

| | | | |
|---------------------------|------|-------------|---|
| (51) Int.Cl. ⁶ | 識別記号 | F I | |
| A01K 67/027 | | A01K 67/027 | |
| C12N 5/10 | | G01N 33/15 | Z |
| 15/09 | | C12N 5/00 | C |
| G01N 33/15 | | 15/00 | A |
| //(C12N 15/09 | | | |

審査請求 未請求 請求項の数 3 O L (全14頁) 最終頁に続く

(21)出願番号 特願平11 - 46594

(22)出願日 平成11年(1999) 2月24日

(31)優先権主張番号 特願平10 - 62130

(32)優先日 平10(1998) 2月25日

(33)優先権主張国 日本 (J P)

特許法第30条第 1 項適用申請有り 平成 9 年 8 月 25 日

日本癌学会発行の「第56回日本癌学会総会記事」に発表

(71)出願人 590001452
 国立がんセンター総長
 東京都中央区築地 5 丁目 1 番 1 号

(71)出願人 396020800
 科学技術振興事業団
 埼玉県川口市本町 4 丁目 1 番 8 号

(72)発明者 津田 洋幸
 東京都目黒区中町 1 - 16 - 17 朝日ラ・パ
 リオ油面公園203

(72)発明者 朝元 誠人
 愛知県名古屋市瑞穂区松月町 3 - 14 - 3

(74)代理人 弁理士 佐伯 憲生

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 ヒト正常型 c - H a - r a s 遺伝子トランスジェニックラット

(57) 【要約】

【課題】 本発明は、ヒト正常型 c - H a - r a s 遺伝子 (human c-Ha-rasproto-oncogene) をラットに導入して遺伝子導入ラットを提供するものである。

【解決手段】 本発明は、正常型ヒト c - H a - r a s 遺伝子を導入したラット、及び、当該ラットを用いて、発がん性物質、発がんプロモーター、又は、がん予防・抑制物質をスクリーニングする方法に関する。

【特許請求の範囲】

【請求項 1】 ヒト正常型 c - H a - r a s 遺伝子 (human c-Ha-ras proto-oncogene) を導入したラット。

【請求項 2】 遺伝子を導入されるラットが S D ラットである請求項 1 に記載のラット。

【請求項 3】 請求項 1 又は 2 に記載のラットを用いて、発がん性物質、発がんプロモーター、又は、がん予防・抑制物質をスクリーニングする方法。

【発明の詳細な説明】

【 0 0 0 1 】

【発明の属する技術分野】本発明は、ヒト正常型 c - H a - r a s 遺伝子を導入したラット、並びに、当該ラットを用いて発がん性物質、発がんプロモーター、及び、がん予防・抑制物質をスクリーニングする方法に関する。

【 0 0 0 2 】

【従来の技術】c - H a - r a s はヒトのがん組織に種々の頻度で活性化型が検出されている。正常型のヒト c - H a - r a s 遺伝子導入マウスは、既に勝木らによって r a s - H 2 マウスとして作成されており、発がん導入遺伝子の活性化との関係が検索され、現在発がん物質の短期間でのスクリーニング動物としての有用性が検討されている。しかし、このマウスで腫瘍の発生する臓器は、肺、皮膚、前胃などに限られており、他の消化器、泌尿器、生殖器、内分泌器などの多くの重要な臓器のがんの発生はなく、これらの臓器を標的とする発がん物質のスクリーニングを行うことは不可能であり、新たなモデル動物の作出が望まれていた。

