

新規の遺伝性腎癌ラット“Nihonラット”に関する病理学のおよび

遺伝子生物学的研究

-2005-

沖本 一夫

新規の遺伝性腎癌ラット“Nihonラット”に関する病理学的および 遺伝子生物学的研究

1 序言	1
2 材料と方法	2
2.1 動物	2
2.2 組織固定と切片	2
2.3 結果	3
2.4 小括	3
3 結果	3
3.1 腎臓	3
3.2 腎臓	3
3.3 腎臓	3
3.4 腎臓	3
3.5 腎臓	3
3.6 腎臓	3
3.7 腎臓	3
3.8 腎臓	3
3.9 腎臓	3
3.10 腎臓	3
3.11 腎臓	3
3.12 腎臓	3
3.13 腎臓	3
3.14 腎臓	3
3.15 腎臓	3
3.16 腎臓	3
3.17 腎臓	3
3.18 腎臓	3
3.19 腎臓	3
3.20 腎臓	3
3.21 腎臓	3
3.22 腎臓	3
3.23 腎臓	3
3.24 腎臓	3
3.25 腎臓	3
3.26 腎臓	3
3.27 腎臓	3
3.28 腎臓	3
3.29 腎臓	3
3.30 腎臓	3
3.31 腎臓	3
3.32 腎臓	3
3.33 腎臓	3
3.34 腎臓	3
3.35 腎臓	3
3.36 腎臓	3
3.37 腎臓	3
3.38 腎臓	3
3.39 腎臓	3
3.40 腎臓	3
3.41 腎臓	3
3.42 腎臓	3
3.43 腎臓	3
3.44 腎臓	3
3.45 腎臓	3
3.46 腎臓	3
3.47 腎臓	3
3.48 腎臓	3
3.49 腎臓	3
3.50 腎臓	3
3.51 腎臓	3
3.52 腎臓	3
3.53 腎臓	3
3.54 腎臓	3
3.55 腎臓	3
3.56 腎臓	3
3.57 腎臓	3
3.58 腎臓	3
3.59 腎臓	3
3.60 腎臓	3
3.61 腎臓	3
3.62 腎臓	3
3.63 腎臓	3
3.64 腎臓	3
3.65 腎臓	3
3.66 腎臓	3
3.67 腎臓	3
3.68 腎臓	3
3.69 腎臓	3
3.70 腎臓	3
3.71 腎臓	3
3.72 腎臓	3
3.73 腎臓	3
3.74 腎臓	3
3.75 腎臓	3
3.76 腎臓	3
3.77 腎臓	3
3.78 腎臓	3
3.79 腎臓	3
3.80 腎臓	3
3.81 腎臓	3
3.82 腎臓	3
3.83 腎臓	3
3.84 腎臓	3
3.85 腎臓	3
3.86 腎臓	3
3.87 腎臓	3
3.88 腎臓	3
3.89 腎臓	3
3.90 腎臓	3
3.91 腎臓	3
3.92 腎臓	3
3.93 腎臓	3
3.94 腎臓	3
3.95 腎臓	3
3.96 腎臓	3
3.97 腎臓	3
3.98 腎臓	3
3.99 腎臓	3
3.100 腎臓	3

—2005—

沖本 一夫

■目次■

緒言	1
第1章 “Nihonラット”における腎癌病変のメンデル遺伝	2
1-1 はじめに	2
1-2 発見の経緯	2
1-3 材料および方法	3
1-4 結果	4
1-5 小括	5
図表	7
第2章 “Nihonラット”の腎癌発症に関与する“Nihon遺伝子”探索 のための染色体地図の作成	10
2-1 はじめに	10
2-2 材料および方法	10
2-3 結果	11
2-4 小括	12
図表	13
第3章 “Nihonラット”の腎癌発症に関与する“Nihon遺伝子”の単離	19
3-1 はじめに	19
3-2 材料および方法	19
3-3 結果	22
3-4 小括	24
図表	26
第4章 “Nihonラット”の自然史	33
4-1 はじめに	33
4-2 材料および方法	33
4-3 結果	34
4-4 小括	36
図表	38
第5章 総括	50

謝辞	5 5
引用文献	5 6
和文要旨	6 0
英文要旨	6 4

緒言

自然発症モデルは、系統選抜を繰り返してその形質を固定したものの、系統維持の途中に突然変異個体として出現したものを系統として樹立したものである。その自然発症モデルは、多くの場合に表現型も安定し、「遺伝子に変化を伴わない実験発症モデル」のように、実験の都度の処理も不必要である。それと共に、その動物を用いたポジショナルクローニング (positional cloning)、位置的候補遺伝子探索法 (positional candidate approach) などの方法を用いて、突然変異を起こした遺伝子の同定が可能である。さらに、そのモデル動物を通じて解明されたそれらの突然変異の責任遺伝子を用いて、ヒト疾患への応用、疾患の原因究明、治療法、遺伝子診断等が可能になってきている¹⁾。

ヒト腎細胞癌 (Renal cell carcinoma) は米国において癌を原因とする死亡の6番目にあたり、成人における悪性腫瘍の3%を占める²⁾。2001年には約32,000人のアメリカ人が腎細胞癌で死亡し、そのうち、約40%が転移のために死亡している³⁾。また、本邦においても平成16年厚生労働省人口動態統計によれば、日本人の死因のうち癌が第1位の31.3%である。そのうち、腎細胞癌は腎に発生する原発性腫瘍の中ではもっとも多く、約90%を占めており、すべての癌の約2%を占めるといわれている。その癌化の原因はわかっていないが、喫煙が病因のひとつと考えられ、また、遺伝性要因も病因のひとつと考えられている⁴⁾。ヒトの腎細胞癌の発症と進展に関与する遺伝子群は、1990年ごろまではほとんど不明で、癌に関連して発現が亢進している遺伝子 (*TGF β* 等) が解明されているのみであった。その後、いくつかの癌遺伝子と癌抑制遺伝子群 (*VHL*(von hippel-lindau病)遺伝子、*c-Met*遺伝子、*FH*(Fumarate hydratase) 遺伝子、*Tsc1*(Tuberous sclerosis)遺伝子や*Tsc2*遺伝子) がヒト腎細胞癌の発生進展に関与することが明らかとなった⁵⁾。

著者らは毒性試験のために飼育していたSprague-Dawley (SD) 系ラットの中に腎癌を自然発症するものを偶然見出し、この癌が遺伝性であることを確認し、“Nihonラット”と命名し、さらに腎癌発症の病因について遺伝子生物学的研究を行った。

本論文では、まず“Nihonラット”の発見の経緯、繁殖・維持過程で得られた病理学的、遺伝学的知見を記述し、次に腎癌の病因候補遺伝子 (Nihon遺伝子) を探索するための染色体地図の作成とポジショナル・クローニング (位置的候補遺伝子探索) 法による染色体領域の特定、さらに特定した染色体領域における、腎癌の有力な病因性候補遺伝子の一つと考えられる*BHD*ホモログ遺伝子の単離と変異の解析について記述し、最後に本ラットの自然史について詳細な病理学的観察を行い、遺伝性腎癌モデル動物としての有用性を考察した。

第1章 “Nihonラット”における腎癌病変のメンデル遺伝

1-1 はじめに

1954年にノルウェーの Eker らによって発見されたラット群 (Eker ラット) における腎癌は、メンデルの法則に従った単一遺伝子の変異 (*Tsc2* 遺伝子変異) による常染色体優性遺伝形式をとる最初の遺伝性癌モデルであった⁶⁾。その後、Eker ラットの病因遺伝子は、ラット染色体 10 番にマップされ⁷⁾、樋野らと Yeung らのグループによってその遺伝子 (*Tsc2*) が単離・同定された⁸⁻¹⁰⁾。

著者らは Eker ラットとは明らかにその組織像が異なり (Eker ラットの組織像は細胞密度が高く、弱塩基性胞体をもつ腺管構造をつくる腺管型 (tubular type) と、やや細胞密度が低く、核の大小不同が目立ち、好酸性胞体をもつ特別な構造をつくらない compact type である¹¹⁾)、空胞状あるいは淡明な細胞質の淡明型 (clear type)、あるいは好酸性の細胞質の好酸性型 (acidophilic type) が充実性または管状に、さらに一部拡張した尿細管腔内に乳頭状に増殖する乳頭状型 (papillary type) よりなる遺伝性腎癌を SD (Sprague-Dawley) 系ラットから偶然発見し、その動物を繁殖・交配、100 例を超える交配成績の結果から、そのラットが新規の遺伝性腎癌モデルであることを見出し、“Nihon ラット”と命名した。本章ではそのモデルラットの発見の経緯から繁殖、腎腫瘍の病理学的特徴、さらに親動物を用いた遺伝的解析結果について報告する。

1-2 発見の経緯

著者らが発見した腎癌ラットは、同一の繁殖場から購入した 7~16 週齢の若齢 SD 系ラット群で、ほぼ同じ時期に実施した 5 つの毒性実験よりなる 343 例中 15 例に認められたのが最初である。その動物には多発性、両側性の腎細胞腺腫と過形成尿細管がみられた。肉眼的には両側性かつ多発性に腎臓表面に直径 1mm 前後の小型のシストあるいは黄白色結節が認められ、組織学的には空胞状あるいは淡明な細胞質を有する淡明型 (clear type)、あるいは好酸性の細胞質を有する好酸性型 (acidophilic type) の尿細管上皮細胞由来の腫瘍細胞が充実性または管状に増殖している像が観察された。また、一部拡張した尿細管腔内に乳頭状に増殖する像も散見された。細胞型の中では特に淡明型の腫瘍が主体を占め、過形成腺管から腺腫、腺癌に至るまでの多段階的な組織像を示していた。通常自然発生性腫瘍は、散発性、単発性、および片側性で老齢に認められることから、上記の発生状況と病理所見から、ラット群にみられた腎腫瘍は遺伝性の腎細胞腫瘍であると推察された。その後、同一の繁殖場から開腹手術によって腎表面に多発性シストが確認された雌 2 例の元親 (Parent) (以下 P と示す。) を得ることができ、大日本製薬 安全性研究所の施設内で繁殖・維持を開始した。そのシストのみられた雌 1 例と正常の SD 系

雄ラットとを交配して、雄 8（うち 1 匹死産）、雌 9（うち 1 匹死産）例の F0 仔が得られた。この F0 動物を 10 週齢の時点で開腹手術したところ、腎表面に多発性シストが雄 2、雌 8 例で観察された。このシストを有する雄 2 例を用いて、F0 雌との兄妹交配を行い、F1 動物 23 例（雄 11、雌 12 例）が得られた。この F1 について 8 週齢の時点で開腹手術を行い、雄 11 例中 7 例、雌 12 例中 6 例に腎表面に多発性シストをもつ動物が確認された（Fig. 1）。同様な方法での兄妹交配を続けることにより、現時点で F16 代まで進んでいる。

“Nihon ラット”は上記のことから遺伝性に腎腫瘍を発生するラットであり、常染色体優性の遺伝形式をとることが明らかとなった。

1-3 材料および方法

1) 動物

搬入した元親[P雌1例; 33週齢の時点でシストを確認し、キャリアーとして搬入(64週齢)], ならびにF0の雌8例[10週齢でシストを確認(29~34週齢)], F1の雄3例[10週齢でシストが確認できなかった(26および30週齢)], およびF1雌雄各1例[8週齢でシストを確認(8週齢)], 合計14例を剖検し、腎臓の病理組織学的検査を実施した。さらに、F0雄(10週齢でシストを確認)と正常の雌ラット[♂(RC/+) × ♀(+/+)]との交配で得られた4週齢の17例(N1)についても同様に剖検し、腎臓の病理組織学的検査を実施した。

2) 飼育環境

動物は温度21~25℃、湿度45~65%、換気回数20回/時間、照明時間6~18時間の環境下で飼育した。動物は金属製ケージに1匹ずつ収容し、餌はγ線照射滅菌した固型飼料(CR-LPF、オリエンタル酵母工業株)を自由に摂取させ、水は吹田市水道水を給水ビンに充填し、自由に摂取させた。

3) 病理組織学的検査

病理組織学的検査に供した動物は、ペントバルビタールナトリウム麻酔下で、放血によって安楽死させた後に剖検し、全身の器官・組織を10%中性緩衝ホルマリン液に固定した。各組織は常法に従いパラフィンに包埋後薄切し、HE染色標本を施して病理組織学的に検査した。一部の例についてはPAS、アルシアンブルーの特殊染色も実施した。

4) 遺伝的解析

元親である雌(P)について、腎臓および尾を採取して癌研・実験病理部においてそれぞれ以下の方法を用いて遺伝子解析を試みた。ヒトの腎癌を合併する結節性硬化症の病因遺伝子であり、Ekerラットの病因遺伝子である*Tsc2*遺伝子および結節性硬化症のもう1つの病因遺伝子である*Tsc1*遺伝子については、サザンブロット法とノーザンブロット法ならびにPCR-SSCP法^{9, 12-15)}で、von Hippel-lindau病の病因遺

伝子である*VHL*遺伝子はPCR-SSCP法¹⁶⁾で、*c-Met*遺伝子については菊池博士より譲渡されたプライマー[Accession No. AB012279 (エクソン17のプライマー)、AB012280 (エクソン18のプライマー) およびAB012281 (エクソン19のプライマー)]を用いて、PCR-SSCP法でいずれもgermline mutationの有無について解析した。

3) 遺伝子解析

1-4 結果

1) 剖検所見

N1 (4週齢) : シストはみられなかった。

F1 (8週齢) : 腎臓の皮質表面に直径1mm前後のシストが両側性および多発性に見られた (**Fig. 2A**) 。

PおよびF0雌 (64週齢および29~34週齢) : 腎臓の皮質表面のシストがそれぞれ33および10週齢の開腹手術時に比べてさらに大きく、数も増加して見られた。また、1~3 mmの黄白色結節あるいは黄白色巣が多発して見られた (**Fig. 2B**) 。

F1雄 (26および30週齢) : 10週齢でシストがみられなかったが、この週齢においても肉眼的な異常はみられなかった。

2) 病理組織学的所見

N1 (4週齢) : 17例中8例 (47%) に単発あるいは多発性の淡明細胞 (clear cell) あるいは好酸性細胞 (acidophilic cell) の過形成腺管がみられた。

F1 (8週齢) : 尿細管上皮の腫瘍性病変が両側性および多発性に見られた。淡明細胞 (clear cell) および好酸性細胞 (acidophilic cell) の異型尿細管上皮および過形成 (**Fig. 2C, 2D**)、ならびに小型の腺腫が腎皮質表層に認められた。過形成の多くはclear typeで、核は小型でクロマチンに富み、細胞質は空胞状を呈した。これら空胞状の細胞質はPAS染色で一部陽性を示した。淡明細胞 (clear cell) と好酸性細胞 (acidophilic cell) を混じた過形成尿細管もまれに認められた。腺腫は主に好塩基性細胞 (basophilic cell) により構成され、核は比較的大型で、拡張した尿細管腔内に乳頭状に増殖した像を呈した。

PおよびF0雌 (64週齢および29~34週齢) : 腫瘍病巣は好酸性 (acidophilic)、空胞状および淡明な (clear) 細胞質を有する尿細管上皮細胞の充実性、管状 (**Fig. 2E**) あるいは好塩基性 (basophilic) の細胞質をもつ腫瘍細胞が拡張した尿細管腔内における乳頭状の増殖 (**Fig. 2F**) として認められた。これらの組織像の特徴として、淡明なclear type (**Fig. 2H**) の腫瘍細胞が多く、また、淡明細胞 (clear cell) と好酸性細胞 (acidophilic cell) との混合型 (**Fig. 2G**) もしばしば認められた。好塩基性腺腫には、刷子縁様の構造を有する腫瘍細胞も時折みられた。これらの腫瘍は過形成腺管から腺腫およ

び腺癌に至るまでの多段階的な発癌過程として認められた。

F1雄（26および30週齢）：腎臓に異常はみられなかった。この雄3例は正常ホモ接合体であると考えられた。

3) 遺伝子解析

Pの雌を用いたサザンブロット法、ノーザンブロット法およびPCR-SSCP法での*Tsc1*、*Tsc2*、*VHL* 遺伝子および*c-Met* 遺伝子はいずれも変異はみられなかった。

1-5 小括

世界で唯一の腎癌モデルラットであるEkerラットは、1954年ノルウェーのEkerによって見出され、癌研の樋野らによって病因遺伝子が単離・同定された（1995年）。著者らはSD（Sprague-Dawley）系ラットから新たな遺伝性腎癌ラットを発見し、“Nihonラット”と命名した。その“Nihonラット”の発見は、同一の繁殖場から購入した7～16週齢の若齢SD系ラット群の343例中15例に認められたのが最初であるが、その後、同一の繁殖場から雌2例の元親を得て大日本製薬 安全性研究所の施設内で繁殖・交配を開始した。繁殖・交配の成績から本“Nihonラット”は、Ekerラットと同様にメンデルの法則に従った単一遺伝子の変異による常染色体優性遺伝形式をとる遺伝性腎癌モデルであると考えられた。

“Nihonラット”およびEkerラットの腎癌の組織表現型を比較した場合、Ekerラットでは肉眼的に明瞭な結節は8ヶ月齢になるまで認められない¹¹⁾。組織学的には生後約2ヶ月から変異尿細管（phenotypically altered renal tubules）が出現し始め、この病巣は腺管構造を示すtubular typeと、特別な構造をつくらないcompact typeに分けられ、この2つのタイプの変異尿細管が過形成腺腫を経て癌腫になる。その細胞起源は、多くは刷子縁（brush border）をもつ正常尿細管との移行像がみられることから、腫瘍の大部分が近位尿細管由来と考えられている^{17, 18)}。

一方、著者らの発見した“Nihonラット”は、1) 肉眼的に8週齢あるいはそれ以前に腎表面に多発性シストを認めること。2) 組織学的に過形成腺管は4週齢あるいはそれ以前から認められ、腺腫および腺癌へと進行していくと考えられること。3) さらに、“Nihonラット”にはEkerラットにはみられない淡明細胞型（clear cell type）の変異尿細管が多く、高週齢の動物では淡明細胞型の腺腫および癌までの多段階像が観察されるという点でEkerラットとは異なる特徴を有していた。“Nihonラット”における腫瘍細胞の発生起源としては現段階では、好塩基性（basophilic）の腫瘍細胞は近位尿細管と考えられ、淡明細胞型の腫瘍細胞は近位尿細管以外に集合管由来の可能性が考えられた¹⁹⁾。また、ヒト腎癌の病因遺伝子として同定されている*Tsc1*、*Tsc2*、*VHL* 遺伝子および*c-Met* 遺伝子について遺伝的解析においても変異は見出せなかった。

以上のように“Nihonラット”はEkerラットとは異なる表現型（発生時期および組織像の相違）を示し、Ekerラットの病因遺伝子である*Tsc2*遺伝子変異が見出せないことから、新規の腎癌モデルラットであることが強く示唆された。



图表

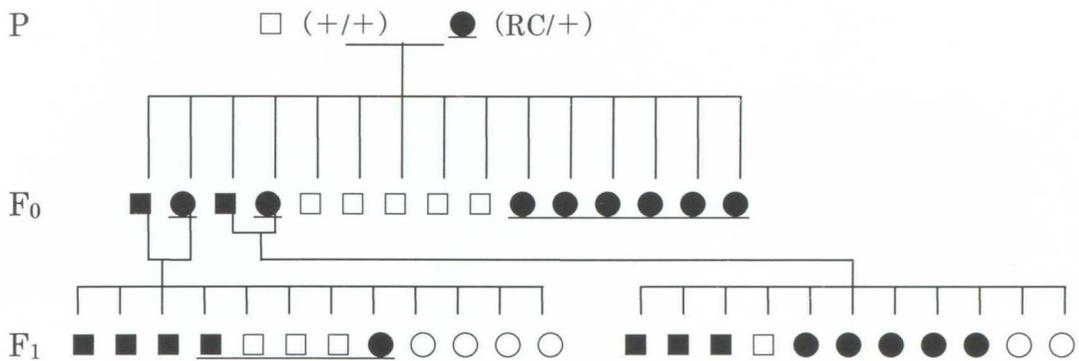


Fig.1 Pedigree chart of Nihon rats.

P;generation derived from Jcl:SD strain. □:Male,○:Female,

■ :Male with multiple cysts, ●:Female with multiple cysts.

_:Underlines represent animals examined histopathologically.

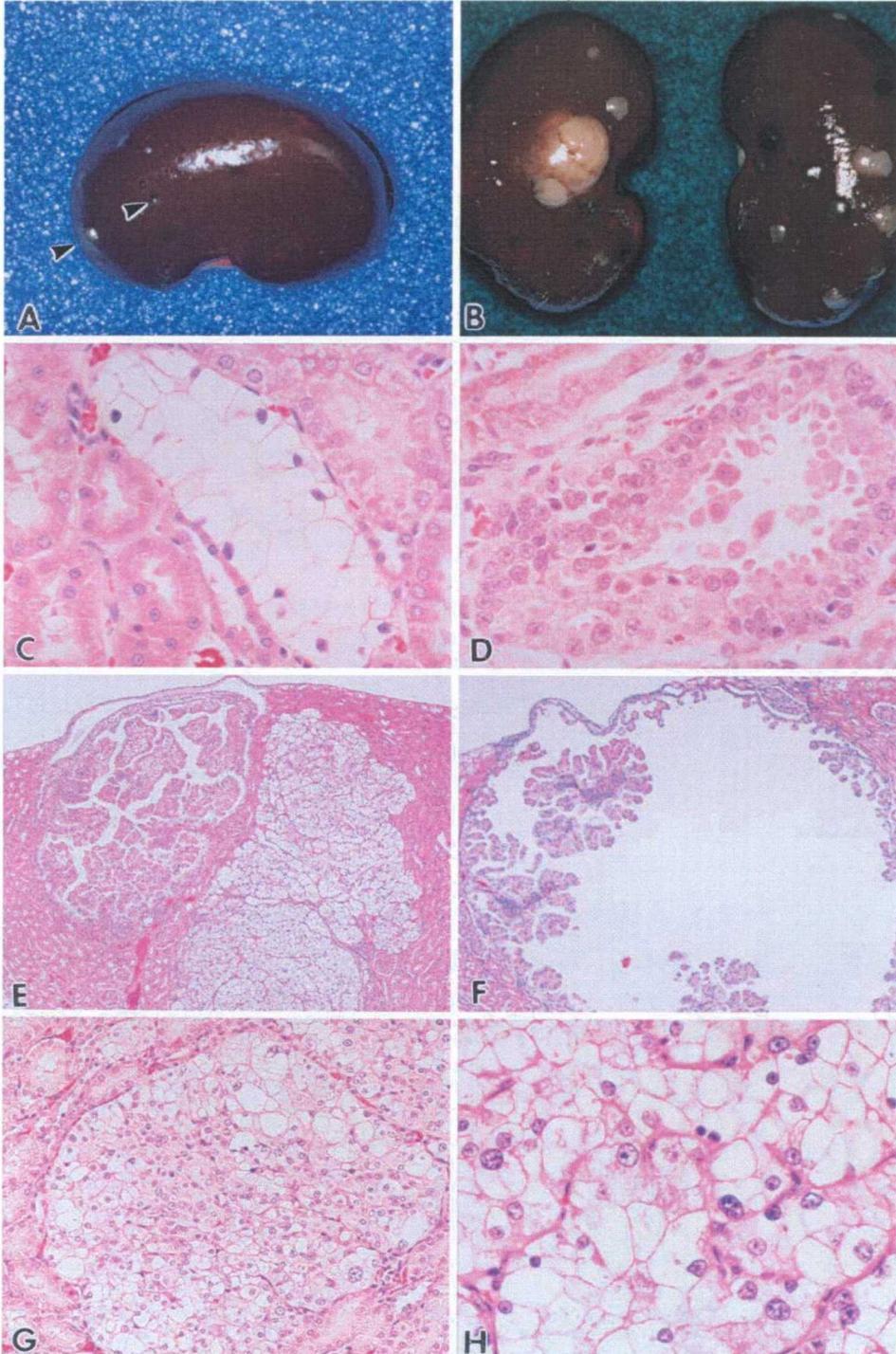


Fig. 2. Gross appearance and histology of the Nihon rat. (A) Gross appearance at 8 weeks of age. Scattered cysts on the surface of the kidneys (arrowheads). (B) Gross appearance at 34 weeks of age. Multiple cysts and yellowish white nodules. (C) Histological appearance of atypical hyperplasia (clear type) and (D) (acidophilic type). HE stain $\times 160$, (E) Histological appearance of papillary acidophilic cell carcinoma and clear cell carcinoma. $\times 40$, (F) cystic acidophilic cell adenoma. $\times 60$, (G) mixed clear/acidophilic cell adenoma. HE stain $\times 130$, (H) Detail of the same tumor at the higher magnification. $\times 400$. All histological panels were stained with hematoxylin and eosin.

