.
- Wilkin F, Suarez-Huerta N, Robaye B, Peetermans J, Libert F, Dumont J.E, Maenhaut C: Characterization of a phosphoprotein whose mRNA is

- regulated by the mitogenic pathways in dog thyroid cells. *Eur J Biochem* **248**: 660-668, 1997.
- Wilson CS, Butch AW, Lai R, Medeiros LJ, Sawyer JR, Barlogie B, McCourty A, Kelly K, Brynes RK: Cyclin D1 and E2F-1 immunoreactivity in bone marrow biopsy specimens of multiple myeloma: relationship to proliferative activity, cytogenetic abnormalities and DNA ploidy. *Br J Haematol* **112**: 776-782, 2001.
 - Wood M, Perrotte P, Onishi E, Harper ME, Dinney C, Pagliaro L, Wilson DR: Biodistribution of an adenoviral vector carrying the luciferase reporter gene following intravesical or intravenous administration to a mouse. *Cancer Gene Ther* **6**: 367-372, 1999.
 - Xu J, Lv S, Qin Y, Shu F, Xu Y, Chen J, Xu BE, Sun X, Wu J: TRB3 interacts with CtIP and is overexpressed in certain cancers. *Biochim Biophys Acta* **1770**: 273-278, 2007.
 - Yin XY, Grove L, Datta NS, Katula K, Long MW, Prochownik EV: Inverse regulation of cyclin B1 by c-Myc and p53 and induction of tetraploidy by cyclin B1 overexpression. *Cancer Res* **61**: 6487-6493, 2001.
 - Zhou H, Luo Y, Chen JH, Hu J, Luo YZ, Wang W, Zeng Y, Xiao L: Knockdown of TRB3 induces apoptosis in human lung adenocarcinoma cells through regulation of Notch 1 expression. *Mol Med Rep* **8**: 47-52, 2013.