【 0 0 0 3 】一方、ラットにおいては、多くの臓器で発がんモデルが確立されており、前がん病変ならびに腫瘍性病変の生物学的特性やそれらの発生に対する修飾要因等についてマウスより多くの情報が得られている。さらに、ラットにおいては、マウスでは誘発することが困難な発がんモデルが多数開発されてきている。特に、肝発がんモデルでは、G S T - P 陽性巣が前がん病変マーカーとして有用であり、発がん物質ならびにがん予防物質の検索系に利用されている。また、ラットでは N - メチル - N - ニトロソウレア (MNU) で誘発された乳がんが高率に H a - r a s の点突然変異が生起していることが確認されてきている。この変異は、MNU により誘発されたものと考えられていたが、最近正常乳腺内にこの変異が存在するとの報告もあり、ラット乳腺発がんにおける MNU 処置と H a - r a s の点突然変異との関連は明らかではない。さらに、ラットではウイルスフリーで N - メチル - N - ニトロソ尿素 (MNU) により乳腺がんを容易に誘発することができるが、マウスでは誘発が困難である。このように、モデルとしてのラットはマウスに比べて種々の利点を有しているが、腫瘍の研究のための遺伝子導入ラットは余り報告されていない。報告されている数少ない遺伝子導入ラットとしては、肝臓にお

ける前癌病変に關与する G S T - P (Glutathione S-transferase placental form) の発現の研究のために、サルウイルス 4 0 T (simian virus 4 0 T) 抗原遺伝子にアルブミンプロモーターを縮合させた遺伝子を導入したラットや、ラットの肝臓がんの発症における G S T - P の転写制御の研究のためにクロランフェンコールアセチルトランスフェラーゼの遺伝子に G S T - P プロモーターを縮合させた遺伝子を導入したラットなどが知られている。

10 【 0 0 0 4 】ヒト正常型 c - H a - r a s 遺伝子を導入した動物において、特にラットで発がん感受性試験を行う利点として、次の点が挙げられる。ラットでは前述のように肝発がんにおいて、前がん病変マーカーとして G S T - 陽性細胞巣を利用できる点である。乳腺発がんにおいては、ウイルスフリーの乳腺発がん実験が行え、MNU による c - H a - r a s の点突然変異の解析が可能である。また、乳腺発がんにおけるホルモンの関与についての解析をすることも可能である。さらに、膀胱発がんについては、ラットでは N - ブチル - N - (4 - ヒドロキシブチル) ニトロサミン (BBN) による表在性膀胱腫瘍のモデルが存在するので、この解析を行うことができる。このように、ヒト正常型 c - H a - r a s 遺伝子を導入したラットでは、従来の遺伝子導入マウスではできなかった多くのがんに対する発がん物質のスクリーニングや、発がんプロモーター及びがん予防・抑制物質のスクリーニングが可能となるのみならず、多種のがんの発がん機構の解析も可能となるなどの多くの利点を有し、本遺伝子導入ラットの作成が望まれていた。

【 0 0 0 5 】

30 【発明が解決すべき課題】本発明者らは、ヒト正常型 c - H a - r a s 遺伝子 (human c-Ha-ras proto-oncogene) を導入したマウスを生成させるときに用いた遺伝子と同じ遺伝子を用いて、これをラットに導入して遺伝子導入ラットを生成させた。この遺伝子は、蛋白質をコードする領域において変異しておらず、形質転換 N I H 3 T 3 細胞の活性を有さないものであった。この遺伝子導入ラット (H r a s 1 2 8 ラット) の乳腺がん誘発特性を確認するために、このラットを MNU で処理した。MNU の投与を開始して 8 週後に、全てのこのラットにおいて、多発性の大きな乳腺がんの発症がみられた。遺伝子の変異を解析したところ、野生型ラットにおいては内在性遺伝子に変異が観察されたのに対して、遺伝子導入ラットにおいては、がん誘発性の強化が重要な役割を果たしていなかった。

【 0 0 0 6 】

40 【課題を解決するための手段】本発明は、正常型ヒト c - H a - r a s 遺伝子を導入したラットに関する。また、本発明は、当該ラットを用いて、発がん性物質、発がんプロモーター、又は、がん予防・抑制物質をスクリーニングする方法に関する。