第2章 “Nihonラット”の腎癌発症に關与する“Nihon遺伝子”探索のための染色体地図の作成

2-1 はじめに

Ekerラットはメンデルの法則に従った単一遺伝子 (*Tsc2* 遺伝子変異) による常染色体優性遺伝形式をとる唯一の遺伝性腎癌モデルであった。一方、第1章で著者らの発見した“Nihonラット”は、Ekerラットとは異なることから新規の遺伝性腎癌モデルになり得ると考えられた²⁰⁾。さらに、繁殖・交配成績の結果から、“Nihonラット”の変異ホモ接合体は胎生10日前後には致死すること、ヘテロ接合体の浸透率は100%腎細胞癌を生じ、淡明細胞 (clear cell) タイプを優位に発症し、生後3週齢という早期から前がん病変が出現し、8週齢までに腺腫を、6ヶ月齢に至っては腎細胞癌を呈することも確認された²¹⁾。よって、“Nihonラット”における腎癌発症に関しては、メンデルの法則に従った単一遺伝子による常染色体優性遺伝形式をとると考えられた^{20, 21)} (Fig. 1)。

そこで、本章では“Nihonラット”の病因遺伝子を同定するための最初のステップとして、113例の戻し交配ラットを作製し、遺伝的リンケージ解析を実施した。ラットを用いた突然変異体の病因遺伝子を連鎖解析に基づくポジショナルクローニング法で同定することは、たいへん困難な作業であるが、通常の方法として、すでにラット全ゲノムをカバーする遺伝子多型マーカーが開発されており、そのマーカーを用いて実施した。まず、ゲノムワイドスクリーニングを行い、次に染色体の平均10~20cM断片をカバーする各多型マイクロサテライトマーカーの遺伝子型と、病的形質を呈した個体数 (陽性個体数) との association study を χ^2 乗検定し、その値の高いマーカーがある染色体を選び、その候補染色体上のマーカーを基点として、その近傍にある病因遺伝子にできるだけ近いマーカーを求めた (リンケージ解析)。その結果、“Nihonラット”の病因遺伝子がラット染色体10番の遠位部にマッピングされることが明らかとなった。

2-2 材料および方法

“Nihonラット”の腎癌遺伝子はクローズドコロニーであるSD系ラットより発生したことから、変異を伝達していない系統で、近交系である Brown Norway (BN)ラット (日本チャールス・リバー株) を用いて、“Nihonラット”と交配し、F1動物を作製した。

交配に使用した“Nihonラット”は、第1章と同様に開腹手術により片側の腎臓表面のシストを確認したキャリアー動物を用いた。それから、ヘテロ接合体であるF1の雄1例を用いて、雌BNラットと次々に交配し[F1 {SD (Nihon/+) × BN(+/+)} × BN(+/+)]、113例の戻し交配動物を作製した (Fig. 2)。その後、13週齢の時点で剖

検して組織学的検査を実施した。その結果、多発性の腎細胞腫が63例（雄：30、雌：33例）に認められ、50例（雄：24、雌26例）が腎細胞腫を認めなかった。この発生率は遺伝学的な期待値である50%で有意差を示さなかった。なお、正常動物においては13週齢では決して腎腫瘍の発生はみられないことから、この週齢とした。

13週齢の時点で113例の戻し交配動物の尾を採取し、直ちに液体窒素で凍結し、使用するまで-80℃で保存した。そして、尾から2%硫酸ドデシルナトリウム/proteinase Kで蛋白を消化し、DNAをフェノール抽出した。PCR(polymerase chain reaction)法により、SD系ラットとBN系ラットの多型性を示すDNAマーカーを用いて、SD系ラットに特異的なDNAバンドが“Nihon遺伝子”を伝達したラットにみられるかどうか連鎖解析した。

ラットのすべての染色体をカバーするラットDNAマーカー(“MAP PAIRS”)をResearch Genetics社(Carlsbad, California州)から購入した。PCR反応は50ngのゲノムDNA、1pmol/ μ lのプライマー、0.5-1.25mMのMgCl₂(ToYoBo社製、大阪)、100-200 μ MのdNTPmix(ToYoBo社製)および0.5unitのTaqポリメラーゼ(ToYoBo社製)からなる10 μ lの混合反応で実施した。それぞれ、熱変性が92℃、60秒、アニーリングが55℃、60秒、伸長反応が72℃、90秒からなる25-35サイクルでthermal programmer(Quick Thermo Personal; Nippon Genetics社製、東京)を用いて増幅した。PCR産物は3-3.5%の低融点(LMP)アガロースゲル(Gibco BRL)で電気泳動し、エチジウムブロマイドで可視化した。

2-3 結果

最初にラット染色体1番から20番までをカバーする121のDNAマーカー(マイクロサテライトマーカー)で検討した。そのうち、Nihon(SD系統)とBN系統の間で多型性がみられた63のDNAマーカーを用い、スクリーニングを開始した。67例の戻し交配動物を用いた最初のスクリーニングにおいて、ラット染色体10番のD10Rat27というDNAマーカーがもっとも小さな組み換え率(7/67=10%)を示した。第1章で記したように、“Nihonラット”はEkerラットと同様に、常染色体優性遺伝形式をとり、単一遺伝子の変異で腎癌を生じると考えられることから、もっとも組み換え率の低いラット染色体10番に焦点をあてた。ラット染色体10番に局在するtuberous sclerosis 2(Tsc2)遺伝子、interleukin-3(IL-3)遺伝子、lethal(2)giant larvae(Llgl1)遺伝子の局在、ならびにmyosin heavy chain, embryonic skeletal muscle(MYHSE)遺伝子がNihon(SD系統)とBN系統の間で明らかな多型性を示し、組み換え率はそれぞれ、0.257(29/113; $\chi^2=25.6$, $P<0.0001$, ロッド値=6.10)、0.044(5/113; $\chi^2=93.6$, $P<0.0001$, ロッド値=25.16)、0.009(1/113; $\chi^2=109.0$, $P<0.0001$, ロッド値=31.56)、0.053(6/113; $\chi^2=90.6$, $P<0.0001$, ロッド値=23.87)であった。ラット染色体10番における4つの局在の連鎖関連と“Nihon遺伝子”の変

異をTable 1とFig. 3に要約した。

今まで述べてきたように、“Nihonラット”は遺伝的に近交系ではないSD系ラットであり、*MYHSE*遺伝子局在には“Nihonラット”間でさえも多型性を示した。従って、*MYHSE*遺伝子局在で“Nihonラット”の腎癌（4例の腎癌のうち3例）にヘテロ接合性の消失（LOH；Loss of heterozygosity）がみられた（Fig. 4）。そして、重要なこととして、BNラットとF1（Nihon/BN）ラットのDNA型から判定されるように、すべて3例ともwild-typeの対立遺伝子が欠失していた。このことは、Knudsonの“2ヒット説”に合致している。つまり、“Nihonラット”の腎癌形成に関しては、新規のがん抑制遺伝子の変異によって生じると考えられた。興味あることに、Ekerラットの病因遺伝子である*Tsc2*遺伝子は同じ染色体10番の近位部に局在する^{7, 8)}。従って、腎癌に関連した遺伝子はラット染色体3番に*Tsc1*遺伝子と*WT1*遺伝子、ラット染色体4番に*VHL*遺伝子と*c-Met*遺伝子、ラット染色体10番に*Tsc2*遺伝子と“Nihon遺伝子”が局在することとなる。

2-4 小括

日本におけるSprague-Dawley (SD) 系ラットのコロニーから新規の遺伝性腎癌モデルラットを発見し、“Nihonラット”と命名した（第1章）。本章では113例の戻し交配ラットを用いて“Nihonラット”の腎癌の病因遺伝子をマッピングした。その結果、“Nihonラット”の病因遺伝子はラット染色体10番の*interleukin-3 (IL3)* 遺伝子（ヒト染色体5番長腕23-31）（ $\chi^2=93.6$ 、ロッド値=25.16）、*lethal (2) giant larvae (Lgl 1)* 遺伝子（ヒト染色体17番短腕11.2）（ $\chi^2=109.0$ 、ロッド値=31.56）、および*myosin heavy chain, embryonic skeletal muscle (MYHSE)* 遺伝子（ヒト染色体17番短腕13.1）（ $\chi^2=90.6$ 、ロッド値=23.87）の間にマップされ、それぞれの距離は4.4cM、0.9cMおよび5.3cMを示し、ラット染色体10番の遠位部に位置していることが明らかとなった。本章の結果からは“Nihonラット”の病因遺伝子がヒト染色体5番か、17番に合致するか不明であった。

図表



FIG. 1. Transmission risk of...

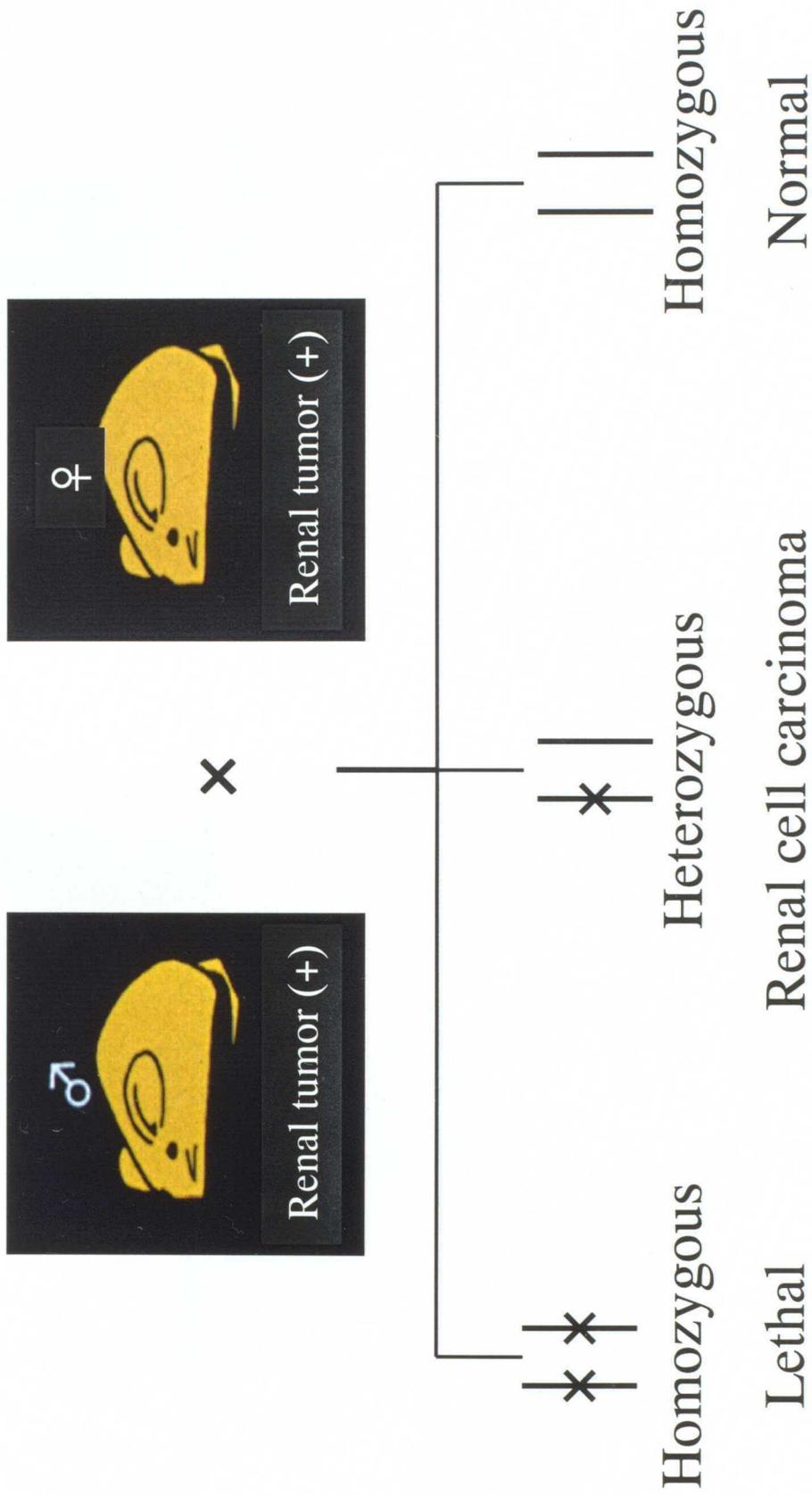


Fig.1 Transmission mode of Nihon rat

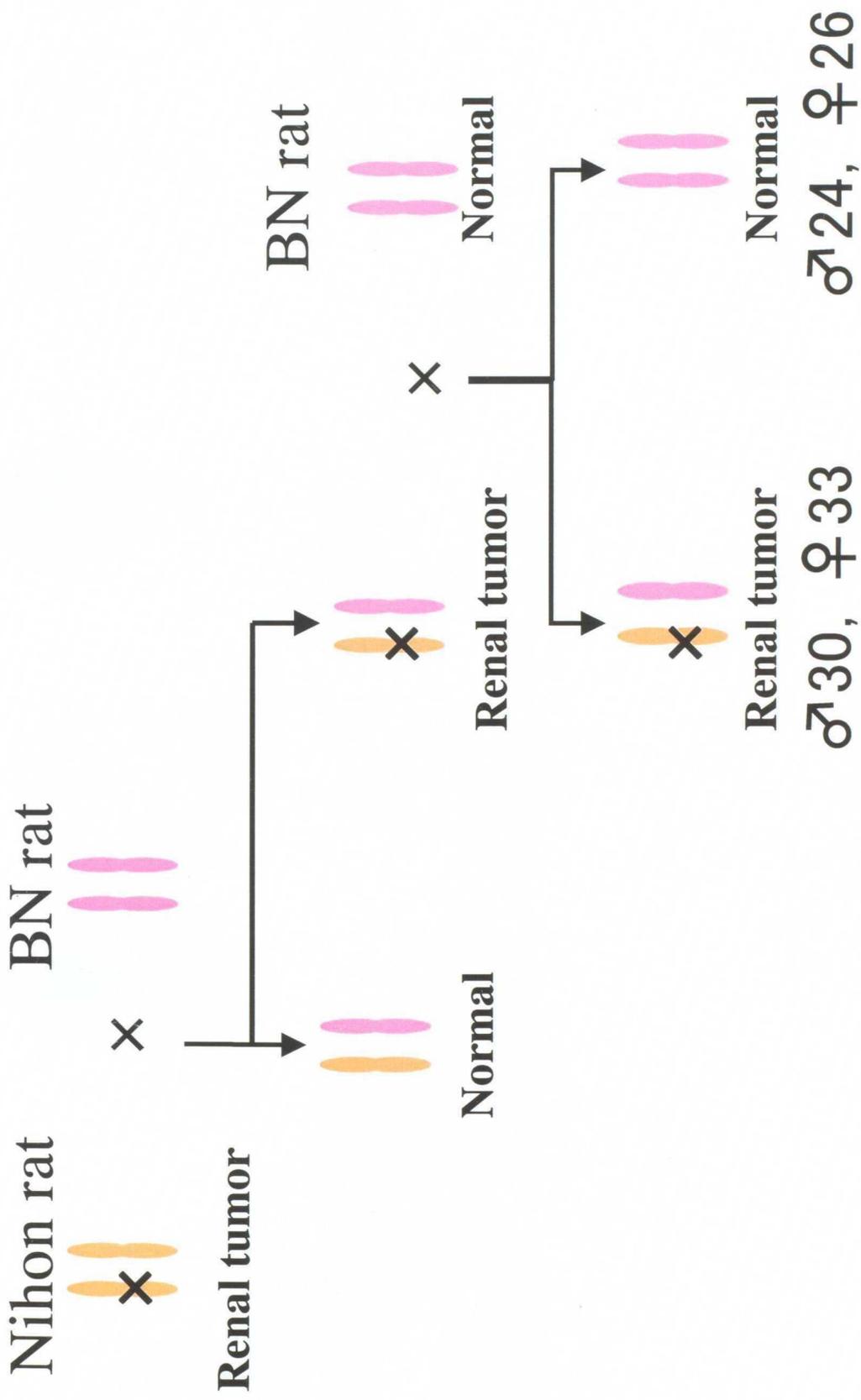


Fig.2 Genetic linkage analysis

Table 1 Linkage Analysis with *Tsc2*, *IL-3*, *LLGL1* and *MYHSE* Loci

Locus	No. of animals with tumor		No. of animals without tumor		%Recombinant	Lod score	χ^2	P value
	SD/BN	BN/BN	SD/BN	BN/BN				
<i>Tsc2</i>	51	12	17	33	25.7	6.10	25.6	P<0.0001
<i>IL3</i>	61	2	3	47	4.4	25.16	93.6	P<0.0001
<i>LLGL1</i>	62	1	0	50	0.9	31.56	109.0	P<0.0001
<i>MYHSE</i>	58	5	1	49	5.3	23.87	90.6	P<0.0001

Lod score; $Z_{max} = n \log_{10}(r) + (113 - n) \log_{10}(0.5)$, n=number of recombination, r=recombination fraction.
 χ^2 tests: Statview J-4.5 (Abacus Concepts, Inc., CA)

**Fig.3 Linkage between the *Nihon* gene on rat chromosome 10
Gene names and genetic distances from the *Nihon* gene are indicated.**