【0007】本発明で使用される正常型ヒト c - H a - r a s 遺伝子は、本発明者らが開発した公知の方法で作成することができる（関谷ら、ジャパニーズ ジャーナル オブ キャンサー リサーチ、第 7 6 巻、第 8 5 1 - 8 5 5 頁（Sekiya, T., et al., Jpn. J. Cancer Res., 76, 851-855））。図 1 の上段に、導入されるヒト正常型 c - H a - r a s 遺伝子の構造を示す。6 . 9 k b の長さの遺伝子である。図中の右端の B 及び S は、それぞれ制限酵素 B a m H I 及び S a c I の位置を示している。また、黒星印は最後のイントロン内における点突然変異の位置を示している。

【0008】本発明の遺伝子を導入するラットとしては、発がんモデルとなるものであれば特に制限はないが、SDラットが技術的に好ましいが、他の系統のラットでも可能である。ラットに遺伝子を導入する方法としては、マイクロインジェクション法、レトロウイルスを使用する方法、胚性幹細胞を用いる方法などの公知の方法を適宜使用することができるが、マイクロインジェクション法が好ましい。例えば、本発明のラットでは受精卵にヒト正常型 c - H a - r a s 遺伝子をマイクロインジェクションし、これを偽妊娠ラットの卵管内に移入して子を生ませる方法により、遺伝子の導入を行っている。

【0009】ラットに導入されたヒト正常型 c - H a - r a s 遺伝子は子孫に安定に伝達され、全臓器で本遺伝子の発現が見られた。図 1 の下段 A は、導入遺伝子の各器官における mRNA の発現をノーザンプロット法によりみたものである。図 1 の下段の中央のアルファベットは各器官を示し、それぞれ、a は子宮、b は皮膚、c は筋肉、d は膀胱、e は卵巣、f は腎臓、g は大腸、h は小腸、i は腺胃、j は前胃、k は脾臓、l は肝臓、m は心臓、n は肺、o は胸腺、p は唾液腺、q は小脳、r は大脳を示している。図 1 の下段の B は、遺伝子導入ラットの mRNA の発現の対照として、G A P D H の発現を示したものである。

【0010】本発明の遺伝子導入ラットを用いて、発がん物質のスクリーニング、発がんプロモーター及びがん予防物質のスクリーニング、又は、発がん機構の解析する方法としては、ラットに発がん物質、発がんプロモーター、又は、がん予防物質を経口又は非経口投与し、その後、標的とした器官の病変を観察又は解析することにより行うことができる。

【0011】さらに、本ラットは、ヒトにおけるヒト正常型 c - H a - r a s 遺伝子の発がんにおける関与の解析モデルとして極めて有用である。例えば、発がん物質として知られている N - メチル - N - ニトロソウレア (MNU) を本発明のラットに投与すると、図 2 で示されるように高率で短時間に乳がんなどが誘発される。最近、正常乳腺内に H a - r a s コドン 1 2 (G G A から G A A へ) 突然変異を持つ細胞が存在することが報告さ

れており、ラット乳腺発がんにおける MNU 処置と、この H - r a s の点突然変異の関連が注目されているが、本態の解明はされていない。したがって、この面での発がん機構の解明においても、本発明のラットは極めて有用である。

【0012】本発明の遺伝子導入ラットを用いた MNU 誘発の発がん機構を解析した結果をまとめると次のようになる。

1 . ヒト正常型 c - H a - r a s 遺伝子導入ラットの生成。

導入されるヒト正常型 c - H a - r a s 遺伝子を、1 1 4 5 個のラットの胚の前核へ注入して、2 1 1 個の遺伝子導入ラットを得た。これらは 2 系統の遺伝学的なグループに分けられ、サザンプロットの結果、そのひとつの系統には 3 コピーの遺伝子が導入されており、他の系統のものには 1 コピーの遺伝子が導入されていた。3 コピーの遺伝子が導入された遺伝子導入ラット (H r a s 1 2 8 ラット) は、安定に次世代に継がれ、かつ、ノーザンプロットの結果によれば乳腺をはじめ全器官において導入遺伝子の発現を検出することができた (図 1 参照) 。この系統の遺伝子導入ラットを、J C L / S D - T g N (H - r a s G E N) 1 2 8 N c c (H r a s 1 2 8) と公式に命名した。一方、1 コピーしか導入されていないラットの系統 (H r a s 1 0 2 ラット) は、2 世代後には導入遺伝子の発現が見られなくなった。したがって、以下の実験においては、H r a s 1 2 8 のみを用いた。

2 . MNU 誘発乳腺がんに対する感受性の研究。

H r a s 1 2 8 遺伝子導入ラットは、MNU 誘発乳腺がん極めて高感受性であった。MNU 投与後 5 週目に、遺伝子導入ラットでは多数の乳腺がんを触知することができたが、同じ日令の野生型ラットでは検出できなかった (図 1 参照) 。8 週目の終わりには、全ての H r a s 1 2 8 ラットにおいて多数の大きながんが発生し、体重減少や瀕死の状態が観察された。組織学的には、これらの癌は固型腺がんであり野生型ラットに発生する典型的な乳腺がんであった。MNU 処理 8 週後の遺伝子導入ラット及び野生型ラットに、他の臨床所見はみられなかった。実験期間中に、前記の発がん以外に、他の発がんや異常はみられなかった。しかし、長期間にわたる自発性の発がんについての観察によると、遺伝子導入ラットには乳腺がんや皮膚がんの発生が 1 年後にはみられた。

3 . P C R - S S C P 法による乳腺がんにおける H a - r a s 遺伝子の変異。

1 本鎖 DNA 高次構造多型 (S S C P) を (関谷剛男、 「蛋白質 核酸 酵素」、第 4 1 巻 5 号、5 3 9、1 9 9 6 年) の方法により行った。ヒト正常型 c - H a - r a s 導入遺伝子のエクソン 1 及び 4、並びに、内在遺伝子のエクソン 1 及び 2 を P C R - S S C P 法により解析

した。ヒト又はラットの特定のプライマーを用いて、ゲル上に2個のバンドが得られた。ヒト及びラットのH a - r a sのエクソン2に対する通常のプライマー（cHras21F、及び、cHras21R）を用いて、4本のバンドが検出された。ヒト及びラットの特定のバンドは、遺伝子導入及び野生型ラットの正常なDNAからのシグナルと同定された。ヒトH a - r a sのコードン12のGGCからGTCへの変異を有するT24からのDNA、及びコードン61のCAGからCTGへの変異を有するpSK2からのDNAは、明らかにシフトしたバンドを示した（図4 10 参照）。しかし、以下に記載するRFLP分析後のPCRにより増幅された導入遺伝子のGGCからGACへの変異、この変異はヒトH a - r a s遺伝子導入マウスの

MNU誘発のがんにおいてしばしば観察されるのであるが、この変異は、SSCP-PCR分析では検出することができなかった。MNU処理された44個のHras遺伝子導入ラットのがん組織において、導入遺伝子も内在型遺伝子にも4種のSSCPの条件下（4又は20、5%グリセリン存在下又は非存在下）では検出することができなかった（表1）。これに対して、内在型H a - r a s遺伝子のコードン12のGGAのGAAの変異が野生型ラットにおいて相対的に高率でみられた（21中6（28.6%））。

【0015】

【表1】

表1 MNU誘発乳がんにおけるH-rasの実験変異

| 試験動物数 | 導入したヒト遺伝子の変異を起こしたエクソン ^a | | | | 内在ラット遺伝子の変異したエクソン ^b | |
|------------|------------------------------------|---------------|---|---|--------------------------------|---|
| | 1 (コードン12) | 2 (コードン61) | 3 | 4 | 1 | 2 |
| Hras128 44 | 38 ^c (86.4%) | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| Wild 21 | - | - | - | - | 6 ^d (28.6%) | 0 |

a: RFLP及びSSCP分析による。
 b: SSCP分析による。
 c: 34例は、GGCがGACに; 3例は、GGCがGTCに; 1例は、GGCがAGCに変異した。
 d: 全例、コードン12のGGAがGAAに変異した。