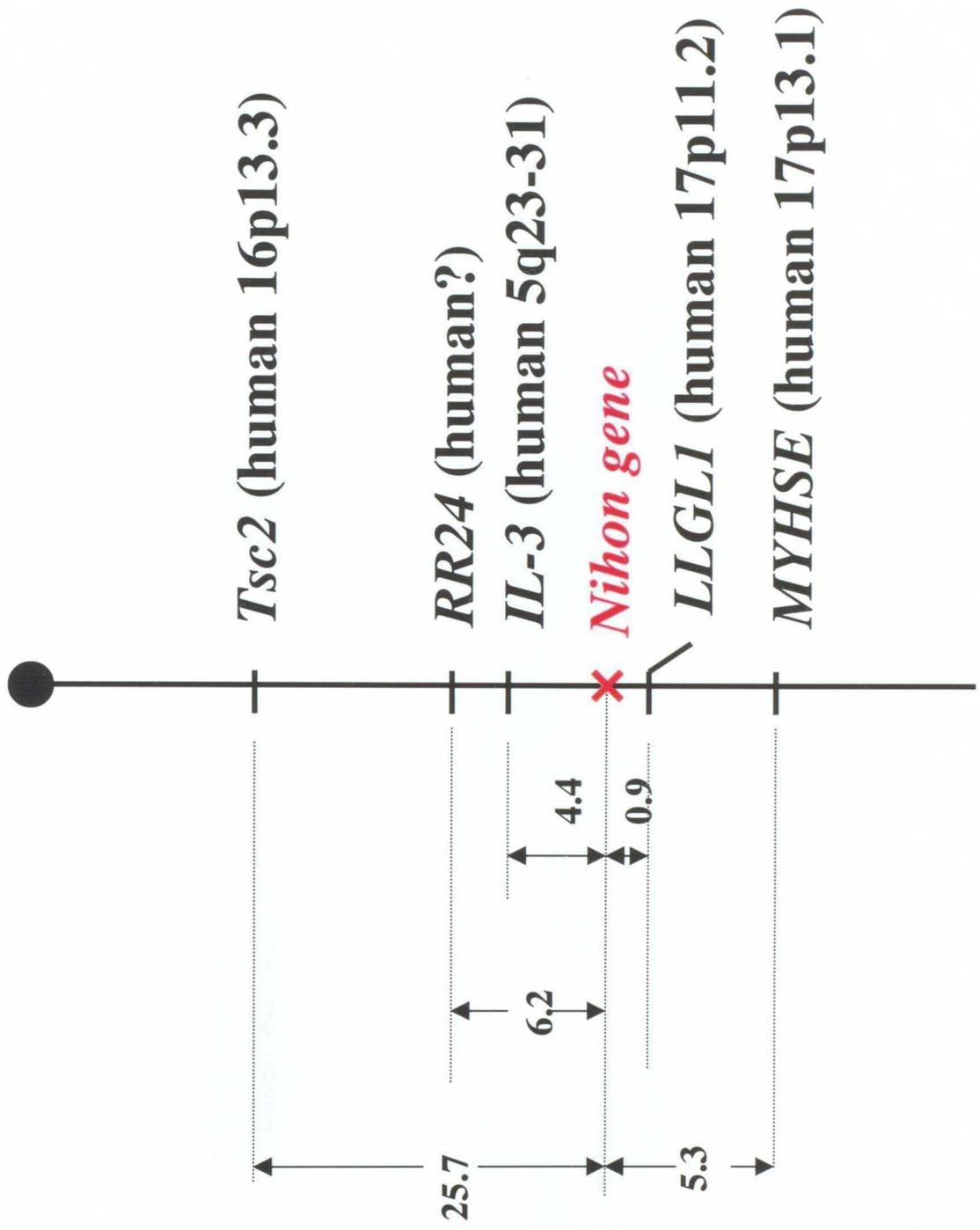
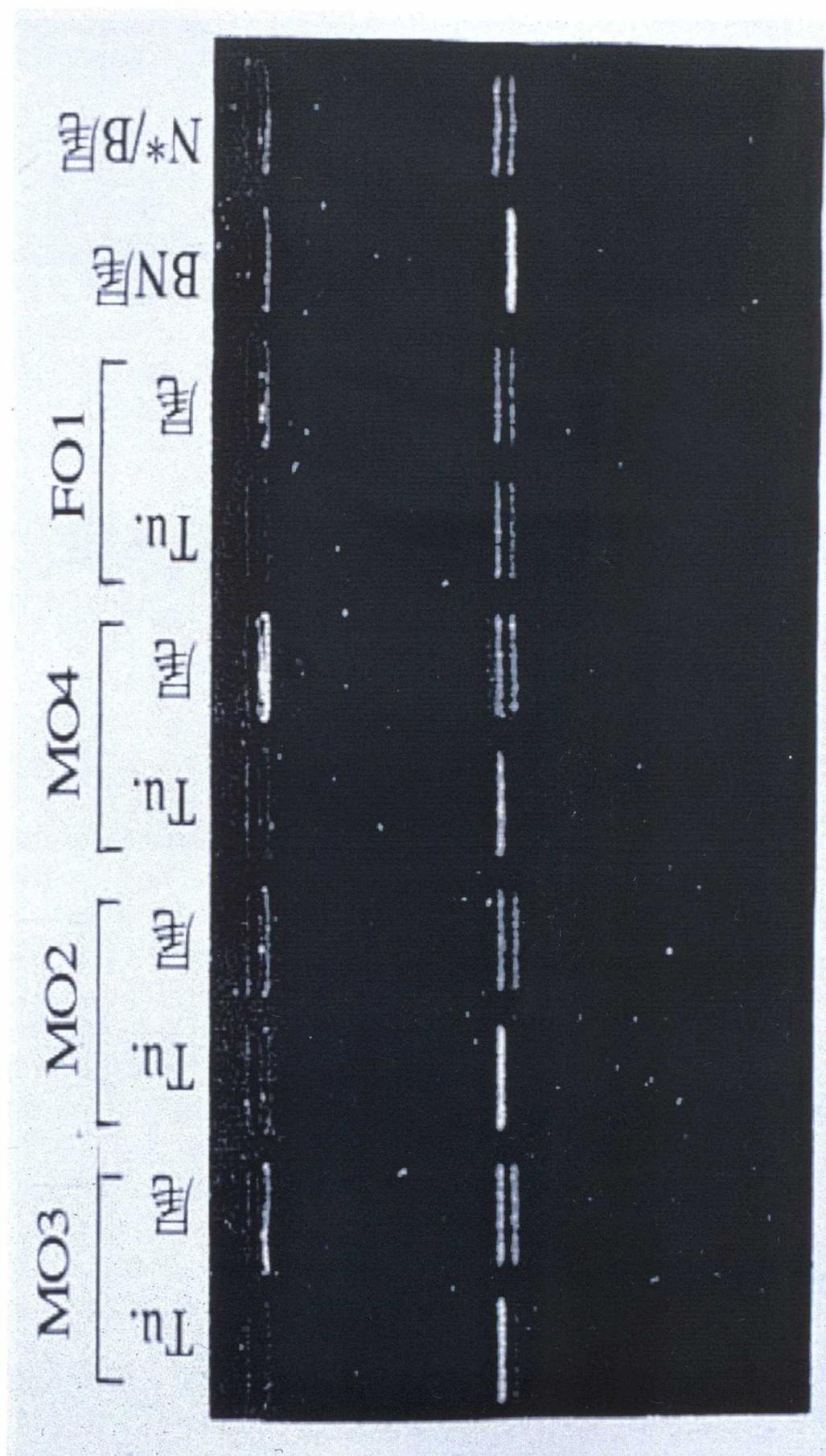


Fig.4 Loss of heterozygosity



Tu.:Tumor, N*/BTa: Nihon/BN rat 尾.

第3章 “Nihon ラット” の腎癌発症に關与する “Nihon 遺伝子” の単離

3-1 はじめに

第2章で“Nihon ラット”の病因遺伝子がラット染色体10番の *Il3* 遺伝子（ヒト染色体5番長腕23-31）と *Llgl1* 遺伝子（ヒト染色体17番短腕11.2）/*Myhse* 遺伝子（ヒト染色体17番短腕13.1）局在にマップされ、それぞれ、4.4cM 遠位、0.9 cM/5.3 cM 近位の位置であることがわかった^{2,2)} (Fig. 1)。その時点では、対応するヒト染色体が5番か17番か判明していなかった。しかもこの領域ですでに同定されている遺伝子で、腎癌の発生に關連する遺伝子はなかった。しかし、同一時期に腎癌を高いリスクで発生する BHD 症候群（Birt-Hogg-Dubé syndrome）の未知の病因遺伝子がヒト染色体17番短腕11.2あるいは17番短腕12-長腕11.2にマップされた^{2,3,2,4)}。

通常の病因遺伝子同定の方法として、疾患遺伝子の染色体上の位置をできるだけ詳細に定め、次にその領域から新規の候補遺伝子を見つけ出し、その疾患に共通にその遺伝子に変異があることを確認するという段階をとる（位置的候補遺伝子探索法）。

本章では、ヒト染色体17番短腕11.2に相同するラット染色体10番の領域に“Nihon ラット”の病因遺伝子局在を狭め、腎癌表現型の原因となる変異、ラット BHD ホモログの同定を試みた。

3-2 材料および方法

1) 組織標本、マッピング及び腎癌から分離した培養細胞

ラットの腎臓を採材し、直ちに液体窒素で凍結し、使用するまで-80℃で保存した。“Nihon ラット”の腎癌遺伝子はSD系統のラットで伝達されていることから、第2章でも述べたように遺伝的な關連がなく、また変異もない近交系の Brown Norway (BN) ラット（チャールス・リバー社産）を用い、雄“Nihon ラット”（Nihon/+、SD系統）と交配することによってF1動物を作製し、113例の戻し交配動物（F1{SD (Nihon/+) × BN (+/+) } × BN (+/+)）を得た。そのうち、13週齢の時点での組織学的検査によって多発性腎腫瘍を持つ63例（56%、雄；30例、雌；33例）と腎腫瘍を持たない50例（44%、雄；24例、雌；26例）が得られた（第2章）。

“Nihon ラット”から分離した腎癌の培養細胞を限界希釈法でクローニングして（1細胞/1 well/96 well プレート）確立し、DMEM（Dulbecco's modified Eagle's medium）/high glucose/10%牛胎児血清で培養した。1つの腫瘍培養細胞、Eker ラットから分離したLk9d(L)はDMEMとHam's F-12倍地の等量/牛胎児血清にラット尾線維でコートしたプラスチックのペトリプレートで培養した^{2,5)}。

2) RNA 単離、ノーザンブロット法及び cDNA 増幅

トータル RNA はトリゾール試薬 (Invitrogen 社製) で単離した。ノーザンブロット法と RT-PCR 法は Eker ラットで行った以下の方法で実施した⁹⁾。ノーザンブロット法は、RNA サンプルをホルマリン液からなる 1% アガロースゲルにより分離し、ナイロン膜 (Poll Biosupport 社製) 上に転写・固定した。プレハイブリダイゼーションを 65°C で 1mM EDTA、1% BSA、7% SDS (pH7.2) および 0.2M 燐酸緩衝液内で実施した。³²P ラベルされたプローブで標識後、ハイブリダイゼーションを同一の液で実施した。その後、フィルターは室温で 15 分間 1×SSC (0.15M NaCl、15mM クエン酸ナトリウム)、0.1% SDS で 2 回洗浄し、65°C で 15 分間 0.2×SSC、0.1% SDS で洗浄した。RT-PCR 法は、1 st strand cDNA を 20 μl の反応混合液でランダムヘキサマーを用いて 1 μg のポリ (A) の付いた RNA から合成した。すべての PCR 反応は、1 μl の 1 st strand cDNA テンプレート、25 pmol のそれぞれのプライマー、200 μm dNTPs、1mM MgCl₂、および PCR バッファーからなる 25 μl に Tth DNA ポリメラーゼ (Pharmacia-Biotech 社製) を加えて実施した。PCR 反応は QTP II サーマルサイクラー (Nippon Genetics 社製) を用いて以下のように実施した。最初に 93°C、3 分間の熱変性、次に 93°C で 1 分間の熱変性、55°C で 1 分間のアニーリング、そして 72°C で 1.5 分間の伸長反応で 35 サイクル行い、72°C で 3 分間の最終伸長反応を行った。マウス *Bhd* 遺伝子断片の増幅については、マウス胎齢 13.5 日の胎児から抽出したトータル RNA を用いて、以下のプライマーセットを設計した。

primer set 1 B2-46A: 5'-CAAGAAGTCGGACATGTGTG-3' (forward)

B2-46B: 5'-CCCACAAGTTGTCATCACTG-3' (reverse)、

primer set 2 B2-50A: 5'-TCATGGGGAATCAGGTGATC-3' (forward)

B2-50B: 5'-CGTCATCCAGAACTTCAGCA-3' (reverse)

ラット *Bhd* 遺伝子断片の増幅については、以下のプライマーセットを設計した。

primer set 1 BHDRI: 5'-CCCTCTGCCACTTCTGCGA-3' (forward)

BHDRG: 5'-AAGCCATGTTGCTCATCACC-3' (reverse)

primer set 2 BHDRA: 5'-GCACCCAGGTTATATCAGTC-3' (forward)

BHDRB: 5'-AGACAGGTTCTGGTTGGTCA-3' (reverse)

primer set 3 BHDRH: 5'-TTGTGGTGACCAGCGGTAG-3' (forward)

BHDRF: 5'-CTCCGTGACTCTGTAGCTG-3' (reverse)

増幅した cDNA 断片はダイレクトシーケンス解析を行った。5'- and 3'-RACE 法 (cDNA 末端高速増幅法) は以前に Eker ラットで実施した方法¹⁵⁾で行った。簡単に言えば、5'-RACE 法は、first strand の cDNA を 1 つのプライマーである BHDG7 (5'-GGCTGACGTACTIONTIGATAGAG-3') でラット胎児のトータル RNA を用いて合成した。RNA リガーゼによる連結の後、逆転写反応は以下のプライマーセットで実施した。

BHDG8 (5'-CAAGAAGTCAGACATGTGCG-3', forward)

BHDG9 (5'-CTTCCTCAGCCTGCTCAAC-3', reverse)

それから、第1の PCR 産物は以下のプライマーセットを用いて第2の PCR で実施した。

BHDRA

BHDG10 (5'-GAGCGTGTAGAACCTCCGT-3, reverse)

3'-RACE 法については、first strand の cDNA は以下の1つのプライマーを用いて合成した。cDNA-1 (5'-GAGAGAGAGAGAGAGAGAGAACTAGTGCGGCCGC TTTTTTTTTTTTTTTTTTTT-3')。

第1の PCR と第2の nested PCR は、以下のプライマーを用いた。

第1の PCR BHDRH: 5'-TTGTGGTGACCAGCGGTAG-3' (forward)

NOT3-1: 5'-AGAACTAGTGCGGCCGCTT-3' (reverse)

第2の PCR BHDRK: 5'-CAAGGAGGACACCCAGAAG-3' (forward)

NOT3-1

RACE 法によって増幅された cDNA 断片は、直接に、またプラスミドベクターのサブクローニングの後、両方ともシーケンスした。

3) DNA 分離、サザン法及び LOH (ヘテロ接合性の消失) 解析

13 週齢の 113 例の戻し交配した動物の尾から DNA を抽出した (第2章)。DNA は Eker ラットで実施したように⁹⁾、proteinase K で蛋白を消化し、フェノール/クロロホルム抽出して単離した。サザンプロット法は Eker ラットで実施した方法で、制限酵素消化後、DNA は 1%アガロースゲルで分離し、アルカリ化でナイロン膜上に転写・固定した。プレハイブリダイゼーションとハイブリダイゼーションを 1×SSC、0.1%SDS による洗浄を省いた上記のノーザンプロット法と同一方法で行った。ゲノム PCR 法は第2章と同様な方法で実施した⁹⁾。ゲノム PCR 法で LOH 検出のために用いたプライマーは以下の如くであった。

BHDG5: 5'-ATCATCCTTTCTCTCAGCCTGTGG-3' (forward)

BHDG6: 5'-CGGAATGGACAAGGTTACATCTC-3' (reverse)

ゲノム PCR 法による“C tract”の生殖細胞挿入の解析のために、以下のプライマーを用いた。

BHDRI

BHDRJ (5'-CTCGCACATGTCTGACTTCT-3', reverse)

セカンドヒット変異の探索には、ゲノム PCR 法と直接シーケンス解析は腫瘍から抽出した DNA と正常部腎臓組織から抽出した DNA を用いて実施した。ラット *Bhd* 遺伝子 (エクソン 3 から 13) の完全コード領域の変異スクリーニングを実施した。用いたプライマーを Table 1 に示す。

4) 抗体産生物及びウエスタンプロット法による解析

ヒトフォリクリン (ヒトエクソン 14) の 15 アミノ酸残基に対する抗体

(Leu-Met-Ser-Thr-Val-Arg-Ser-Pro-Thr-Ala-Ser-Glu-Ser-Arg-Asn) を免疫したウサギで作製し、この塩基配列はラットの配列 (ラットエクソン 13) と 1 残基異なっている。抗体は血清からアフニティにより精製した。細胞抽出物は SDS-PAGE 法で同じバッファーで溶解して得られ、蛋白濃度は DC 蛋白アッセイ (Bio-Rad 社) で決定した。βメルカプトエタノール添加後、蛋白と同量を SDS-PAGE 法 (10%ゲル) で分離し、ナイロン膜上に転写・固定した。一次および二次抗体の反応と化学ルミネッセンス検出法^{2,6)} で実施した。

3-3 結果

1) 詳細なマッピングによりゼロ組み換えとなるラット *Bhd* 遺伝子領域を同定

本章では、“*Nihon* 遺伝子”局在に近いマーカーを用いて、詳細なマッピングにより第 2 章で実施した“*Nihon* ラット”の連鎖解析を継続し、2つの局在、*Q9DCE9* 遺伝子 (ヒト染色体不明) と *COPS3* 遺伝子 (ヒト染色体 17 番短腕 11.2) でゼロ組み換え率 (0/113) となった^{2,2)}。解析を実施している間、ヒト *BHD* 遺伝子とそのマウスホモログ (相同遺伝子) の病因遺伝子が同定された^{2,3, 24, 27)}。マウス *Bhd* 遺伝子の cDNA 断片を増幅して、ラットゲノムにおける相同配列を決定するための連鎖解析用プローブとして用いた。推定されるラット *BHD* 相同遺伝子 (*Bhd*) と“*Nihon* ラット”の腎癌表現型との間に完全な分離の一致がみられた。従って、ラット *Bhd* 遺伝子はラット染色体 10 番に局在し、“*Nihon* ラット”の病因遺伝子に極めて近くにリンクすることがわかった (ゼロ組み換え率、**Fig. 1**)。興味あることに、*Eker* ラットは同じラット染色体 10 番の近位部に位置している⁸⁾。従って、第 2 章でも記載したように、ラットにおける腎癌に関連する遺伝子は染色体 3 番に *Tsc1* 遺伝子と *Wt1* 遺伝子が、染色体 4 番に *Vhl* 遺伝子と *c-Met* 遺伝子が、そして、染色体 10 番に *Tsc2* 遺伝子と“*Nihon* ラット”の病因遺伝子が局在することがわかった。

2) “*Nihon* ラット”でのラット *Bhd* ホモログの生殖細胞変異及び腫瘍での LOH

NCBI (2002 年 7 月 21 日に更新された) のラットゲノムデータベースを検索することによって、2つの BAC クローン、CH230-13G20 と CH230-61A17 がヒト/マウス *Bhd* 遺伝子の cDNA 配列と相同性を示すことを見出した。ヒト *BHD* 遺伝子のエクソン 5 からエクソン 13 までの類似した配列集団を検出した (データは示していない)。これらラット BAC で推定されるエクソン配列とヒトおよびマウス *Bhd* 遺伝子コード領域の 5'-および 3'-末端との相同性を考慮して、これらのプライマーセットが RT-PCR 法および 5'-および 3'-RACE 法でラット *Bhd* 遺伝子 cDNA を増幅するために設定した。これらのプライマーでラット *Bhd* 遺伝子 cDNA の増幅に成功し、シーケンス解析で予想される 1 つの遺伝子 2846 ヌクレオチドが同定された。そのラット *Bhd* 遺伝子は 579 アミノ酸残基の遺伝子産物 (フォルクリン) をコードすると考えられ、ヒトフォルクリン (GenBank accession no. NP659434) とマウスフォル

クリン (GenBank accession no. AAH25820) とそれぞれ 93% および 97% の相同性を示した (データは示さず; ラット *Bhd* 遺伝子産物、GenBank accession no. AB096213)。データベースの検索でラット *Bhd* 遺伝子に 2 つの 5' 末端のコードしないエクソンがみられた (Fig. 2)。一方、ヒト *BHD* 遺伝子では 3 つのコードしないエクソンがみられる²⁷⁾。

プローブとしてこれらの cDNA を用いたサザンブロット法、およびイントロン 8 にみられる配列長多型 (SLP) (ヒトゲノム配列ではイントロン 9 に一致する) を利用したゲノム PCR 法によって、原発腎癌と “Nihon ラット” (雄、10 ヶ月齢) から培養した腎癌の培養細胞 (NRs) で *Bhd* 遺伝子局在のヘテロ接合性の消失 (LOH) を検査した (Fig. 3)。11 例の原発腫瘍 (“Nihon ラット” 4 例) と NRs (1 つの腫瘍から得られた 7 つの培養細胞) を検査した。11 例の腫瘍で 10 例とすべての NRs で *Bhd* 遺伝子局在に LOH がみられた。重要な点は、LOH を示したすべてが “Nihon ラット” の変異アレルを保有していることであった (Fig. 3)。

LOH のみられた腎癌培養細胞と正常腎臓組織から RNA を抽出し、ラット *Bhd* 遺伝子ホモログの発現を解析した。*Bhd* 遺伝子プローブを用いて正常腎臓組織で 1 つの主要な 3 キロベースのバンドがノーザンブロット法によって検出された。異常な *Bhd* 遺伝子の mRNA は検出されず、*Bhd* 遺伝子の発現量は正常組織に類似していた。類似した長さの cDNA 断片が正常組織と腎癌培養細胞の両方で RT-PCR 法により増幅した。これらの断片をシークエンス解析すると、腎癌培養細胞から得られた cDNA のエクソン 3 の “C tract” 内に 1 つのシトシン (C) の挿入があることがわかった (Fig. 4A)。野生型アレルにみられる 5 つ C tract の代わりに変異アレルには 6 つ C tract がみられた。この挿入の結果として、フレームシフトが生じ、開いた読み枠 (ORF) がエクソン 3 のコドン 17 で破壊され、下流 26 のアミノ酸で早期の終止コドンを引き起こし、その下流のアミノ酸が欠損していた。結果として変異蛋白は正常なラット *Bhd* 遺伝子配列 (フォルクリン) に重要な蛋白の大半を欠損していることになる (Fig. 4A)。腎癌を生じた個々の “Nihon ラット” は生殖細胞変異としてこの挿入をゲノム DNA 配列に伝達していた (Fig. 4B)。野生型アレルに欠失がなく、LOH がみられなかった腫瘍の 1 例 (Fig. 3) では、ダイレクトシークエンス解析でコドン 209 (Glu でストップ) で蛋白の早期終止の原因となる G から T への塩基転換 (G926T) がエクソン 6 でみられた (Fig. 5)。従って、ラット *Bhd* 遺伝子の両方のアレルに不活性化が生じており、Knudson の 2 ヒット説である腫瘍抑制メカニズムを支持する結果となった。

興味あることに、ラットにみられた変異型、1 つのホモヌクレオチドにおける 1 つの C 挿入は、ヒト *BHD* 症候群でもっとも多く認められる変異型である²⁷⁾。複製の間、DNA ポリメラーゼの翻訳スリップはモノヌクレオチド路 (tract) で変異を生じるメカニズムとして示唆され、ゲノム DNA のそのような領域では高頻度に変異

が起こる原因となる²⁸⁾。ヒト *BHD* 遺伝子のエクソン 11 で高頻度変異する C tract はラット *Bhd* 遺伝子ホモログでも同様にエクソン 3 で起こり、一塩基挿入 (C 挿入) が生じていた。

3) 抗フォリクリン抗体は切断された変異 *BHD* 蛋白を検出できない。

次に、著者らはフォリクリン (ラットエクソン 13、ヒトエクソン 14) のカルボキシル基末端ペプチドを認識するウサギ抗フォリクリン抗体を作製した。そして、その抗体はウエスタンブロット法で Eker ラットから分離した腎癌培養細胞、Lk9d(L) の抽出物において約 66 キロダルトンの蛋白反応を示した (Fig. 6B)。この分子量はラットフォリクリンの推定量 64 キロダルトンと同様である。対照的に Lk9d(L) でみられた約 66 キロダルトンの蛋白は NR 培養細胞では検出されなかった (Fig. 6B)。NR 培養細胞は Lk9d(L) の同じレベルでの変異アレルにおいて、*Bhd* 遺伝子 mRNA を発現している (Fig. 6A)、この結果は生殖細胞の変異アレルは正常なフォリクリンを産生しないことを示している。さらに、内部開始コドンから複製した異常な産物の兆候もなかった。以上の結果から two-hit メカニズムによりフォリクリン機能の消失が“Nihon ラット”における腎発癌の重要な第 1 歩であると言える。

著者らは雌雄キャリアーの交配で胎生 14 日においてホモ接合体の変異を検出したことがない。それは変異ホモ接合体では胎生期の早期に致死することを意味している²⁰⁾。

BHD 症候群は、Birt、Hogg、Dubé によって 1977 年に最初に記載された²⁹⁾。毛包の過誤腫、腎腫瘍および自然気胸を特徴とする。近年、ヒト *BHD* 遺伝子²⁷⁾ の発見は *BHD* 患者の腫瘍形成のメカニズムを理解するのに重要な最初のステップであるが、しかし、*BHD* 遺伝子産物 (フォリクリン) の機能は解明されていない。この論文を作成している間に、イヌで腎嚢胞性腺癌と結節性皮膚線維症 (RCND) を生じる遺伝病でイヌ *BHD* 遺伝子ホモログが同定された。このイヌ *BHD* 遺伝子ではコドン 255 で高い保存性のみられるヒスチジンからアルギニンへ変異したミスセンス変異が生じている。しかし、イヌ腎腫瘍 (腎嚢胞性腺癌) ではセカンドヒット変異も LOH も報告されていない³⁰⁾。