【0016】4. RFLPによる変異の解析
 制限酵素断片長多型(RFLP)解析は、永瀬智ら、「蛋白質 核酸 酵素」、第41巻5号、564、1996年)の方法を用いることができる。44の腫瘍症例中の38例がMsp1耐性バンドを示したが、該バンドはこれらの腫瘍が導入遺伝子のコードン12における変異を含むことを表している。該変異バンドの強度はこれらのサンプル中に多種にわたり、2例は強く、34の腫瘍例は中程度か弱いものだった。このRFLP解析の感度の評価については、野生型(正常肝)と変異型(T24)のDNA断片が種々の比率で混合されたものにおいて、野生型100例の配列のうち、変異した1例において非常に小さい比率の変異の検出が確認された。バンドの強度によれば、腫瘍2例の強いバンドは10%前後の変異PCR断片を含んでいるようで、中程度のバンドでは約2~5%の変異を、微弱なバンドではほぼ1~2%ルータント(routant)を含んでいるようだった。該変異バンドのダイレクトシーケンシング(direct sequ

encing)では、34の腫瘍症例がGGCからGACへの変異を含んでいることが明示していた。エクソン2のために意図したRFLP解析によると、該44例のどれにも変異は検出されなかった(表1参照)。

【0017】5. サブクローニング及びシーケンシング解析

エクソン1~4における腫瘍症例(758M、761G、772B、773H)の増幅、すなわち、プラスミドへのサブクローニング、腫瘍数1当たりの50コロニー前後からの個々のDNAシーケンシングは、758Mでは、51クローン中の6例がすべてコードン12においてGGCからAGCへの変異を示した。GAC変異は、761Gでは47例中1例が検出され、773Hでは51例中3例が検出された。しかしながら、RFLP解析にもかわらず、野生型配列を持つ772Bの全47例では少数のGAC変異を持つことが示された(表2)。

【0018】

【表2】

30
40

表 2 H r a s 1 2 8 における M N U 誘発乳がんの P C R - サブクローニングによる導入遺伝子エクソン 1 の突然変異の解析

| 腫瘍 | 被験 クローン数 | 変異 クローン数 | 変異した腫瘍細胞 の算出含有率 (%) | | | コドン 1 2 の変異 |
|------|-------------|-------------|------------------------|-------|-------|----------------|
| | | | 正常細胞含有率 | | | |
| | | | 0% | 20% | 50% | |
| 758M | 51 | 6 | 35.3% ^a | 44.1% | 70.6% | GGC to AGC |
| 761G | 47 | 1 | 6.4% | 8.0% | 12.8% | GGC to GAC |
| 772B | 47 | 0 | - | - | - | - |
| 773H | 51 | 3 | 17.6% | 22.1% | 35.3% | GGC to GAC |

a: 変異した腫瘍細胞のパーセンテージ
(変異クローン数/被験クローン数×3コピー%)

【 0 0 1 9 】次に、MNUで誘発した遺伝子導入 1 2 8 系ラット及び野生型ラットの乳腺腫瘍について、コドン 1 2 及び 6 1 (図 1 参照) の変異を新たにより感度の高い制限酵素断片長多型 (R F L P) 解析 (永瀬智ら、