著者らは現在“Nihon ラット”の表現型 (腎腫瘍の発現) の抑制が可能であるかどうかを確かめるために野生型 *Bhd* 遺伝子で構築したトランスジェニック“Nihon ラット”の作製を試みている。このトランスジェニック“Nihon ラット”を用いた回復試験により、“Nihon ラット”における腎癌発症の病因遺伝子の同定が可能となる。

3-4 小括

“Nihon ラット”の病因遺伝子のマッピングに引き続き、“Nihon ラット”において一塩基挿入を原因とする *BHD* 遺伝子 (ラット染色体 10 番、ヒト染色体 17 番短腕

11.2) の生殖細胞に変異を見出した。一塩基挿入の結果、フレームシフト変異が生じ、下流 26 アミノ酸で終止コドンを生じ、大半のアミノ酸が欠損する。また、ホモ変異接合体はラット胎児期の早期に致死することを見出した。腎細胞癌（11 例中 10 例）に *BHD* 遺伝子で LOH（ヘテロ接合体の消失）が高率に認め、さらに LOH を認めなかった 1 例においても点変異（ナンセンス変異）を発見し、Knudson の 2 ヒット説の適応が確認された。従って、“Nihon ラット”は腎発癌に関連し、ヒト *BHD* 症候群の動物モデルとなる新規のがん抑制遺伝子として有用なモデルと考えられる。

以上のことから、“Nihon ラット”は *BHD* 遺伝子機能および腫瘍発生メカニズムを研究するのに有用な実験モデルであると考えられる。

図表

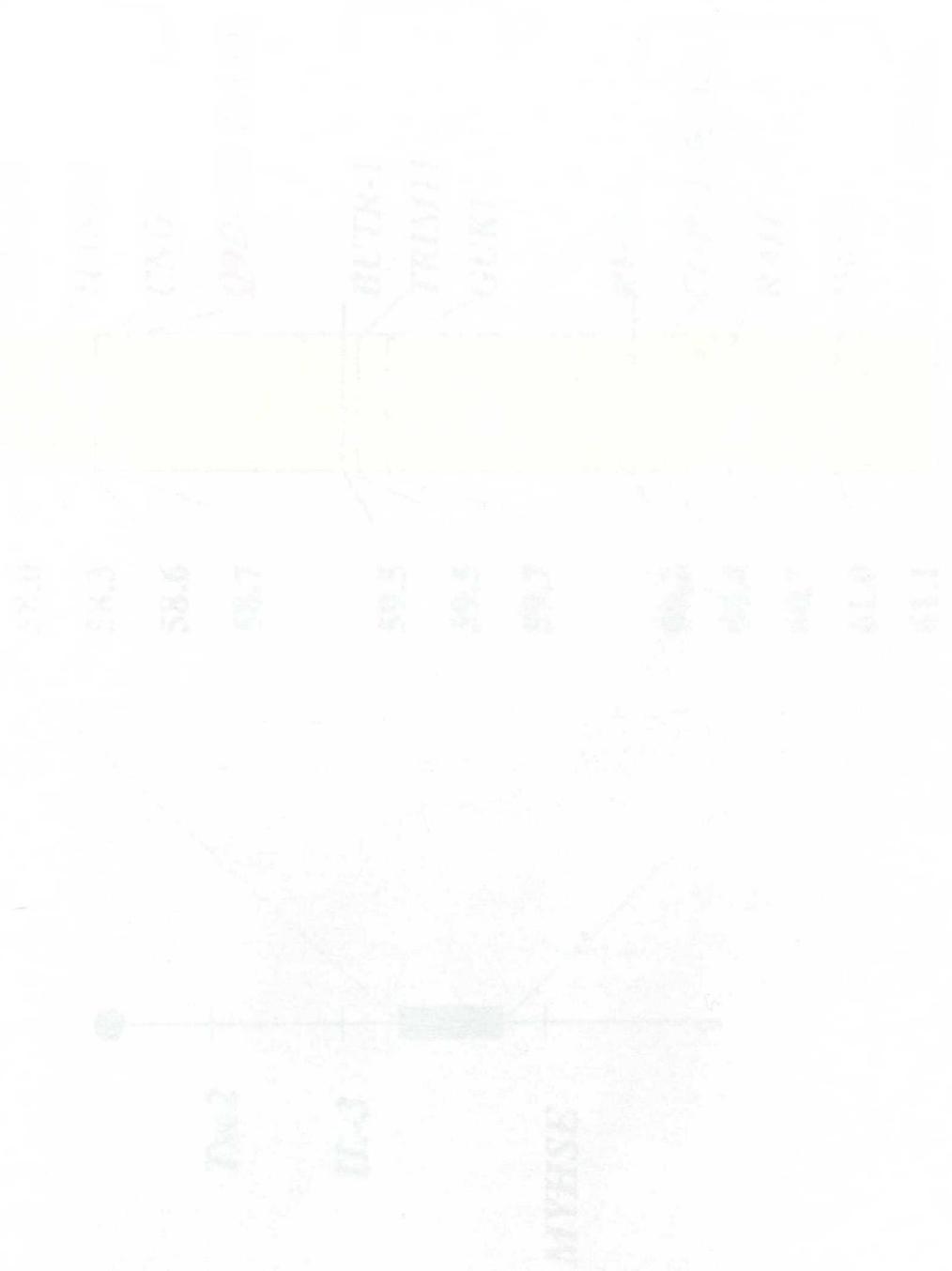


FIG. 3. THE 3D-BAR CHART SHOWING THE DATA OF THE 3D-BAR CHART.

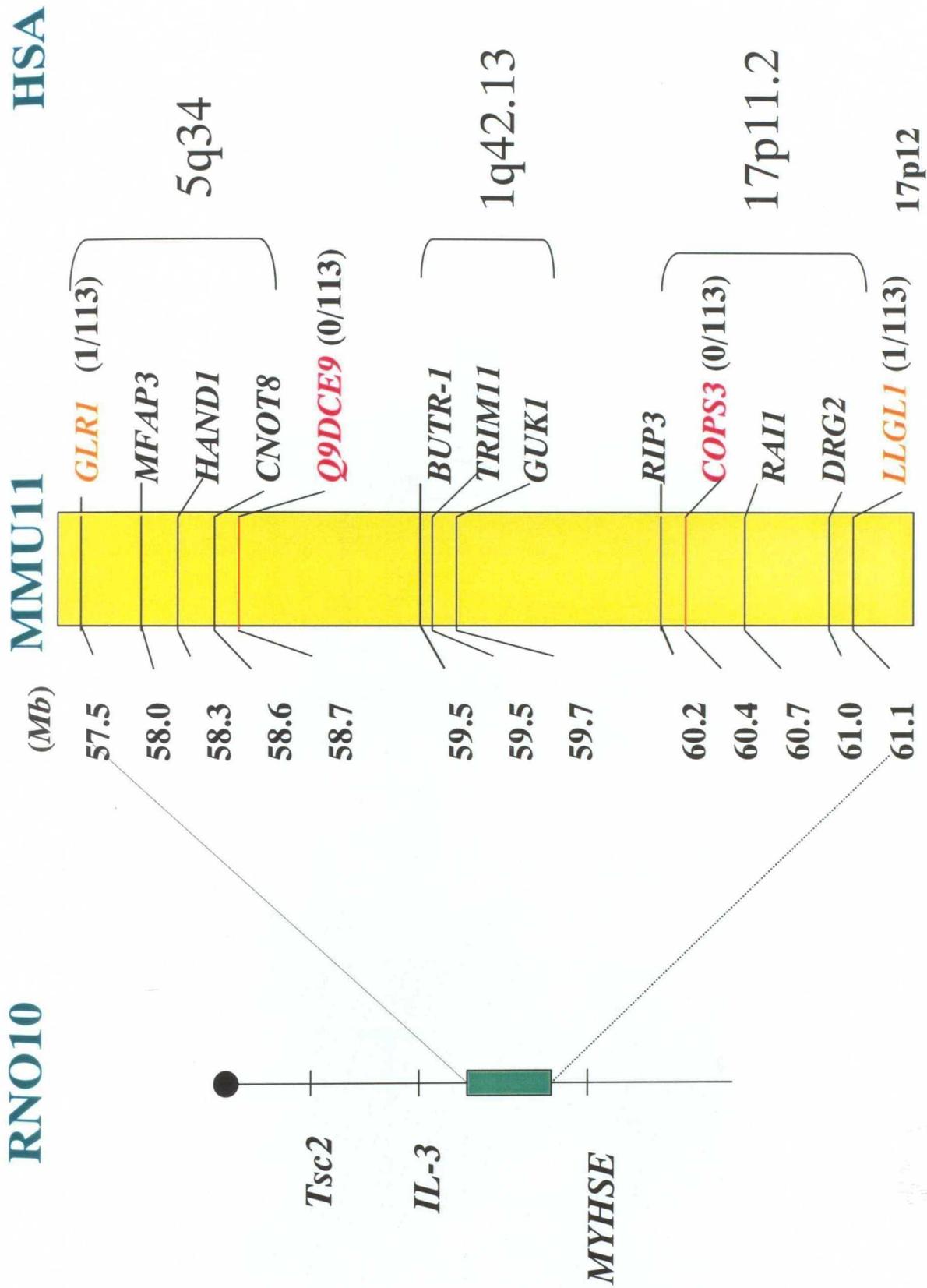


Fig.1 The rat-mouse-human comparative map

GLRI, *Q9DCE9*, *COPS3* and *LLGL1* indicate polymorphic markers.

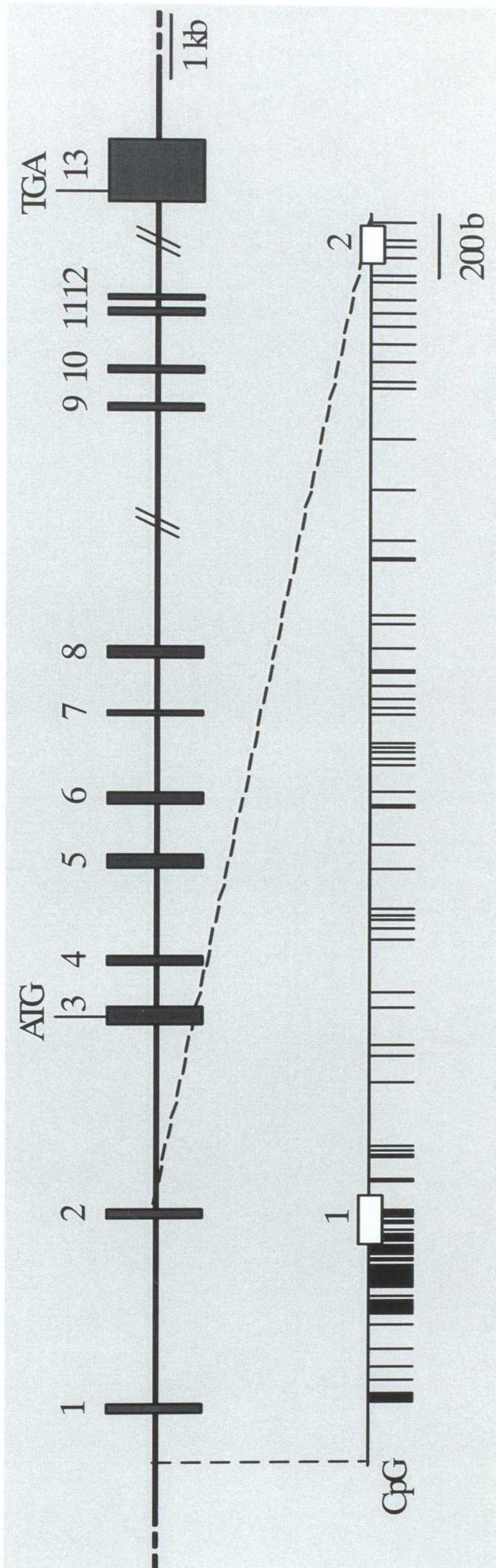


Fig.2 The genomic structure of rat *Bhd* homologue
Exons are denoted by shaded boxes with numbers. Below the overall exon-intron structure, a CpG island found around exon 1 is shown in an enlarged view.
Each vertical line marks a CpG sequence.

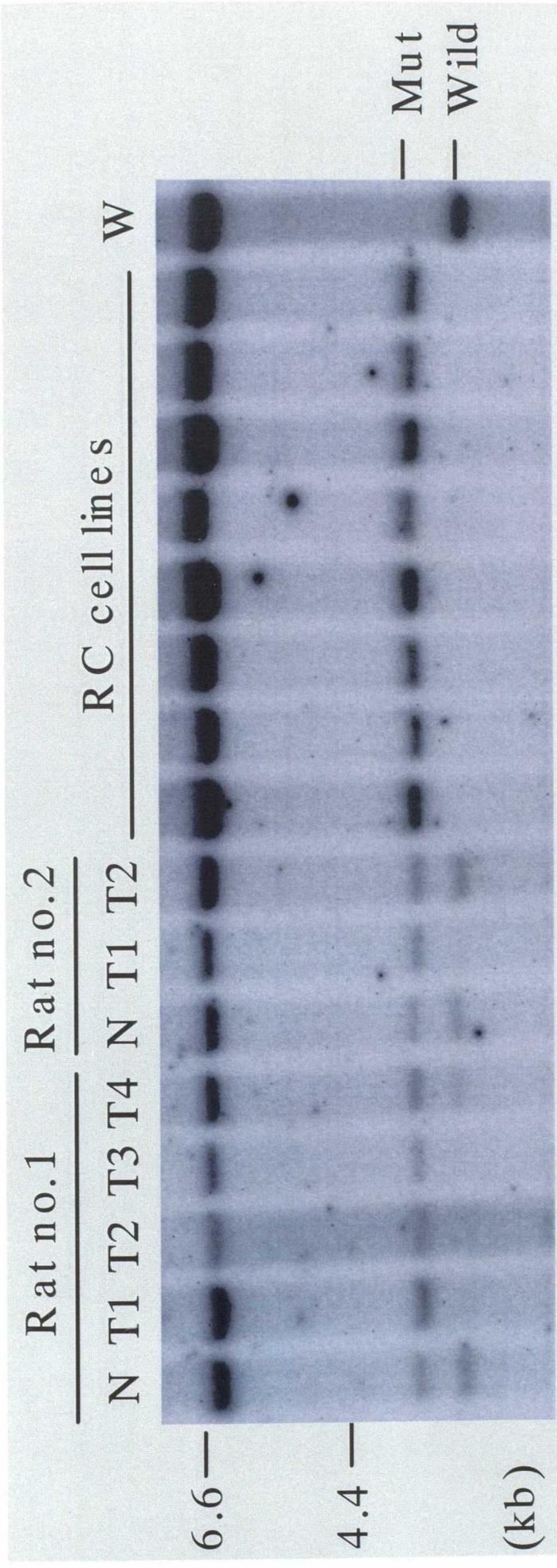
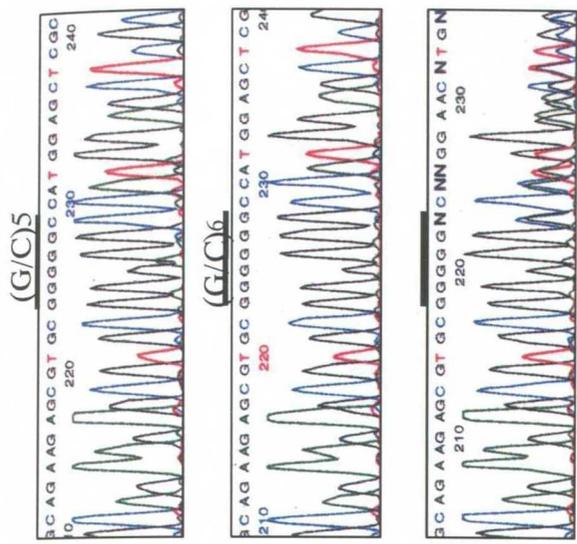


Fig.3 LOH (loss of heterozygosity) of the *Bhd* gene in Nihon rat RCs
Representative Southern blot analysis of RCs with a *Bhd* probe. DNAs from normal tissues(N)
and primary RCs (T) from two Nihon rats and Nihon rat-derived RC cell lines were analyzed
by *Hinc II* digestion. Positives of Nihon rat-associated band (Mut) and wild-type band (Wild)
are shown on the right.

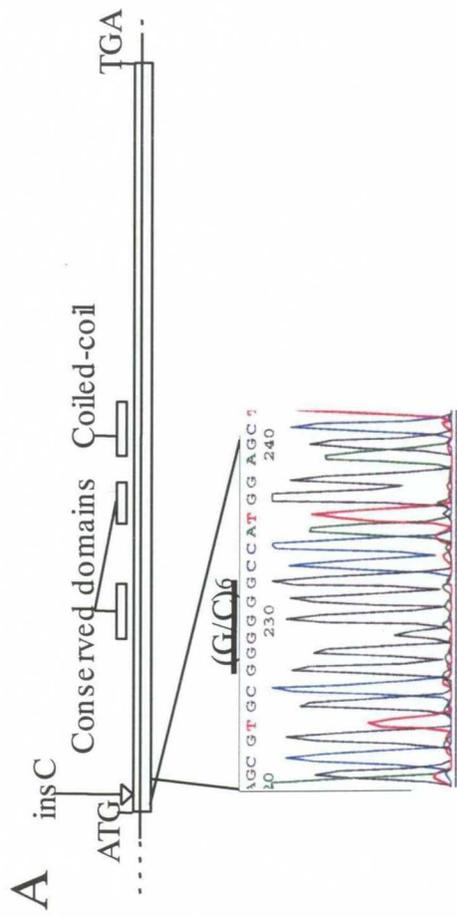


Wild-type allele
(Normal rat)

Mutant allele
(Cells with
LOH)

Heterozygote
(Nihon rat)

B



Wild-type 5'-CTC·CAT·GGC·CCC·CGC·ACG·CTC·TTC·TGC·ACG·GAG·GTT·CTA·CAC·GCT·CCC·
 L H G P R T L F C T E V L H A P
 16

CTG·CCC·CAG·GGT·GCC·GGA·AGT·GGG·GAC·AGT·CCT·GGC·CAG·GTT·GAG·...·3'
 L P Q G A G S G D S P G Q V E

Mutant 5'-CTC·CAT·GGC·CCC·CCG·CAC·GCT·CIT·CTG·CAC·GGA·GGT·TCT·ACA·CGC·TCC·
 L H G P P H A L L H G G S T R S
 16

CCT·GCC·CCA·GGG·TGC·CGG·AAG·TGG·GGA·CAG·TCC·TGG·CCA·GGT·TGA·3'
 P A P G C R K W G Q S W P G X

Fig.4 A germ-line mutation of *Bhd* homologue found in the Nihon rat

(A) A cytosine (C) insertion in the *Bhd* cDNA found in RC cells in exon 3. The *Bhd* cDNA from the Nihon rat-associated allele in RC cells is schematically represented. The coding region of *Bhd* is shown by an open box. Regions encoding evolutionarily conserved domain and coiled-coil motif are denoted by shaded and filled boxes, respectively. The position of the cytosine insertion is marked by an arrow (insC). A representative chromatograph (reverse sequence) of direct sequence analysis of the amplified *Bhd* cDNA product is shown. A C/G₆ tract replaces wild-type C/G₅ tract in the sequence (bar). Below the chromatograph, reading frames of wild-type and mutant cDNAs are compared. As a result of the C insertion, a frameshift occurs after codon17. Italics denote incorrect amino acid sequence generated by insertion.

(B) Genomic sequence analysis of *Bhd* gene in the Nihon rat. Genomic DNAs of wild-type rat, RC cell with LOH of *Bhd* and Nihon rat heterozygote are analyzed for exon 3 sequence. Representative chromatographs (reverse sequence) are shown. In the Nihon rat, peaks are overlapped after the insertion site.

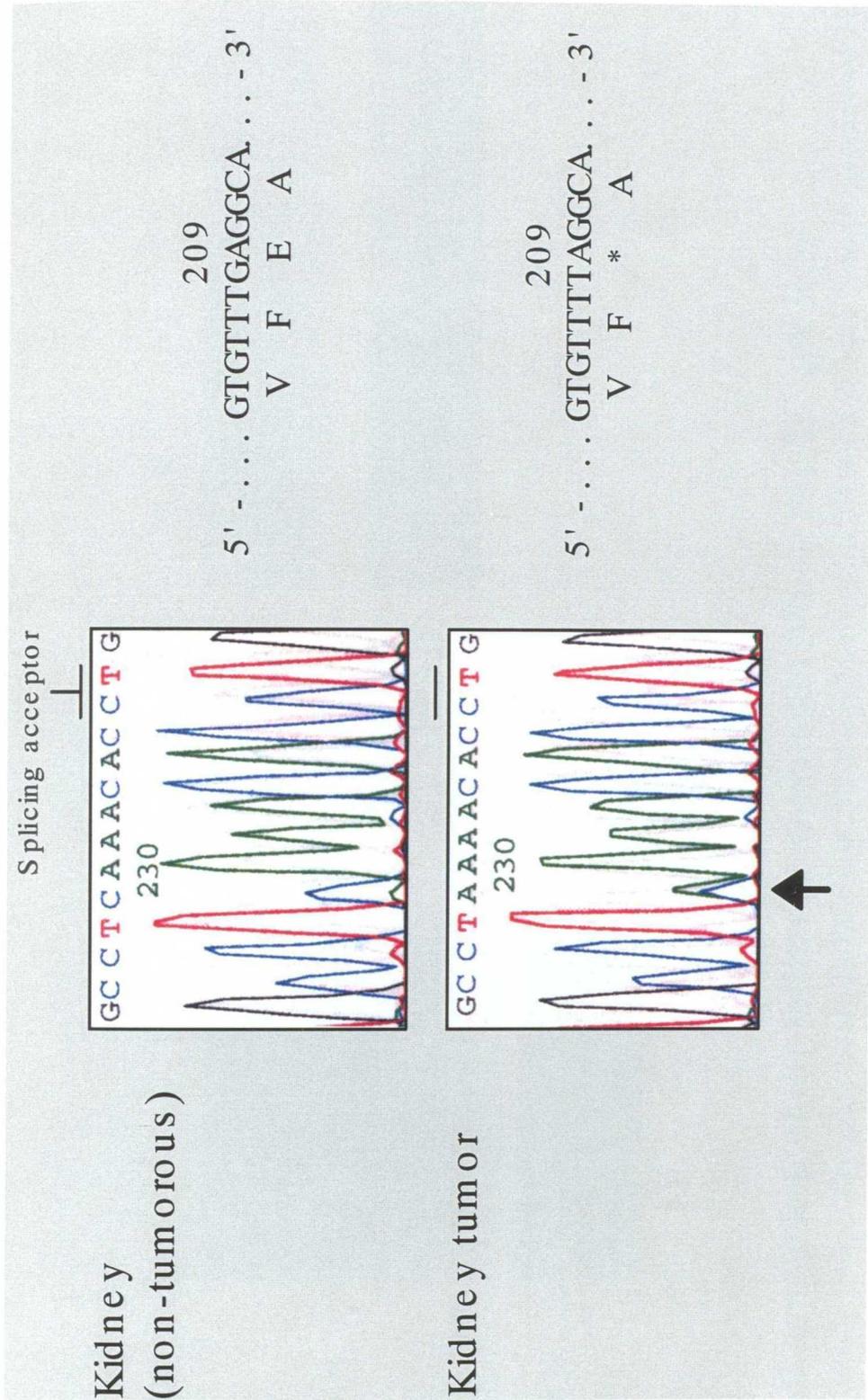


Fig.5 An intragenic *Bhd* mutation found in an LOH-negative primary RC in the Nihon rat

Chromatographs of direct sequence analysis for exon 6. Reverse sequences of exon 6 in a LOH-negative primary RC and control tissue are shown. Near the splicing acceptor site, C/A overlapped peak was detected in the RC sample (arrow), indicating that a mutation was introduced at this site. (Right) A nonsense mutation found in exon 6. First G of codon 209 (GAG for Glu) in the wild-type sequence is replaced by T in the RC. This G→T transversion creates a premature stop codon (*).

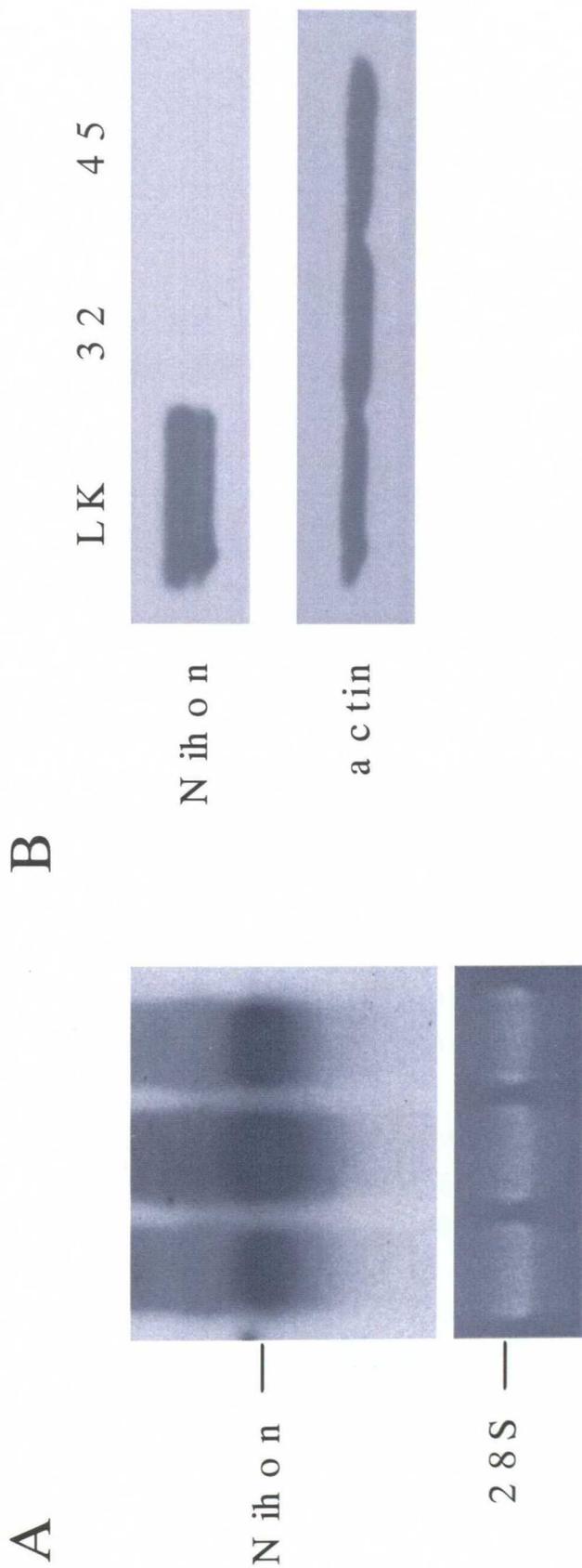


Fig.6 Loss of expression of the folliculin proteins in Nihon rat RC cell lines

(A) Northern blot analysis of *Bhd* expression in RC cells. Total RNAs from the Eker rat RC cell line (LK) and two Nihon rat RC lines (NR 32 and 45) were analyzed by a *Bhd* probe. 28S RNA bands stained with ethidium bromide are shown below. (B) Western blot analysis of folliculin expression in RC cell lines. Total extracts from cells shown in A were analyzed by Western blotting with anti-folliculin antibody. Bands of ≈ 66 -kDa folliculin are absent in Nihon rat RC cells (NR32 and 45). Results of Western blot analysis for β -actin are shown below as a control.

第4章 “Nihon ラット” の自然史

4-1 はじめに

著者らは“Nihon ラット”の病因遺伝子を同定するための最初のステップとして、第2章においてマッピング（ラット10番染色体）に成功し^{2,2)}、そして、第3章において病因遺伝子を単離し、“Nihon ラット”がヒトBHD症候群のラットホモログであることを見出した^{3,1)}。一方、Eker ラットは先にも述べたように、ヒト結節性硬化症(*Tsc2*)のラットホモログであるが、共通の表現型は腎癌のみ（ヒト結節性硬化症は腎臓に主に血管筋脂肪腫である。）であり、Eker ラットでは2年間長期観察すると脾臓の血管肉腫、子宮に平滑筋腫および平滑筋肉腫、ならびに下垂体腫瘍が高率にみられる^{1,1)}。また、最近、ヒト結節性硬化症と共通の表現型として脳病変も報告されている^{3,2)}。

本章では、Eker ラットで実施したように、“Nihon ラット”を長期観察することにより、現在までのヒトBHD症候群との共通する表現型である腎癌以外の病変、あるいは、ヒトBHD症候群でみられる腎腫瘍以外の毛包の過誤腫および自然気胸等の病変がみられるかどうかについて、さらに、“Nihon ラット”では腎癌以外に発生する病変が存在するの否かを確認する目的で、“Nihon ラット”の *natural history* を病理組織学的に観察した。本章においては、ラットの寿命である2年間を予定して実施したが、本文中にも記載したように“Nihon ラット”は1年齢近くから死亡あるいは瀕死期例がみられ始めたため、当初の予定を変更し、55 (F3代) および68 (F2代) 週齢で全例剖検した。

4-2 材料および方法

動物は“Nihon ラット”の兄妹交配（ヘテロ接合体同士、およびヘテロ接合体×正常ホモ接合体）より得られたF2代およびF3代で、雄118例、雌110例の合計228例（**実験群Ⅰ**）と繁殖・維持している“Nihon ラット”のうち若齢時の“Nihon ラット”103例および正常ラット49例（Wild type）（**実験群Ⅱ**）である（**Table 1**）。

動物は温度21~25℃、湿度45~65%、換気回数20回/時間に設定されたげっ歯類の動物室で、アルマイト製ケージに個別に収容して長期間飼育した。餌は市販の固型基礎飼料（CR-LPF、オリエンタル酵母工業株）を、飲料水は吹田市水道水を蒸気加圧滅菌して自由摂取させた。死亡および瀕死期殺処分例を含む全例について、剖検の後、全身臓器を10%中性緩衝ホルマリン液に固定した。固定後、常法に従って脳、脊髄、心臓、大動脈、肝臓、脾臓、肺、腎臓、胃、十二指腸、空腸、回腸、盲腸、結腸、直腸、膵臓、腸間膜リンパ節、膀胱、胸腺、副腎、下垂体、甲状腺/上皮小体、気管、食道、唾液腺、舌、精巣、精巣上体、前立腺、精囊、卵巣、子宮、膣、

胸骨/胸骨骨髓、大腿骨/大腿骨骨髓、骨格筋、坐骨神経、皮膚、乳腺、眼球、ハーダー腺について切り出し、パラフィン包埋後、HE染色を施して光顕的に観察した。

子宮に病変のみられた一部の例についてはPASおよびコロイド鉄染色を、心臓に病変のみられた一部の例についてPAS染色を施して光顕的に観察した。

4-3 結果

1) 腎腫瘍の発症

“Nihon ラット”における腎腫瘍の発症は、肉眼的に早期より微細なシストを腎表面に認め、週齢とともに腎表面のシストおよび結節が確認でき、その後、生後半年ほど経過すると、シストの径も大きくなり充実性の白色から黄白色の結節が観察されるようになる。さらに週齢が進むと、大きな黄白色腫瘍とシストが多発し、最終的には腫瘍塊を形成した (Fig. 1)。

実験群 I において 10 ヶ月齢 (42 週齢) から死亡あるいは瀕死期動物がみられ始め、約 1 年齢を超えたころ (68 週齢) には 38 例 (16.7%) が死亡した。そこで、“Nihon ラット” および正常ラット (Wild type) の同一週齢の組織像を比較するために、55 および 68 週齢の時点で全例を安楽死・殺処分して剖検した。

死亡あるいは瀕死期動物の剖検において、38 例中 37 例に腎癌の発症がみられた。これら 37 例は、いずれも腎癌以外の重篤な病変を認めないことから、腎癌が死因と考えられた。残り 1 例は下垂体腫瘍がみられ、また、腎癌の発症もないことから、死因は下垂体腫瘍であり、正常ラット (Wild type) と考えられた。死亡例も含めた腎癌の発症は 226 例中 141 例 (雄:69 例、雌:74 例) にみられ、メンデルの法則にほぼ一致した発生率を示した (Table 2)。

2) 腎腫瘍の組織像

第 1 章と同様に腎腫瘍の組織型は、clear (ヒト腎細胞癌の 75%) / acidophilic cell type と basophilic で papillary な type (ヒトの腎細胞癌の約 15%) に分類でき、その組織像が、変異尿細管、異型過形成、腺腫、腺癌へと多段階的な発癌過程を示してみられた。

clear / acidophilic cell type では、未染色性の細胞質と小型の円形核をもった淡明な clear cell と好酸性の顆粒状の細胞質と小型の核をもった acidophilic cell の変異尿細管が早期像であり、その後、clear cell type、acidophilic cell type とともに週齢が進むにつれ、異型過形成、腺腫、腺癌へと多段階的な発癌過程を示した (Figs. 2, 3)。また、しばしば、両タイプが混合した mixed type もみられた。いずれも充実性に増殖していくと考えられた。clear / acidophilic cell type の起源はわかっていないが遠位尿細管からの移行像もみられることから distal tubule と考えられた³³⁾。

もうひとつのタイプである basophilic / papillary / type は、初期にはシステックな塩基性の変異尿細管としてみられ、clear / acidophilic cell type と同様に週齢が進むと乳頭状

に増殖した過形成となり、腺腫、腺癌へと多段階的な発癌過程を示していた (Fig. 4)。basophilic で papillary な type の起源は不明であるが、現在までのラット腎腫瘍の分類から近位尿細管が考えられる^{3,4)}。

両タイプともに癌化すると多彩な像を示した (オンコサイト様の細胞型、システイクに拡張した型、壊死、出血 (ヘマトイジン等)、石灰沈着) (Fig. 5)。

3) 腎癌以外の組織学的変化

それぞれの発生率を Table 3 に示す。

a) 腎癌内の異所性骨

腎腫瘍の組織学的な特徴は clear/acidophilic で solid な type と basophilic で papillary な type に分類されるが、clear/acidophilic で solid な type においてのみ腎癌内に骨形成がみられた。その発生率は 42/141 (29.8%) と高率であった。骨形成の組織像は、癌細胞に接して類骨の形成がみられ、骨芽細胞が周囲を被っているものから、周囲を厚い結合組織に囲まれるものまで様々であり、大きな骨形成の部分では骨髓腔を形成し、骨髓細胞を認めるものもみられた (Fig. 6)。

b) 心臓病変

実験群 II において、心臓に淡明化した心筋細胞の集簇からなる病変がみられた (Figs. 7A, 7B)。この病変は主に左右の心室と中隔壁内に散在性に認められ、正常心筋との境界は不明瞭であった。病変を形成する細胞の核は大型で、核内には明瞭な核小体を認め、細胞質は特徴的で空胞状に抜けて非染色性を示した。この抜けた細胞質は PAS 染色で一部陽性に染まることからグリコーゲン顆粒を満たしていると考えられた。まれに、クモの巣状 (spider cell) を示す細胞もみられた (Fig. 7B)。

このような心臓病変はヒトの結節性硬化症でみられる心筋の横紋筋腫に類似している。心臓の組織を経時的に観察したところ、興味あることに生後 30 週齢以下の腎癌をもつ “Nihon ラット” にのみに 15/103 (15%) みられた (Table 4)。

c) 子宮病変

子宮では子宮内膜上皮および子宮腺上皮の一部に腎腫瘍と同様の細胞質が空胞状で小型の円形核からなる細胞がみられた (Fig. 7C、変異上皮細胞。初期像と考えられる。)。その発生率は 20/72 (27.8%) と高率であった。その後、子宮内膜上皮および子宮腺上皮に同様の病変で多層化した異型過形成 (clear cell 過形成) へと進むと考えられた。

この過形成病変は萎縮した子宮、あるいは嚢胞性内膜過形成 (cystic endometrial hyperplasia) を示す子宮にもみられた。そして、1 例に内腔に突出した腺腫 (clear cell adenoma と診断) がみられた (Figs. 7D, 7E)。これらの clear cell は PAS 染色で一部顆粒状に陽性、コロイド鉄に陰性を示すことから、グリコーゲンと考えられた。

d) 唾液腺病変

唾液腺（顎下腺）の線状部円柱上皮の空胞化（clear cell 化）が 17/141（12.1%）にみられた（Fig. 7F）。

4-4 小括

本章は“Nihon ラット”に腎癌以外の腫瘍性病変の有無、さらに“Nihon ラット”特有の病変を見出すために“Nihon ラット”を長期飼育し、病理組織学的に検討した。

その結果、“Nihon ラット”における腎癌の発症は病理組織学的に変異尿細管から、異型過形成、腺腫、腺癌へと多段階的に進展していくことが明らかとなった（浸透率 100%）。腎癌の組織像は第 1 章でも述べたように、主に solid で clear/acidophilic cell type と papillary で basophilic cell type がみられた。腎癌以外には“Nihon ラット”特有と考えられる子宮内膜の clear cell 過形成／腺腫、若齢時における心筋横紋筋腫、さらに腎癌内の異所性骨形成、まれに唾液腺の線状部円柱上皮の clear cell 化を認めた。

子宮内膜癌はヒト婦人生殖器でもっとも多く認められる悪性腫瘍であり、この病変は子宮内膜腺癌（clear cell carcinoma）の前癌病変の可能性も考えられ、雌“Nihon ラット”を生涯飼育することにより、腺癌への発生を明らかにする必要がある。

心筋横紋筋腫の疫学および病因については今だわかっていない。ヒトでは、心筋横紋筋腫はしばしば結節性硬化症に随伴して認められるが、その横紋筋腫は自然消退する^{35, 36)}。この心筋横紋筋腫はしばしばブタとモルモット³⁷⁻³⁹⁾での報告があり、まれにイヌ⁴⁰⁾および羊⁴¹⁾で報告されているが、ラットでの報告はない⁴²⁾。

“Nihon ラット”に特有の病変と考えられ、今後詳細な検討が必要であろう。

腎癌内の異所性骨形成はまれであり、その確かなメカニズムはわかっていない⁴³⁻⁴⁶⁾。腫瘍内の骨形成に関するメカニズムの説明として、いくつか理論があり；腫瘍や周囲組織の化生や修復反応、腫瘍細胞自身の骨産生、あるいは以前に存在したムチンあるいは石灰化からの骨化等の仮説がある⁴⁷⁾。一方、著者らの知るかぎり、ラットにおける自然発生性腎細胞癌内の骨化生は 1 例のみである⁴⁸⁾。腎腫瘍内の骨形成に関するメカニズムを解明するには、さらなる検討が必要であろう。

これらの病変は SD 系ラットを含め、ラットでの報告はまれ、あるいは未報告の変化であり、“Nihon ラット”に特有の病変と考えられた。従って、これらの病変は“Nihon 遺伝子”の変異に伴い、あるいは関連して認められたと考えられる。“Nihon ラット”の病因遺伝子はヒトの BHD 症候群のラットホモログであることが同定されたが、ヒト BHD 症候群では毛包の過誤腫、腎腫瘍および自然気胸を特徴とする病変を生じる^{27, 29)}。本実験の結果からは、“Nihon ラット”との共通の表現型は腎癌のみであった。

以上のことから“Nihon ラット”はヒト BHD 症候群のラットモデルであり、BHD 症候群の腎癌発症の分子機構に基づいたヒト腎癌の予防と治療法の開発モデルとして大きく貢献すると期待される。さらに“Nihon ラット”に特有の病変である子宮内膜の clear cell 過形成/腺腫と唾液腺の線状部円柱上皮の clear cell 化、心臓の心筋横紋筋腫、ならびに癌内骨形成といった病変に関する研究にも有用であると考えられる。

図表

Parent		Experiment II	
Carrier male X Non-carrier female	Carrier male X Carrier female	Carrier female	Non-carrier male
		7	8
		27	6
		8	2
		8	2
		30	18

Table 1. Number of Animals Examined

Experiment I

Parent	Male	Female
Carrier male × Non-carrier female	65	58
Carrier male × Carrier female	53	50
Total	118	108

Experiment II

Age(Week)	Carrier male	Carrier female	Non-carrier male	Non-carrier female
9 - 13	19	7	8	11
14 - 26	23	27	6	11
27 - 39	—	8	2	—
40 - 52	5	—	—	5
53 <	6	8	2	4
Total	53	50	18	31

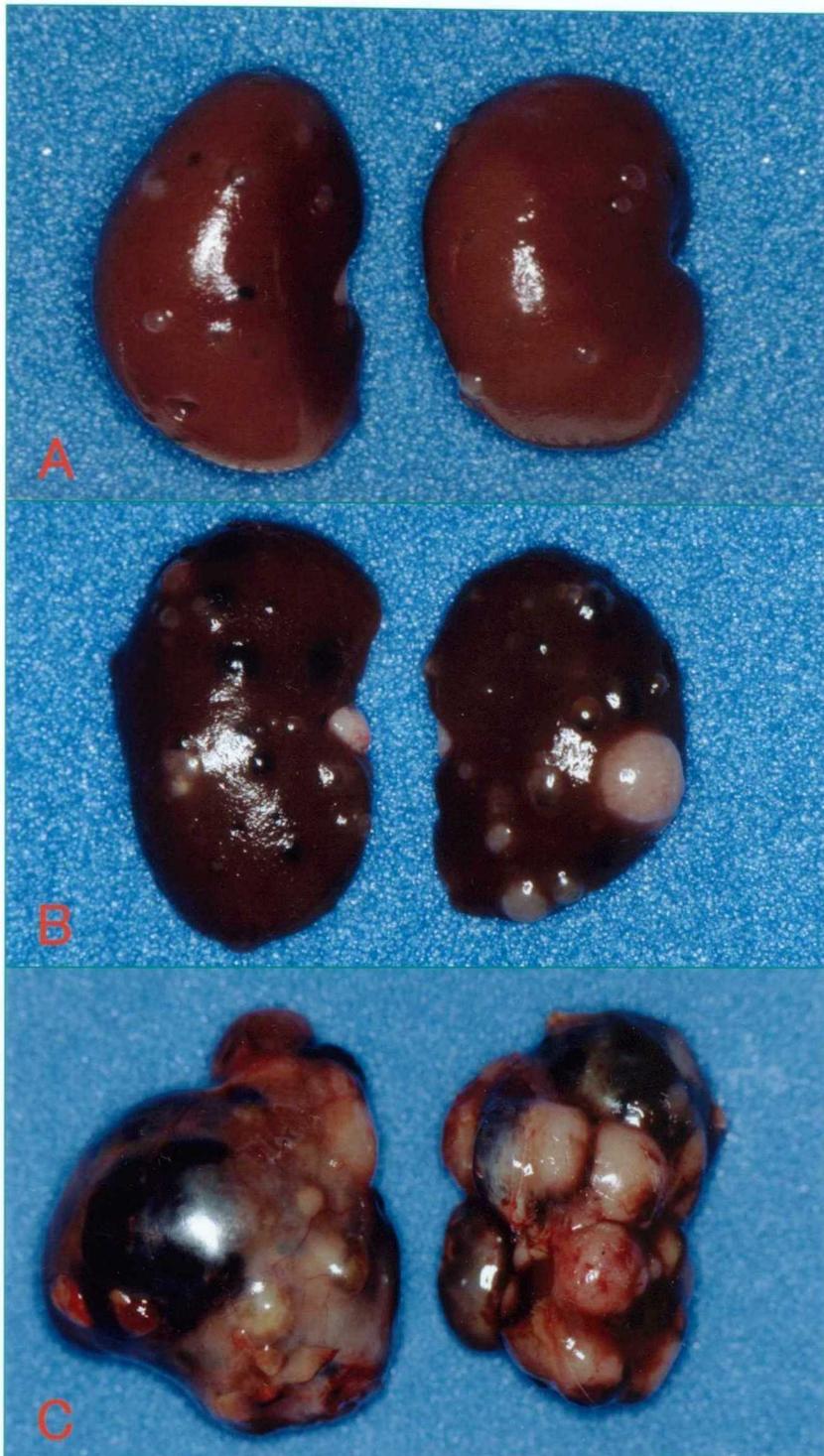


Fig. 1 Gross appearance of the Nihon rat

(A) Scattered cysts on the surface of the kidneys at 13 weeks of age.

(B) Multiple cysts and nodules at 26 weeks of age.

(C) Large masses and cysts at 49 weeks of age.