「蛋白質 核酸 酵素」、第 4 1 巻 5 号、5 6 4、1 9 9 6 年) 及び 1 本鎖 DNA 高次構造多型 (S S C P) (関谷剛男、

「蛋白質 核酸 酵素」、第 4 1 巻 5 号、5 3 9、1 9 9 6 年) により行った。その結果を表 1 に示す。
【 0 0 2 0 】該遺伝子導入 1 2 8 系 (H r a s 1 2 8 T g) ラットに誘発された乳腺腫瘍 4 4 症例中 3 8 例 (8 6 . 4 %) に導入遺伝子のコドン 1 2 の変異を認め、そのうち 3 4 例は G G C から G A C、3 例は G G C から G T C、1 例は G G C から A G C であった。内在性の c - H a - r a s に変異は認めなかった。野性型ラットに誘発した腫瘍には内在性の c - H a - r a s 遺伝子のコドン 1 2 の G G A から G A A の変異が 2 1 例中 6 例 (2 8 . 6 %) に認められた。
【 0 0 2 1 】この実験で行った R F L P 解析の概略を図 4 に示す。図 4 に示すように、コドン 1 2 の G G C が正常な場合には、この位置で制限酵素 M s p I で切断され、1 1 7 b p と 5 0 b p の 2 つのバンドが検出されるが、コドン 1 2 に変異が生じた場合には制限酵素 M s p I によって切断されず 1 6 7 b p (図 4 中の T 2 4) のバンドが検出される。この場合、実際には変異を起こした腫瘍細胞を含む組織からは、正常組織の混入があるため、切断されない 1 6 7 b p のバンドと切断された 1 1 7 b p 及び 5 0 b p のバンドが観察される。同様にコドン 6 1 を検索する場合にはその正常塩基配列 C A G が制限酵素 A l w N I により切断され 9 3 b p 及び 1 7 b p のバンドが検出されるが、コドン 6 1 に変異が生じた場合には、制限酵素 A l w N I によって切断されず 1 1 0 b p (図 4 中の p S K 2) のバンドが検出される。変異を起こした腫瘍細胞を含む組織からは、切断されない 1 1 0 b p のバンドと切断された 9 3 b p 及び 1 7 b p のバンドが観察される。

【 0 0 2 2 】この R F L P 解析の感度は高く、変異を起

こした DNA をその 1 0 0 倍の正常な DNA で希釈した場合でも検出可能であった (図 5 参照) 。図 5 は、コドン 1 2 及び 6 1 について、変異を起こした DNA (図 5 中の 1 : 1) を、種々の倍率で正常 DNA で希釈していった場合の R F L P 解析の結果を示している。図 5 の右端の方では、1 0 0 倍の正常 DNA で希釈した場合でも前記の制限酵素によっても切断されないバンドが観察されることが示された。したがって、ごく少数の細胞に変異 DNA があっても、R F L P 解析により検出されてしまうため変異の DNA を持つ細胞の占める割合は小さいこともあり得ることになる。すなわち、r a s 遺伝子変異の頻度だけでは発がんにおける役割の重要性についての結論を出すことはできない。

【 0 0 2 3 】そこで、P C R - サブクローニング法により、1 個の腫瘍当たりの変異細胞 DNA の占める割合を検討した。MNUで誘発した遺伝子導入 1 2 8 系ラットの乳腺腫瘍の腫瘍細胞 7 5 8 M、7 6 1 G、7 7 2 B 及び 7 7 3 H の系統からクローンを得、その中の変異クローンを検出した。その結果を表 2 に示す。

【 0 0 2 4 】例えば、腫瘍細胞塊 7 5 8 M は、検索した 5 1 クローンのうち 6 クローンに G G C から A G C への変異が検出された。しかし、この腫瘍塊に正常細胞の混入の割合が 0、2 0、5 0 % と仮定した場合 (正常細胞の混入割合が 5 0 % にもなることは本実験の乳腺腫瘍では殆どありえず、実際にはさらに少ない量と考えられる)、1 個の腫瘍当たりの変異細胞の混入している割合は、” P C R - サブクローニング法における遺伝子変異頻度 (変異クローン / 検索クローン) × 3 (導入された c - H a - r a s 遺伝子のコピー数) × (正常細胞の混入割合) ” という式で算出される。この式から計算されたそれぞれの値は、3 5 . 3、4 4 . 1、7 0 . 6 % となる。しかし、混入割合をかなり多めの 2 0 % とした場合でも、1 個の腫瘍当たりの r a s 遺伝子変異の占める割合は最大 5 0 % 以内にとどまり、r a s 遺伝子変異は本トランスジェニックラットの発がんに主たる役割をたしていないと考えられた。したがって、本発明の遺伝子導入ラットでは、r a s 遺伝子の変異以外の関与する