Table 2. Incidence of Renal Cell Tumors

Sex	Dead /Moribund	Sacrifice	Carrying male × Carrying female	Carrying male × Non-carrying female	Total
Male	23/23 (100%)	46/95 (48.4%)	35/53 (66.0%)	34/65 (52.3%)	69/118 (58.5%)
Female	14/15 (93.3%)	60/93 (64.5%)	37/52 (71.2%)	37/56 (66.1%)	74/108 (68.5%)
	37/38 (97.4%)	106/190 (55.8%)	72/105 (68.6%)	71/121 (58.7%)	143/226 (63.3%)

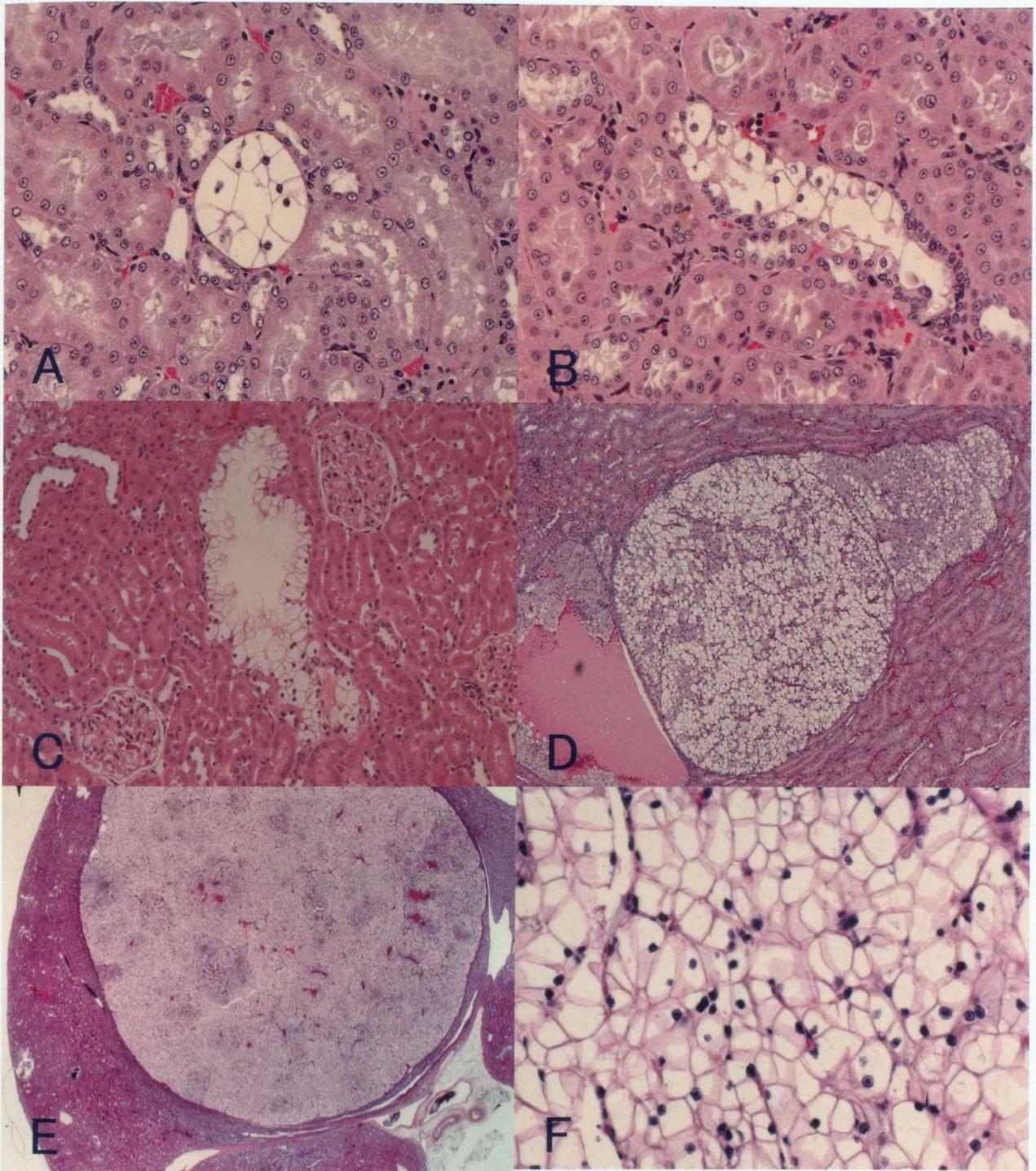


Fig. 2 Histology of the Nihon rat (solid, clear cell type)
 (A) Atypical tubule. HE stain $\times 160$. (B) The transverse section of the collecting duct was partly lined by clear cells. HE stain $\times 160$.
 (C) Atypical hyperplasia. HE stain $\times 20$. (D) Adenoma. HE stain $\times 38$.
 (E) Carcinoma. HE stain $\times 6$. (F) Carcinoma (at the higher magnification). HE stain $\times 280$.

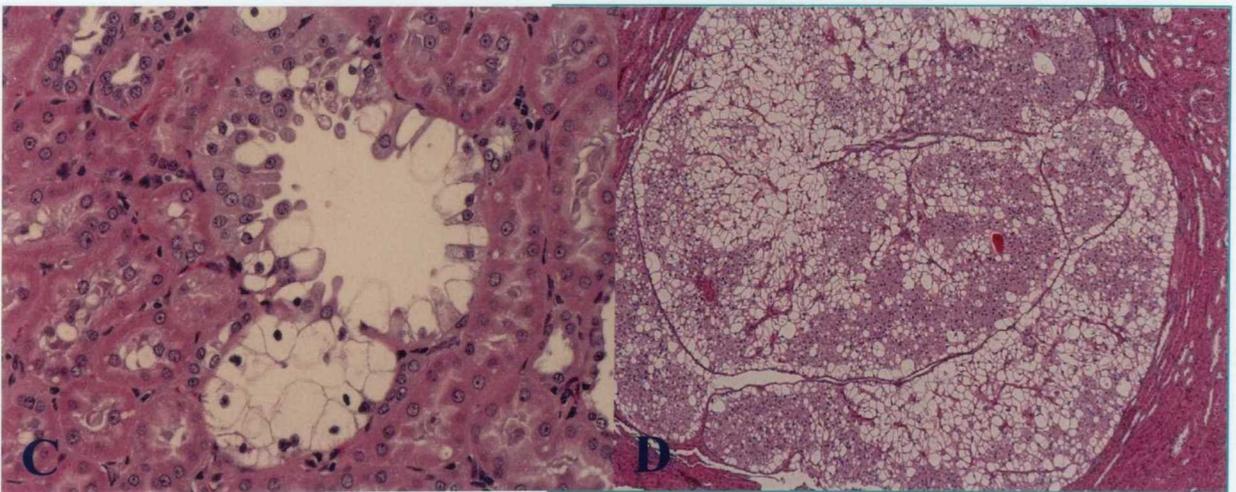
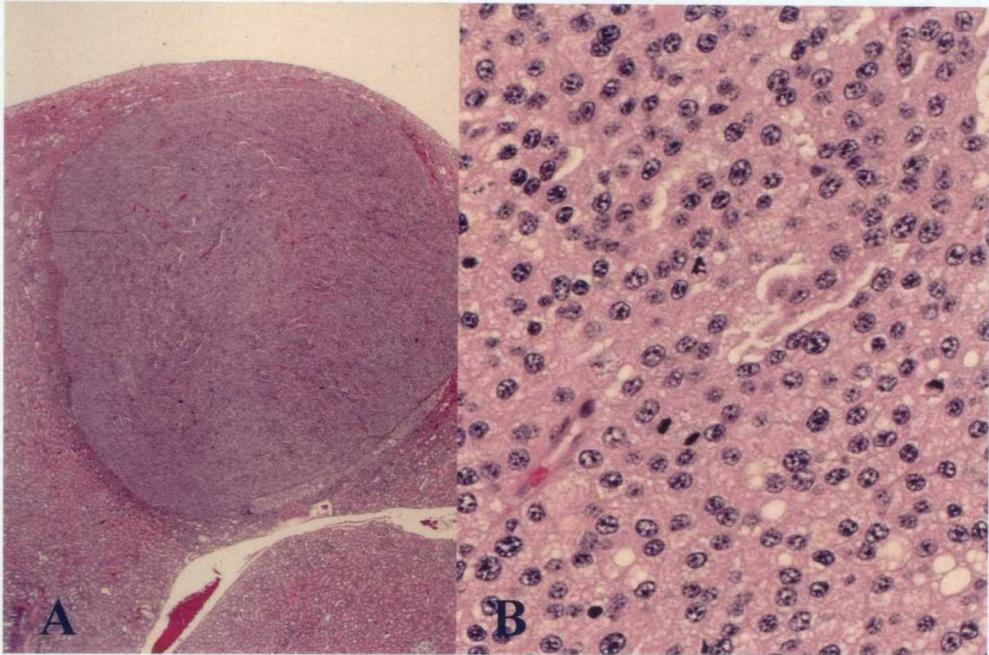


Fig. 3 Histology of the Nihon rat

(solid, acidophilic cell type & mixed cell type)

(A) Acidophilic cell adenoma. HE stain $\times 10$. (B) Adenoma (at the higher magnification). HE stain $\times 320$.

(C) Atypical tubule of mixed cell type. HE stain $\times 190$.

(D) Mixed cell adenoma .HE stain $\times 20$.

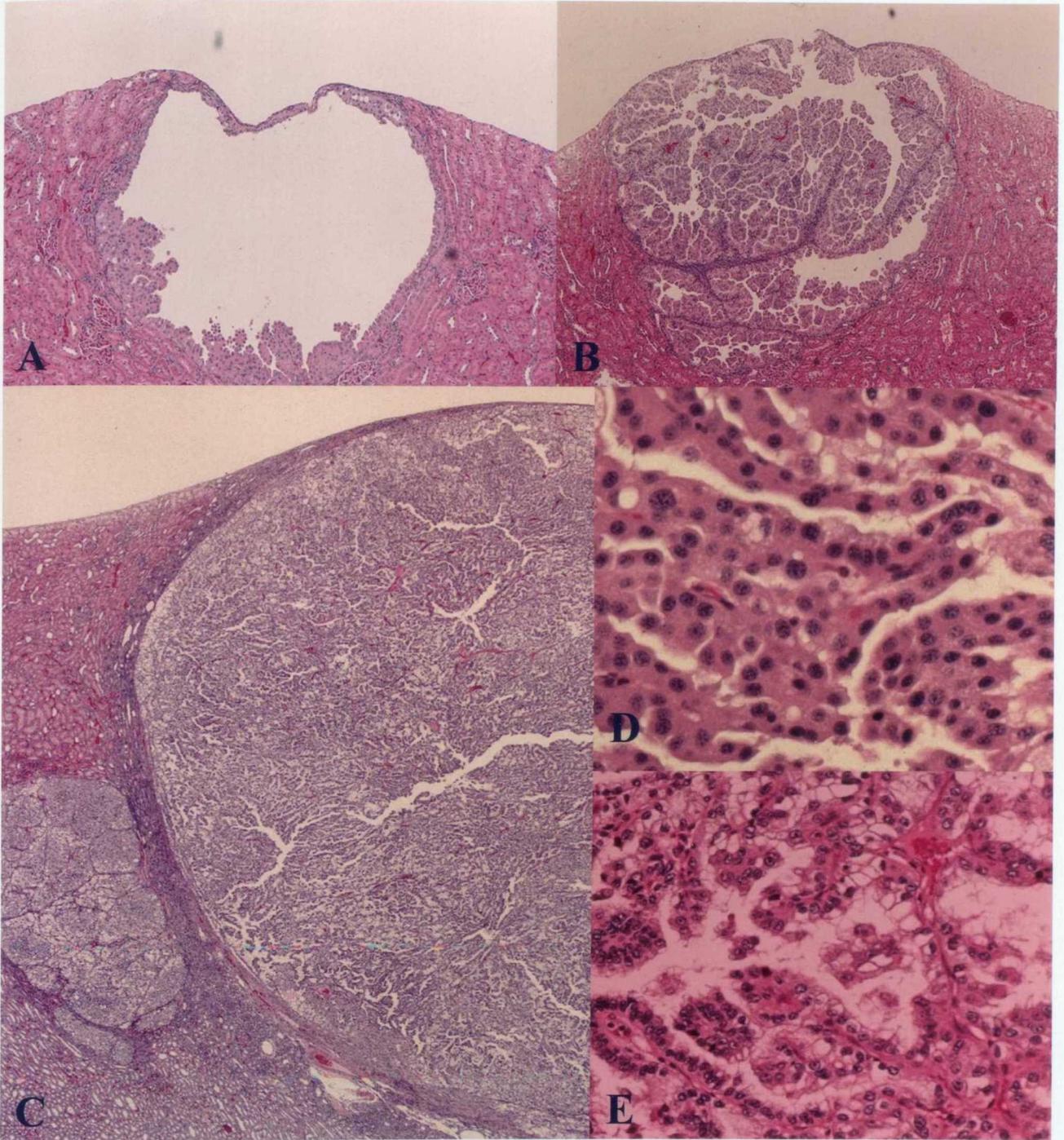


Fig. 4 Histology of the Nihon rat (papillary type)
 (A) Atypical tubule. HE stain $\times 160$. (B) Basophilic papillary adenoma. HE stain $\times 20$. (C) Basophilic papillary carcinoma. HE stain $\times 20$. (D) Basophilic papillary carcinoma (at the higher magnification). HE stain $\times 100$. (E) Mixed papillary carcinoma. HE stain $\times 100$.

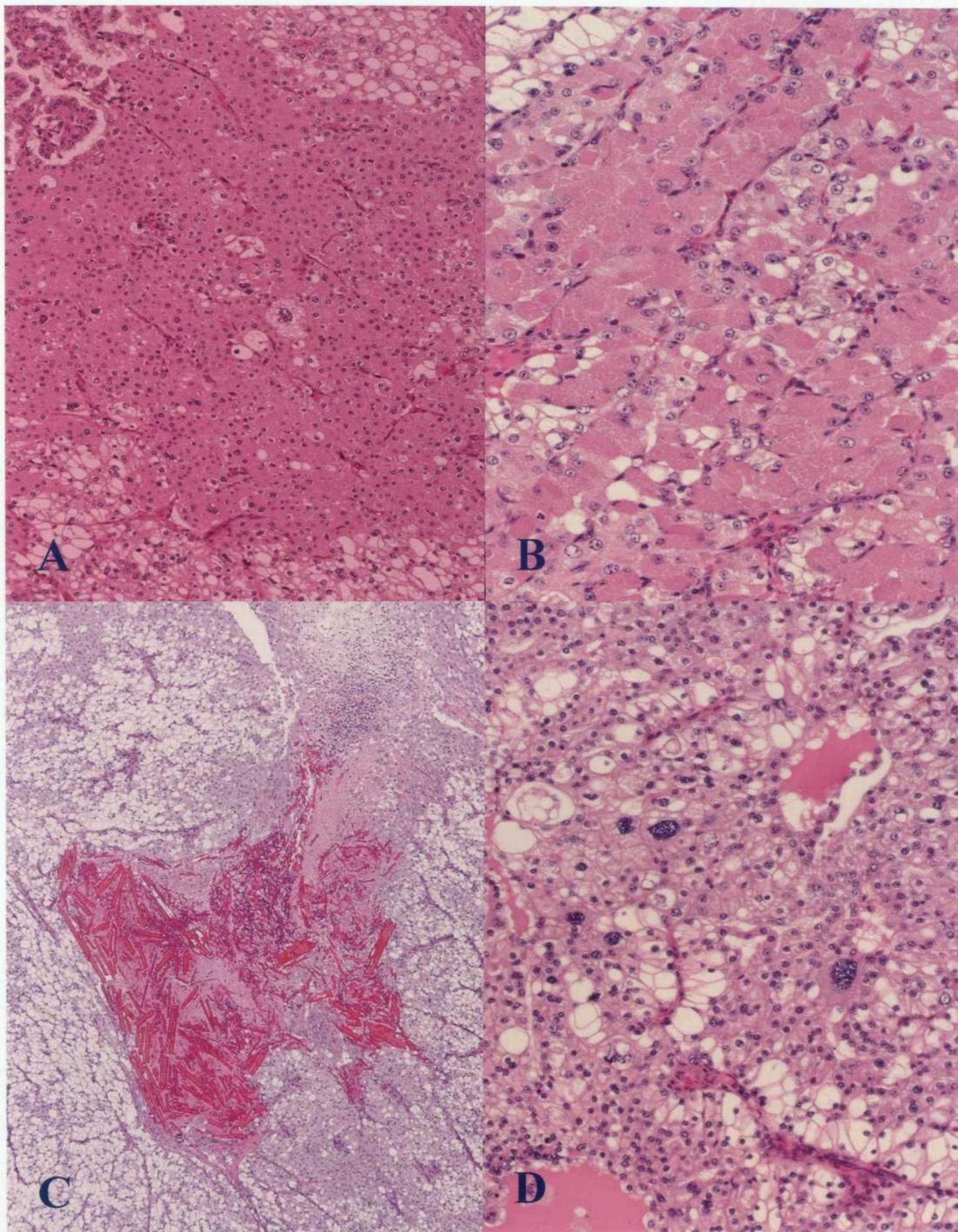


Fig. 5 Histology of the Nihon rat (malignancy)

(A)Oncocytic carcinoma. HE stain $\times 100$. (B) Oncocytic carcinom
(at the higher magnification). HE stain $\times 225$.

(C) Focal hemorrhage in carcinoma. HE stain $\times 55$.

(D) Note the marked cellular and nuclear pleomorphism. HE stain $\times 125$.

Table 3. The incidence of extra-renal tumors

Lesions	Male[118]		Female[108]		Total[226]	
	Carrier	Non-carrier	Carrier	Non-carrier	Carrier	Non-carrier
Kidney / renal carcinoma	69* (58.5)	49 (41.5)	72 (66.7)	36 (33.3)	141 (62.4)	85 (37.6)
Kidney / heterotopic ossification	23 / 69** (33.3)	0 / 49	19 / 72 (26.4)	0 / 36	42 / 141 (29.8)	0 / 85
Uterus / clear cell hyperplasia	NA	NA	20 / 72 (27.8)	0/36	20 / 72 (27.8)	0 / 36
Salivary gl. / Clear change	4 / 69 (5.8)	0 / 49	13 / 72 (18.1)	0/36	17 / 141 (12.1)	0 / 85

* : Values are number of animals lesions(%)

** :Number of animals lesions / Number of animals examined (%)

[] : Total number of animals examined.

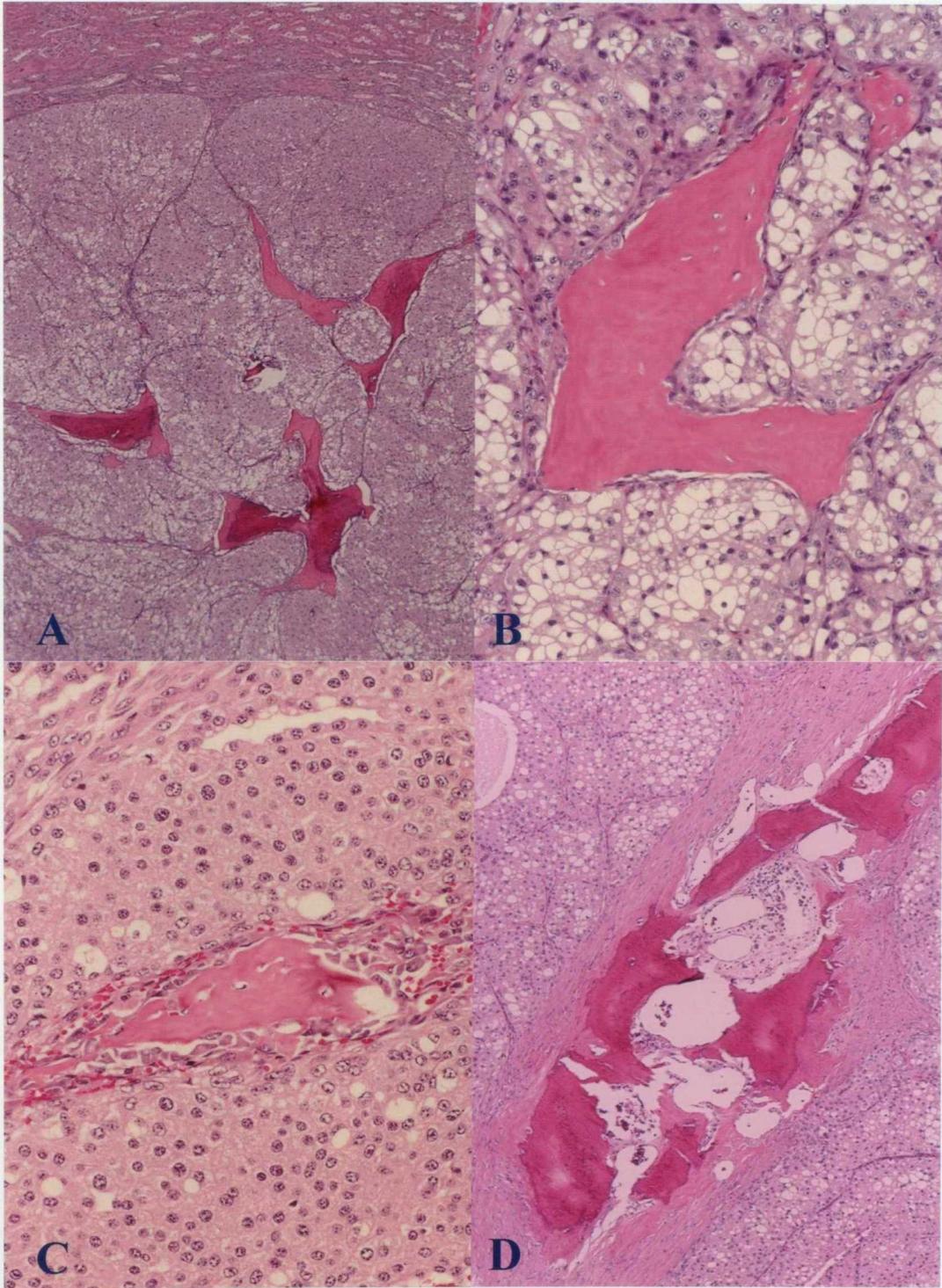


Fig. 6 Heterotopic ossification in a clear/acidophilic cell RCC
 (A) Multiple ossifications. HE stain $\times 40$. (B) Ossification (at the higher magnification). HE stain $\times 150$. (C) Heterotopic ossification were immature with osteoblasts surrounding irregularly deposited osteoid. HE stain $\times 330$. (D) Mature massive bone with bone narrow elements. HE stain $\times 60$.

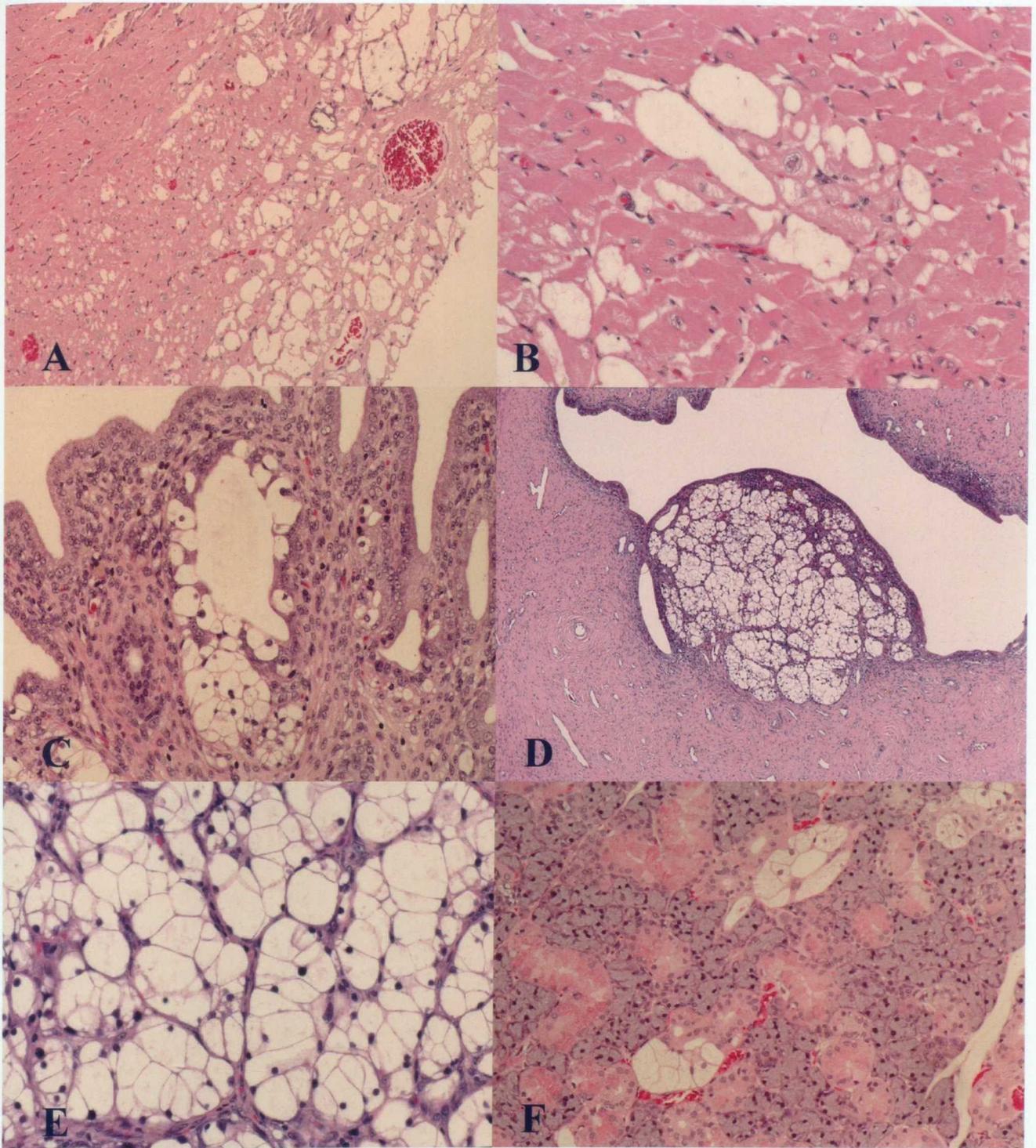


Fig. 7 Extra-renal primary lesions in the Nihon rat

(A) & (B) Cardiac rhabdomyoma. HE stain $\times 100$ (A) , $\times 220$ (B).

(C) , (D) & (E) Clear cell hyperplasia/adenoma of the endometrium.

HE stain $\times 210$ (C) , $\times 19$ (D), $\times 260$ (E).

(F) Clear cell change of the epithelium of striated portions of salivary gland.

HE stain $\times 150$.

Table 4. Incidence of Rhabdomyomatosis

Age(Week)	Carrier male	Carrier female	Non-carrier male	Non-carrier female
9 - 13	7/19	2/7	0/8	0/11
14 - 26	2/23	2/27	0/6	0/11
27-39	—	2/8	0/2	—
40-52	0/5	—	—	0/5
53<	0/6	0/8	0/2	0/4
Total	9/53	6/50	0/18	0/31
	(9/42, 21.4%)	(6/42, 14.3%)		

第5章 総括

ヒト腎細胞癌 (Renal cell carcinoma) は、腎に発生する原発性腫瘍の中でもっとも多く、約90%を占めており、すべての癌の約2%を占め、また、米国においては、癌による死亡の原因として7番目に多く、成人における悪性腫瘍の3%を占めている²⁾。これまでに、ヒトの腎癌の発症と進展に関与する遺伝子として、*VHL* (von Hippel-Lindau病) 遺伝子、*c-Met* 遺伝子、*FH* (fumarate hydratase) 遺伝子、*Tsc1* (Tuberous sclerosis) 遺伝子や*Tsc2* 遺伝子が明らかにされており、腎癌の発症メカニズムの解明や遺伝子治療などの研究が行われている⁵⁾。その研究にはラット等の疾患モデルを用いた研究が不可欠であるが、現在までのところ腎癌の自然発症ラットモデルは、1954年ノルウェーのEkerによって見出されたEkerラットのみであり、さらなる疾患モデル動物の開発が待たれるところであった。

著者らは毒性試験のために飼育していたSprague-Dawley (SD) 系ラットの中に腎癌を自然発症するものを偶然見出し、この癌が遺伝性であることを確認し、“Nihonラット”と命名し、さらに腎癌発症の病因遺伝子について遺伝子生物学的研究を行った。

“Nihonラット”の発見は、同一の繁殖場から購入した7~16週齢の若齢SD系ラット群の343例中15例に認められたのが最初であるが、その後、同一の繁殖場から雌2例の元親を得て大日本製薬 安全性研究所の施設内で繁殖・交配を開始した。繁殖・交配の成績から“Nihonラット”は、Ekerラットと同様にメンデルの法則に従った単一遺伝子の変異による常染色体優性遺伝形式をとる遺伝性腎癌モデルであると考えられた。“Nihonラット”およびEkerラットの腎癌の組織表現型を比較した場合、Ekerラットでは肉眼的に明瞭な結節は8ヶ月齢になるまで認められず、組織学的には生後約2ヶ月から変異尿細管 (phenotypically altered renal tubules) が出現し始め、この病巣は腺管構造を示すtubular typeと、特別な構造をつくらないcompact typeに分けられ、この2つのタイプの変異尿細管が過形成腺腫を経て癌腫になる¹¹⁾。その細胞起源は、多くは刷子縁 (brush border) をもつ正常尿細管との移行像がみられることから、腫瘍の大部分が近位尿細管由来と考えられている¹¹⁾。一方、“Nihonラット”は、肉眼的に6週齢には腎表面にシストを認め、組織学的に過形成腺管は4週齢から認められ、腺腫および腺癌へと進行していき、さらに、Ekerラットにはみられない淡明細胞型 (clear cell type) が優位に観察されるという点がEkerラットとは異なる特徴であった。また、ヒト腎癌の病因遺伝子として同定されている*Tsc1*、*Tsc2*、*VHL* 遺伝子および*c-Met* 遺伝子の遺伝的解析においても変異は見出せなかった²⁰⁾。

このように“Nihonラット”はEkerラットとは異なる表現型 (発生時期および組織像の相違) を示し、Ekerラットの病因遺伝子である*Tsc2* 遺伝子変異が見出せないことから、新規の腎癌モデルラットであることが強く示唆された。

そこで、“Nihonラット”の病因遺伝子を探索するための遺伝子生物学的研究として、最初に腎癌の病因候補遺伝子 (*Nihon* 遺伝子と命名した。) を探索するため

に 113 例の戻し交配ラットを用いて、マイマイクロサテライト DNA マーカーを用いた PCR 法による連鎖解析を実施した。

その結果、“Nihonラット”の病因遺伝子はラット染色体10番の*interleukin-3 (IL3)* 遺伝子(ヒト染色体5番長腕23-31) ($\chi^2=93.6$ 、ロッド値=25.16)、*lethal (2) giant larvae (Llgl 1)* 遺伝子(ヒト染色体17番短腕11.2) ($\chi^2=109.0$ 、ロッド値=31.56)、および*myosin heavy chain, embryonic skeletal muscle (MYHSE)* 遺伝子(ヒト染色体17番短腕13.1) ($\chi^2=90.6$ 、ロッド値=23.87) の間にマップされ、それぞれの距離は4.4cM、0.9cMおよび5.3cMを示し、ラット染色体10番の遠位部に位置し、*IL3* 遺伝子と *Llgl 1* 遺伝子の間に局在していることがわかった。但し、“Nihonラット”の病因遺伝子がヒト染色体5番か、17番に合致するかは不明であった^{2,2)}。

マッピングに引き続き、染色体地図の作成とポジショナル・クローニング(位置候補遺伝子探索)法による染色体領域の特定、さらに特定した染色体領域における、腎癌の有力な病因性候補遺伝子の一つと考えられる *BHD* ホモログ遺伝子の単離と変異の解析を実施した。

マッピングされた“Nihonラット”の病因遺伝子の局在する染色体10番の相同領域は、マウスでは染色体11番で、ヒトでは染色体5番、1番、17番に相当していた。その領域の遺伝子における多型性の検討で、*Q9DCE9* 遺伝子と *COPS3* 遺伝子で0組み換え率まで絞られた。そして、ついに *germ-line mutation* を見出した。“Nihonラット”の病因遺伝子はヒト染色体17番短腕11.2の領域に存在する *BHD* 遺伝子のラットホモログであった。その変異は一塩基挿入を原因とする *BHD* 遺伝子の生殖細胞に変異を見出した。一塩基挿入の結果、フレームシフト変異が生じ、下流26アミノ酸で終止コドンを生じ、大半のアミノ酸が欠損していた。また、腎細胞癌(11例中10例)に *BHD* 遺伝子で LOH (ヘテロ接合体の消失) が高率に認め、さらに LOH を認めなかった1例においても点変異(ナンセンス変異)を発見し、Knudsonの2ヒット説の適応が確認された。従って、“Nihonラット”は腎発癌に関連し、ヒト *BHD* 症候群の動物モデルとなる新規のがん抑制遺伝子として有用なモデルと考えられた^{3,2)}。

最後に“Nihonラット”に腎癌以外の腫瘍性病変の有無、さらに“Nihonラット”特有の病変を見出すために“Nihonラット”を長期飼育し、病理組織学的に検討した。

その結果、“Nihonラット”における腎癌の発症は変異尿細管から、異型過形成、腺腫、腺癌へと多段階的に進展していくことが明らかとなった(浸透率100%)。腎癌の組織像は、主に solid で clear/acidophilic cell type と papillary で basophilic cell type がみられた。腎癌以外には“Nihonラット”特有と考えられる子宮内膜の clear cell 過形成/腺腫、若齢時における心筋横紋筋腫、さらに腎癌内の異所性骨形成、まれに唾液腺の線状部円柱上皮の clear cell 化を認めた。

子宮内膜癌はヒト婦人生殖器でもっとも多く認められる悪性腫瘍であり、clear cell 過形成／腺腫が子宮内膜腺癌 (clear cell carcinoma) の前癌病変とも考えられ、“Nihon ラット” は子宮内膜腺癌の発生を明らかにするモデルになる可能性があると考えられた。

心筋横紋筋腫の疫学および病因については今だわかっておらず、ヒトでは、しばしば結節性硬化症に随伴して認められ、自然消退する。動物において、この心筋横紋筋腫はしばしばブタとモルモットでの報告があり、まれにイヌおよび羊でも報告されているが、ラットでの報告はない。“Nihon ラット” に特有の病変と考えられ、今後詳細な検討が必要と考えられた。

腎癌内の異所性骨形成はまれであり、その正確なメカニズムはわかっていない。腫瘍内の骨形成に関するメカニズムとして、いくつか理論があり；腫瘍や周囲組織の化生や修復反応、腫瘍細胞自身の骨産生、あるいは以前に存在したムチンあるいは石灰化からの骨化等の仮説がある。一方、著者らの知るかぎり、ラットにおける自然発生性腎細胞癌内の骨化生は1例のみである。以上より、“Nihon ラット” は腫瘍内の骨形成のメカニズムを解明するのに有用なモデルと考えられた。

以上、子宮内膜の clear cell 過形成／腺腫、若齢時における心筋横紋筋腫、さらに腎癌内の異所性骨形成、まれに唾液腺の線状部円柱上皮の clear cell 化は SD 系ラットを含め、ラットでの報告はまれ、あるいは未報告の変化であり、“Nihon ラット” に特有の病変であった。従って、これらの病変は“Nihon 遺伝子”の変異に伴い、あるいは関連して生じた病変と考えられた。“Nihon ラット”の病因遺伝子はヒトの BHD 症候群のラットホモログであることが同定されたが、ヒト BHD 症候群では毛包の過誤腫、腎腫瘍および自然気胸を特徴とする病変を生じる。本実験の結果からは、“Nihon ラット”との共通の表現型は腎癌のみであった。

“Nihon ラット”の腎癌は、メンデルの法則に従った常染色体優性遺伝形式をとり、その組織像は Eker ラットのそれよりもヒトで多く認められる clear cell type に類似し、また病変の発生がより早期に認められる特徴を持つ。“Nihon ラット”の腎癌の病因候補遺伝子“Nihon 遺伝子”は、ラット染色体 10 番の遠位部に局在し、その遺伝子として *Bhd* ホモログ遺伝子が有力であった。“Nihon ラット”の *Bhd* ホモログ遺伝子には一塩基挿入による生殖細胞系列の変異が存在し、本ラットの腎癌細胞にはヒトと同様に *BHD* 遺伝子の LOH (ヘテロ接合体の消失) が認められることから、“Nihon ラット”は Knudson の 2 ヒット説を実証するモデルであると考えられた。

以上のことから、“Nihon ラット”はヒト BHD 症候群のラットモデルとなり、*BHD* 遺伝子機能や腎癌の発生とがん抑制遺伝子の関連について、有用な情報を提供するものと考えられ、ヒトの癌化機構の解明や遺伝子治療の開発に大きく寄与すると考

えられる。さらに“Nihon ラット”に特有の病変である子宮内膜の clear cell 過形成／腺腫と唾液腺の線状部円柱上皮の clear cell 化、心臓の心筋横紋筋腫症、ならびに癌内骨形成といった病変に関する研究にも有用であると考えられる。

謝辞

本研究に対して、終始ご指導とご助言を戴いた麻布大学 生物科学総合研究所 代田欣二教授、同大学 獣医学部 分子生物学研究室 村上 賢教授、同大学 動物応用科学動物工学研究室 滝沢達也教授に厚くお礼申し上げます。また、本研究を進めるにあたり、実験の場の提供とご助言を賜った癌研究会 癌研究所 実験病理部/順天堂大学医学部 病理学第2 樋野興夫教授、同研究所 実験病理部/同大学医学部 病理学第2 小林敏之講師、同研究所 実験病理部 櫻井純子所員、平山裕子所員、三谷弘明所員、大日本製薬 安全性研究所 安場正子 所長および同研究所 安全性研究グループ 田中浩二グループマネージャー、河内眞美 病理グループ研究員ならびに松本泉美 病理グループ研究員をはじめ関係各位に感謝致します。

本論文の一部は、第 59 回日本癌学会総会 (2000、10)、第 60 回同学会総会 (2001、10)、および第 62 回同学会総会 (2003、9)、ならびに第 19 回日本毒性病理学会 (2003、1) にて発表し、*Jpn. J. Cancer Res.* (vol.91, 2000 および vol.92, 2001)、*Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America (PNAS, vol.101, No.7 2004)* および *Current Molecular Medicine (CMM vol.4, No.3 2004)* に掲載された。

引用文献

1. 森脇和郎、山村研一編集、米川博通.モデル動物の作製と維持、2004；株式会社エル・アイ・シー.
2. Godley,P.A. and Taylor, M. Renal cell carcinoma. *Curr Opin Oncol*, 2001;13: 199-203.
3. Jemel, A., Thomas, A., Murray, T. and Thun, M. Cancer statistics. *CA Cancer J Clin*, 2002;52:23-47.
4. 厚生労働省大臣官房統計情報部.平成16年 人口動態統計の年間推計.
5. 執印太郎、蘆田真吾、奥田平和、鎌田雅行.ヒト腎細胞癌の遺伝子異常－遺伝性腎細胞癌との関連から.内科.2003；92：116－119.
6. Eker R, Mossige J. A dominant gene for renal adenomas in the rat. *Nature* 1961; 189:858-859.
7. Hino O, Mitani H, Nishizawa M, Katsuyama H, Kobayashi E, Hirayama Y. A novel renal cell carcinoma susceptibility gene maps on chromosome 10 in the Eker rat. *Jpn J Cancer Res* 1993; 84:1106-1109.
8. Hino O, Kobayashi T, Tsuchiya H, Kikuchi Y, Kobayashi E, Mitani H, Hirayama Y. The predisposing gene of the Eker rat inherited cancer syndrome is tightly linked to the tuberous sclerosis (*TSC2*) gene. *Biochem Biophys Res Commun* 1984; 203:1302-1308.
9. Kobayashi T, Hirayama Y, Kobayashi E, Kubo Y, Hino O. A germline insertion in tuberous sclerosis(*Tsc2*) gene gives rise to the Eker rat model of dominantly inherited cancer. *Nat Genet* 1995; 9:70-74.
10. Yeung RS, Xiao GH, Jin F, Lee W-C, Testa JR, Knudson AG. Predisposition to renal carcinoma in the Eker rat is determined by germ-line mutation of the tuberous sclerosis 2 (*TSC2*) gene. *Proc Natl Acad Sci USA* 1994; 90:11413-11416.
11. 樋野興夫.遺伝性腎癌ラットとその臨床病理学的特徴.日本臨床.2000；58：69－75.
12. Kobayashi T, Urakami S, Hirayama Y, Yamamoto T, Nishizawa M, Takahara T, Kubo Y, Hino O. Intragenic *Tsc2* somatic mutations as Knudson's second hit in spontaneous and chemically induced renal carcinomas in the Eker rat model. *Jpn J Cancer Res* 1997; 88:254-261.
13. Urakami S, Tokuzen R, Tsuda H, Igawa M, Hino O. Somatic mutation of the tuberous sclerosis (*TSC2*) tumor suppressor gene in chemically induced rat renal carcinoma cell. *J Urol* 1997; 158:275-278.
14. Satake N, Urakami S, Hirayama Y, Izumi K, Hino O. Biallelic mutations of the *Tsc2* gene in chemically induced rat renal cell carcinoma. *Int J Cancer* 1998;

77:895-900.

- 1 5. Satake N, Kobayashi T, Kobayashi E, Izumi K, Hino O. Isolation and characterization of a rat homologue of the human tuberous sclerosis 1 gene (*Tsc1*) and analysis of its mutations in rat renal carcinomas. *Cancer Res* 1999; 59:849-855.
- 1 6. Kikuchi Y, Kobayashi E, Nishizawa M, Hamazaki S, Okada S, Hino O. Cloning of the rat homologue of the von Hippel-Lindau tumor suppressor gene and its non-somatic mutation in rat renal cell carcinomas. *Jpn J Cancer Res* 1995; 86:905-909.
- 1 7. Everitt JI, Glodsworthy TL, Wolf DC, Walker CL. Hereditary renal cell carcinoma in the Eker rat: a rodent familial cancer syndrome. *J Urol* 1992; 148:1932-1936.
- 1 8. Hino O, Fukuda T, Satake N, Kobayashi T, Honda S, Orimoto K, Yamashita Y, Kikuchi Y. *Tsc2* gene mutant (Eker) rat model of a Mendelian dominantly inherited cancer. *Prog Exp Tumor Res* Basel, Karger 1999; 35:95-108.
- 1 9. Bannasch P & Zerban H. In *Tumors and tumor-like conditions of the kidneys and Ureters*. ed. Eble JN, Livingstone, New York. 1990; 1-34.
- 2 0. Okimoto K, Kouchi M, Kikawa E, Toyosawa K, Koujitani T, Tanaka, Matsuoka N, Sakurai J, Hino O. A novel "Nihon" rat model of a Mendelian dominantly inherited renal cell carcinoma. *Jpn J Cancer Res* 2000; 91:1096-1099.
- 2 1. Kouchi M, Okimoto K, Kikawa E, Toyosawa K, Koujitani T, Kuroki K, Tanaka K, Matsuoka N, Hino O. "Nihon rat", a novel rat model for renal cell carcinoma. *Proc Jpn Soc Animal Models Human Dis* 2001; 17:16-19.
- 2 2. Hino O, Okimoto K, Kouchi M, Sakurai J: A novel renal carcinoma predisposing gene of the Nihon rat maps on chromosome 10. *Jpn J Cancer Res* 2001, 92:1147-1149.
- 2 3. Schmidt LS, Warren MB, Nickerson ML, Weirich G, Maatsova V, Toro JR, Turner ML, Duray P, Merino M, Hewitt S, Pavlovich CP, Glenn G, Greenberg CR, Linehan WM, Zbar B. Birt-Hogg-Dubé syndrome, a genodermatosis associated with spontaneous pneumothorax and kidney neoplasia, maps to chromosome 17p11.2. *Am J Hum Genet* 2001; 69:876-882.
- 2 4. Khoo S, Bardley M, Wong FK, Hedblad MA, Nordenskjold M, The BT. Birt-Hogg-Dubé syndrome; mapping of a novel hereditary neoplasia gene to chromosome 17p12-q11.2. *Oncogene* 2001; 5239-5242.

- 2 5 . Hino O, Klein-Szanto AJP, Freed JJ, Testa JR, Brown DQ, Vilensky M, Yeung RS, Tartof KD & Knudson AG. Spontaneous and radiation-induced renal tumors in the Eker rat model of dominantly inherited cancer. *Proc.Natl. Acad. Sci.USA.* 1993; 90:327-331.
- 2 6 . Fukuda T, Tani Y, Kobayashi T, Hirayama Y & Hino O. A new western blotting method using polymer immunocomplexes: detection of Tsc1 and Tsc 2 expression in various cultered cell lines. *Analytical Biochemistry* 2000; 285:274-276.
- 2 7 . Nickerson ML, Warren MB, Toro JR, Matrosova V, Glenn G, Turner ML, Duray P, Merino M, Choyke P, Pavlovich CP, Sharma N, Walther MM, Munroe D, Hill R, Maher E, Grennberg C, Lerman ML, Linehan WM, Zbar B & Schmidt LS. Mutations in a novel gene lead to kidney tumors, lung wall defects, and benign tumors of the hair follicle in patients with the Birt-Hogg-Dube. *Cancer Cell* 2002; 2:157-164.
- 2 8 . Streisinger G, Okada Y, Emrich J, Newton J, Tsugita A, Terzaghi E & Inouye M. Frameshift mutations and the genetic code. This paper is dedicated to Professor Theodosinus Dobzhansky on the occasion of his 66th birthday. *Cold Spring Harbor Symp.Quant. Biol.* 1966; 31:77-86.
- 2 9 . Birt AR, Hogg GR and Dubé WJ. Hereditary multiple fibrofolliculomas with trichodiscomas and acrochordons. *Arch. Dermatol.* 1977; 113:1674-1677.
- 3 0 . Lingaas F, Comstock KE, Kirkness EF, Sorensen A, Aarskaug T, Hitte C, Nickerson ML, Moe L, Schmidt LS, Thomas R, Breen M, Galibert F, Zbar B, and Ostrander EA. A mutation in the canine BHD gene is associated with hereditary multifocal renal cystadenocarcinoma and nodular dermatofibrosis in the German Shepherd dog. *Hum. Mol. Genet.* 2003; 12:3043-3053.
- 3 1 . Okimoto K, Sakurai J, Kobayashi T, Mitani H, Hirayama Y, Nickerson ML, Warren MB, Zbar B, Schmidt LS, and Hino O. Agerm-line insertion in the Birt-Hogg-Dubé (BHD) gene gives rise to the Nihon rat model of inherited renal cancer. *PNAS.* 2004; 101:2023-2027.
- 3 2 . Mizuguchi M, Takashima S, Yamanouchi H, Nakazato Y, Mitani H, and Hino O. Novel cerebral lesions in the Eker rat model of tuberous sclerosis: cortical tuber and anaplastic ganglioglioma. *J. Neuropathol. Exp. Neurol.* 2000; 59: 188-196.
- 3 3 . Nogueira E, Klimek F, Weber E, Bannasch P. Collecting duct origin of rat renal clear cell tumors. *Virchows Archiv B Cell Pathol* 1989; 57:275-283.
- 3 4 . Dietrich DR, Swenberg JA. Preneoplastic lesions in rodent kidney induced spontaneously or by non-genotoxic agents: predictive nature and comparison to lesions induced by genotoxic carcinogens. *Mutation Research* 1991; 248:239-260.

- 3 5. Burke AP, Virmani R. Tumors of the heart and great vessels: In Atlas of Tumor Pathology. Washinton DC. Armed Forces Institute of Pathology 1996; 55-61.
- 3 6. Takahashi M, Iwata S, Matsuzawa H, Fujiwara H. Pathological findings of cardiac rhabdomyomatosis in the guniea pig. *Exp Anim* 1985;34:417-424.
- 3 7. McEwen BJE. Congenital cardiac rhabdomyomas in red wattle pigs. *Can Vet J* 1994; 35:48-49.
- 3 8. Tanimoto T, Phtsuki Y. The pathogenesis of so-called cardiac rhabdomyoma in swine: a histological, immunohistochemical and ultrastructural study. *Virchows Arch* 1995; 427:213-221.
- 3 9. Omar AR. Congenital cardiac rhabdomyoma in a pig. *Path vet* 1969; 6:469-474.
- 4 0. Kizawa K, Furubo S, Sanzan T, Kawamura Y, Narama I. Cardiac rhabdomyoma in a beagle dogs. *J Toxicol Pathol* 2002; 15:69-72.
- 4 1. Bradley R, Wells GA. Ovine and porcine so-called cardiac rhabdomyoma (Hamartoma). *J Comp Path* 1980; 90:551-558.
- 4 2. Hoch-Ligeti C, Restrepo C, Stewart HL. Comparative pathology of cardiac neoplasms in humans and in laboratory rodents: a review. *JNCL* 1986;76:127-142.
- 4 3. Macke RA, Hussain MB, Imray TJ, Wilson RB, Cohen SM: Osteogenic and sarcomatoid differentiation of a renal cell carcinoma. *Cancer* 1985;56:2452-2457.
- 4 4. Cribbs RK, Ishaq M, Arnold M, O'Brien J, Lamb J, Frankel WL. Renal cell carcinoma with massive osseous metaplasia and bone marrow elements. *Annals of Diagnostic Pathology* 1999; 3:294-299.
- 4 5. Macke RA, Hussain MB, Imray TJ, Wilson RB, Cohen SM: Osteogenic and sarcomatoid differntiation of a renal cell carcinoma. *Cancer* 1985; 56:2452-2457.
- 4 6. Bielsa O, Liorreta J, Arango O, Serrano S, Gelabert-Mas A. Bone metaplasia in a case of bilateral renal cell carcinoma. *Urol Int* 2001; 66:55-56.
- 4 7. Haddad FS, Shah IA, Manné RK, Costantino JM, Somsin AA. Renal cell carcinoma insulated in the renal capsule with calcification and ossification. *Urol Int* 1993; 51:97-101.
- 4 8. Thurman JD, Turturro HA, Gaylor DW. Spontaneous renal tubular carcinoma in Fischer-344 rat littermates. *Vet Pathol* 1995; 32:419-422.

[論文要旨]

新規の遺伝性腎癌ラット“Nihonラット”に関する 病理学および遺伝子生物学的研究

ヒトの腎癌は、腎に発生する原発性腫瘍の中でもっとも多く、約90%を占めており、すべての癌の約2%を占めるといわれている。米国においては、癌による死亡の原因として7番目に多く、成人における悪性腫瘍の3%を占めている。これまでに、ヒトの腎癌の発症と進展に関与する遺伝子として、*VHL* (von Hippel-Lindau病) 遺伝子、*c-Met* 遺伝子、*FH* (fumarate hydratase) 遺伝子、*Tsc1* (Tuberous sclerosis) 遺伝子や*Tsc2*遺伝子が明らかにされている。腎癌の発症メカニズムの解明や遺伝子治療などの開発にあたっては、ラット等の疾患モデルを用いた研究が不可欠であるが、現在までのところ腎癌の自然発症ラットモデルは、1954年ノルウェーのEkerによって見出されたEkerラットのみであり、さらなる疾患モデル動物の開発が待たれるところである。

著者らは毒性試験のために飼育していたSprague-Dawley (SD) 系ラットの中に腎癌を自然発症するものを偶然見出し、この癌が遺伝性であることを確認し、“Nihonラット”と命名し、さらに腎癌発症の病因について遺伝子生物学的研究を行った。

本論文では、まず“Nihonラット”の発見の経緯、繁殖・維持過程で得られた病理学的、遺伝学的知見を述べ、次に腎癌の病因候補遺伝子 (*Nihon*遺伝子) を探索するための染色体地図の作成とポジショナル・クローニング (位置的候補遺伝子探索) 法による染色体領域の特定、さらに特定した染色体領域における、腎癌の有力な病因候補遺伝子の一つと考えられる*BHD*ホモログ遺伝子の単離と変異の解析について記述し、最後に本ラットの自然史について詳細な病理学的観察を行い、遺伝性腎癌モデル動物としての有用性を考察した。

[第1章]

“Nihonラット”における腎癌病変のメンデル遺伝

著者らは、同一の繁殖場から購入した7~16週齢の若齢SD系ラット群の343例中15例に腎癌の発生を見出し、その後、同一の繁殖場から雌2例の元親を得て大日本製薬 安全性研究所の施設内で繁殖・交配を開始した。繁殖・交配の成績から本ラットにおける腎細胞癌は、メンデルの法則に従った単一遺伝子の変異による常染色体優性遺伝形式をとるものと考えられ、本ラットを遺伝性腎癌モデル動物として“Nihonラット”と命名した。これまでに報告されている遺伝性腎癌モデルラットは、1954年 Ekerにより見出されたEkerラットで、1995年に腎癌病因遺伝子として*Tsc2*遺伝子

が単離・同定されている。そこで、“Nihonラット”と Ekerラットにおける腎癌の組織表現型と遺伝子変異の特徴を比較した。その結果、“Nihonラット”の腎細胞癌がclear cell優位の組織像を示すのに対して、Ekerラットのそれはnon-clear cellにより構成されるものであった。また、“Nihonラット”では腎臓における変異尿細管、異型過形成、腺腫および腺癌といった多段階的な病変発生が、Ekerラットと比較していずれも早期に起こるという特徴を有していた。さらに、遺伝子変異の解析では、Ekerラットに認められる*Tsc2*遺伝子の変異はなく、ヒト腎癌の原因遺伝子として同定されている*Tsc1*、*Tsc2*、*VHL*遺伝子および*c-Met*遺伝子にも変異は見出せなかった。

以上のように“Nihonラット”は、腎癌の組織像や遺伝子変異においてEkerラットとは異なることから、新規の腎癌モデルラットであることが強く示唆された。

[第2章]

“Nihonラット”の腎癌発症に関与する“Nihon遺伝子”探索のための染色体地図の作成

“Nihon 遺伝子”を探索するための最初のステップとして、BN ラットを用いた 113 例の戻し交配ラットを作製し、ラット全ゲノムをカバーする既知の遺伝子多型マーカーを用い遺伝的リンケージ解析を実施した。まず、ゲノムワイドスクリーニングを行い、染色体の平均 10-20cM 断片をカバーする各多型マイクロサテライトマーカーの遺伝子型と、病的形質を呈した個体数（陽性個体数）との association study を χ^2 乗検定し、その値の高いマーカーがある染色体を選び、その候補染色体上のマーカーを基点として、その近傍にある病因遺伝子にできるだけ近いマーカーを求めた。その結果、“Nihon 遺伝子”は、ラット染色体10番に存在している*interleukin-3 (IL3)* 遺伝子、*lethal (2) giant larvae (Llgl 1)* および*myosin heavy chain, embryonic skeletal muscle (MYHSE)* 遺伝子のそれぞれから4.4cM、0.9cMおよび5.3cM離れた位置に座位していた。すなわち、“Nihon 遺伝子”は、ラット染色体10番の遠位部にあり、*IL3* 遺伝子と*Llgl 1* 遺伝子の間に局在していた。

[第3章]

“Nihonラット”の腎癌発症に関与する“Nihon遺伝子”の単離

第2章においては、ラット染色体 10 番における“Nihon 遺伝子”の詳細な位置特定は不可能であった。ヒトでは *IL3* 遺伝子、*Llgl1* 遺伝子、*MYHSE* 遺伝子はそれぞれ 5 番長腕 23-31、17 番短腕 11.2、17 番短腕 13.1 に局在しているが、この時点では、ラット染色体 10 番に対応するヒト染色体が 5 番か 17 番か判明しておらず、この領域の既知の遺伝子の中に、腎癌の発生に関連する遺伝子は認められていなかった。

しかし、本実験と同一時期に、腎癌を高いリスクで発生するヒトの Birt-Hogg-Dubé (BHD)症候群の未知の病因遺伝子 (*BHD* 遺伝子) がヒト染色体 17 番短腕 11.2 あるいは 17 番短腕 12-長腕 11.2 に存在することが報告された。そこで本章では、ヒト染色体 17 番短腕 11.2 に相同するラット染色体 10 番の領域における“*Nihon* 遺伝子”の局在とラット *Bhd* ホモログ遺伝子の同定を試み、さらにその変異について検索した。

その結果、“*Nihon* ラット”において、染色体 10 番に *Bhd* ホモログ遺伝子の存在をラットで初めて確認し、さらにこの遺伝子に一塩基挿入を原因とする生殖細胞系列の変異を見出した。*Bhd* ホモログ遺伝子におけるこの一塩基挿入は、フレームシフト変異を生じ、読み枠内に終止コドンを生じさせた。その結果、本 *Bhd* ホモログ遺伝子の変異では大半のアミノ酸が欠損していた。また、ホモ変異接合体のラットは胎児期の早期に致死に至ることも確認した。さらに、“*Nihon* ラット”の 11 例中 10 例の腎癌細胞に *BHD* 遺伝子の LOH (ヘテロ接合体の消失) が認められ、LOH を認めなかった 1 例においても点変異 (ナンセンス変異) を見出した。

以上の結果から、“*Nihon* 遺伝子”は *Bhd* ホモログ遺伝子と極めて近い関係にあり、本ラットにおける腎癌の発生は癌抑制遺伝子における Knudson の 2 ヒット説を実証するものであると考えられた。

[第 4 章] “*Nihon* ラット”の自然史

本章では、“*Nihon*”ラットにおける腎癌以外の腫瘍性病変発生の有無、さらに“*Nihon*”ラット特有の病変を見出すために“*Nihon* ラット”を長期飼育し、全身組織を病理組織学的に検討した。

その結果、“*Nihon* ラット”における腎癌の発症は病理組織学的に変異尿細管から、異型過形成、腺腫、腺癌へと多段階的に進展し、浸透率は 100%であった。腎癌の組織像は clear cell が優位であったが、clear/acidophilic cell と papillary basophilic cell type もみられた。腎癌以外には子宮内膜の clear cell 過形成/腺腫、若齢時における心筋横紋筋腫、さらに腎癌内の異所性骨形成、まれに唾液腺の線条部円柱上皮の clear cell 化を認めた。

今回確認された腎癌以外の病変は、SD 系ラットを含め、ラットでの報告はまれ、あるいは未報告であり、“*Nihon* ラット”に特有の病変であり、*BHD* 遺伝子の変異に伴い、あるいは関連して発生したものと考えられた。ヒト BHD 症候群では毛包の過誤腫、腎腫瘍および自然気胸・肺シストを好発するが、“*Nihon* ラット”と BHD 症候群の共通の表現型は腎癌のみであった。

結論

“Nihon ラット”の腎癌は、メンデルの法則に従った常染色体優性遺伝形式をとり、その組織像はEker ラットのそれよりもヒトに類似し、また病変の発生がより早期に認められる特徴を持つ。“Nihon ラット”の腎癌の病因候補遺伝子“Nihon 遺伝子”は、ラット染色体 10 番の遠位部に局在し、その遺伝子として *Bhd* ホモログ遺伝子が有力である。“Nihon ラット”の *Bhd* ホモログ遺伝子には一塩基挿入による生殖細胞系列の変異が存在し、本ラットの腎癌細胞にはヒトと同様に *BHD* 遺伝子の LOH (ヘテロ接合体の消失) が認められることから、“Nihon ラット”は Knudson の 2 ヒット説を実証するモデルであると考えられる。

以上のことから、“Nihon ラット”はヒト *BHD* 症候群の動物モデルとして、また、*BHD* 遺伝子機能や腎癌の発生とがん抑制遺伝子の関連について、有用な情報を提供するものと考えられ、ヒトの癌化機構の解明や遺伝子治療の開発に大きく寄与するものと考えられる。

Pathological and Molecular Biological Studies on a Novel Inherited Nihon Rat Model of Renal Cell Carcinoma

-Kazuo Okimoto-

Background

An adult onset malignancy arising from the epithelial cells of the renal nephron is almost renal cell carcinoma (RCC). RCC accounts for 2 % of all cancers. RCC is the sixth leading cause of cancer deaths in the United States and accounts for 3 % of adult malignancies. To date, kidney cancer-related genes were identified by positional cloning and candidate gene approach: von Hippel-Lindau disease (*VHL* gene), papillary renal cell carcinoma (*MET* protooncogene), the Krebs cycle enzyme fumarate hydratase (*FH* gene), tuberous sclerosis (*TSC1* and *TSC2* gene).

To search for renal carcinogenesis and gene therapy, research by the animal model is required. Until recently, the hereditary renal carcinoma model was only the Eker rat, which was first described in the rat by Eker in 1954 in Oslo. The Eker rat model of hereditary renal carcinoma was the first example of a Mendelian dominantly inherited predisposition to a specific cancer in an experimental model, and has been contributing to the elucidation of renal carcinogenesis. Recently, the author and collaborators found a second hereditary RCC model in the Sprague-Dawley (SD) rat, in Japan in 2000. The author and collaborators have named this novel RC model the Nihon rat and performed the gene biological study.

First, the author and collaborators described the origin, transmission mode, and phenotypic and molecular features of Nihon rat in this study. Next, the author and collaborators performed a genetic linkage analysis to the Nihon mutation, as a first step toward its identification and narrowed the Nihon locus to a region of the rat chromosome 10 homologous with human chromosome 17p11.2, and the author and collaborators identified a rat BHD homologue, mutations in which predispose to the renal cancer phenotype in the Nihon rat. Finally, the natural history in the Nihon rat was conducted to characterize RCC and extra-renal lesions histologically, and the author discussed a valuable experimental tool for functional studies related to renal carcinogenesis.

Chapter 1.

“Nihon rat” Model of a Mendelian Inherited Renal Cell Carcinoma

Bilateral, multicentric renal tubule tumors were found in a rat colony of the Sprague-Dawley strain. The renal tubule tumors were found in 15 out of 343 rats during 5 toxicity studies during the safety evaluation. These rats had all obtained from the same supplier, and the age of the rats ranged from 7 to 16 weeks at termination of the treatment period in each of the studies. After then, the supplier kindly provided 2 female founder rats and a carrier female rat was used in mating with a normal male SD rat. From the mating and pedigree, this animal model is an example of a Mendelian dominantly inherited predisposition for development RCC, and named the “Nihon rat”. Until recently, the hereditary renal carcinoma model was only the Eker rat, which was first described in the rat by Eker in 1954 in Oslo. In 1995, Hino and others isolated and identified a germ line mutation in the rat homologous to the human tuberous sclerosis gene (*TSC2*). When the characteristic features of phenotype and genotype of the Nihon rat and the Eker rat is compared, the Nihon rat characteristically shows clear cell type RCs histologically, whereas the Eker rat does not develop clear cell type RCs. The heterozygous Nihon rat typically develops RCs through multiple stages from early preneoplastic lesions (e.g., altered renal tubules and atypical hyperplasia) to carcinoma, and occurs at an early stage rather than those of the Eker rat. Besides, Southern blot, northern blot and SSCP analyses have not revealed any change in the *Tsc1*, *Tsc2*, *VHL*, and *c-Met* genes.

In conclusion, the Nihon rat appears to be a novel hereditary renal cell carcinoma model, phenotypically distinct from the Eker rat, and with no mutation in the *Tsc2* gene.

Chapter 2.

Chromosomal Mapping of the Predisposing Gene, “Nihon gene”, in the Nihon rat

The author performed a genetic linkage analysis of the Nihon rat using 113 backcross animals, as a first step toward its identification. Rat DNA

markers (“MAP PAIRS”), covering whole rat chromosomes, were purchased from Research Genetics, Inc. First, the author checked 121 DNA markers covering rat chromosomes, then the author chose DNA markers clearly showing polymorphism between Nihon (SD) and BN strains and started to screen. One marker (*D10Rat27*) showed the smallest recombination fraction among DNA markers. Therefore, the author focused and narrowed the Nihon locus to the rat chromosome 10.

In conclusion, the predisposing inherited gene in the Nihon rat was mapped to the rat chromosome 10 between *interleukin-3 (IL3)* (human 5q23-31) and *lethal (2) giant larvae (LLGL1)* (human 17p11.2)/*myosin heavy chain, embryonic skeletal muscle (MYHSE)* (human 17p13.1) loci, away from 4.4 centimorgans (cM) distal and 0.9 cM/5.3 cM proximal, respectively.

Chapter 3.

Isolation of the Predisposing Gene, “Nihon gene”, in the Nihon rat

The predisposing inherited gene in the Nihon rat was mapped to rat chromosome 10 between *Il3* (human 5q23-31) and *Llgl1* (human 17p11.2)/*Myhse* (human 17p13.1) loci, 4.4 centimorgans (cM) distal and 0.9 cM/5.3 cM proximal, respectively. At this time, the author did not know the human chromosome to which it corresponded (e.g., human chromosome 5 or 17) and the predisposing gene associated with renal cancer had not located in this locus.

However, it was noted that the predisposing gene of the Birt-Hogg-Dubé (BHD) syndrome associated with renal cancer had been mapped to human chromosome 17p11.2 or 17p12-q11.2.

In this chapter, the author narrowed the Nihon locus to a region of the rat chromosome 10 homologous with human chromosome 17p11.2, and the author identified a rat BHD homologous, mutations in which predispose to the renal cancer phenotype in the Nihon rat.

From the result, complete concordance of segregation between putative rat BHD homologue (*Bhd*) and renal phenotype of the Nihon rat was found. Thus, rat *Bhd* was localized on rat chromosome 10 and tightly linked to the causative gene of the Nihon rat. In addition, the author described a germ-line mutation in Birt-Hogg-Dubé (*Bhd*) (human 17p11.2) caused by the insertion of

a single nucleotide in the Nihon rat, resulting in a frame shift and producing a stop codon 26 amino acids downstream. The resulting mutant protein is lacking the vast majority of the normal rat Bhd (folliculin) sequence. The author found that the homozygous mutants condition was lethal at an early stage of fetal life in the rat. The author detected a high frequency of loss of heterozygosity (LOH) in primary RCs (10/11) at the Bhd locus and found a point mutation (nonsense) in one LOH-negative case.

As mentioned above, the author identified a rat BHD homologue, "*Nihon gene*". These results indicate that the loss of folliculin function by a Knudson "two-hit" mechanism is a critical step for renal carcinogenesis in the Nihon rat.

Chapter 4.

The Natural History of the Nihon rat

This chapter was conducted to characterize extra-renal lesions of the Nihon rat, and to compare the phenotypes with those in the human BHD syndrome, histopathologically.

The heterozygous Nihon rat typically develops RCC through multiple stages from early preneoplastic lesions (e.g., altered renal tubules and atypical hyperplasia) to carcinoma, and penetrance for this Nihon gene was virtually complete. Histologically, the phenotype of RCs in the Nihon rats was clear cell type predominant, the phenotype that is most common in humans. In addition, the component showed clear/acidophilic cell and papillary basophilic cell type. Investigation of extra-renal primary lesions occurring in Nihon rats revealed clear cell hyperplasia/adenoma of the endometrium, cardiac rhabdomyomatosis at a young age, heterotopic ossification within renal cell carcinoma, and clear cell change of the epithelium of striated portions of salivary glands. To the best of our knowledge, these lesions are extremely uncommon lesions in Sprague-Dawley rats or other strains of rats and are thus clearly identifiable with the Nihon familial syndrome. Human BHD syndrome, originally described by Birt, Hogg and Dubé in 1977, is a rare inherited autosomal genodermatosis characterized by benign tumors of the hair follicle, and is associated with renal neoplasia, lung cysts, and spontaneous pneumothorax. At this time, the author have not detected in the Nihon rat skin tumor, lung cysts or spontaneous pneumothorax.

Conclusion

The Nihon rat is a model of a Mendelian dominantly inherited predisposition for development of RCs, which are predominantly of the clear cell type, and develop from earlier preneoplastic lesions than the Eker rat. The author performed a genetic linkage analysis of the Nihon rat using 113 backcross animals, and found that the *Nihon* mutation was tightly linked to genes, which are located on the distal part of rat chromosome 10. Finally, the author identified a germ line mutation in the Birt-Hogg-Dubé gene (*Bhd*) rat chromosome 10, human chromosome 17p11.2 caused by the insertion of a single nucleotide in the rat gene sequence, resulting in a frame shift and producing a stop codon 26 amino acids downstream.

Thus, the Nihon rat should be a valuable experimental tool for functional studies related to renal carcinogenesis and a novel tumor suppressor gene *BHD*, and the Nihon rat will contribute to search for renal carcinogenesis and gene therapy.