発がん腫瘍の機構の関与する可能性があり、その解析を行うことができる。

【 0 0 2 5 】また、遺伝子導入ラットの自然発生腫瘍の表 3

頻度を観察した。その結果を表 3 に示す。

【 0 0 2 6 】

【表 3】

7 8 週令の c - H a - r a s 遺伝子導入ラット^aにおける自然発生腫瘍

| 系 | ラットの 合計数 | 腫瘍を持つラットの数 (%) | |
|---------------------|-------------|------------------------------|----------------------------|
| | | 皮膚乳頭腫 | 悪性線維性組織球腫 |
| H r a s 1 2 8 雌 | 2 9 | 3 (1 0 . 3) | 9 (2 4 . 3) ^c |
| W i l d (1 2 8) 雌 | 3 8 | 1 (2 . 6) | 0 |
| H r a s 1 2 8 雄 | 3 7 | 1 7 (4 5 . 9) ^b | 5 (1 7 . 2) ^d |
| W i l d (1 2 8) 雄 | 4 1 | 2 (4 . 9) | 0 |

^a : JCL/SD-TgN(Hras Gen)128Ncc.

^b : p < 0.001

^c : p < 0.01

^d : p < 0.05

【 0 0 2 7 】生後 7 8 週の観察期間において、本発明の遺伝子導入ラットでは皮下の悪性線維性組織球腫が野生型ラットと比較して有意に増加して発生した。さらに雄の遺伝子導入ラットでは皮膚の乳頭腫の発生が有意に増加しており、今後皮膚発がんモデルあるいは発がん物質のスクリーニング動物として有用であり、また発がん機構の解析においても有用であることがわかった。

【 0 0 2 8 】以上のことから、本発明の遺伝子導入ラットの特長として次のことがわかった。

(1) 自然発生腫瘍の特性

ア . トランスジェニックラットにおける皮下悪性線維性組織球腫の発生が遺伝子非導入対照群 (野生型) に比較して有意に増加する。

イ . トランスジェニック雄ラットにおいて、通常のラットでは極めて稀な皮膚乳頭腫が高率に発生する。ラットにおける皮膚発がんモデルとして使用が可能である。

(2) 発がん抑制実験への応用

ア . 本トランスジェニックラットは、 r a s 遺伝子により産生される蛋白のファルネシル化を阻害する物質のスクリーニングに有効であり、また発がん抑制効果を早期に判定することが可能となる。

(3) 発がん感受性試験への応用

ア . エチルニトロソウレアの経胎盤投与により、本トランスジェニックラットは短期間中に中枢神経腫瘍、腎腫瘍、皮膚乳頭腫等の発生が有意に増加する。

イ . 本トランスジェニックラットを使用することにより、経胎盤発がん物質の作用を短期間に判定することが可能となる。

ウ . 本トランスジェニック雄ラットにメチルニトロソウレアを投与すると皮膚乳頭腫が短期間に多発する。同一観察期間において対照群の野生型ラットには全く皮膚乳頭腫の発生は認められない。

すなわち、本発明の遺伝子導入ラットを用いることによ

20

り、ヒトの発がん機構の解明のための研究ができるようになるのみならず、発がん予防・抑制物質のスクリーニングを容易に行うことができる。

【 0 0 2 9 】

【実施例】次に、本発明を実施例により説明するが、本発明はこれらの実施例に限定されるものではない。

【 0 0 3 0 】実施例 1

ヒト正常型 c - H a - r a s をそれ自身のプロモーター / エンハンサー領域と共に S D ラット由来の受精卵にマイクロインジェクションして導入し、これを偽妊娠ラットの卵管内に移入して仔をさせた。1 コピー入った 1 0 2 系列と 3 コピー入った 1 2 8 系列の 2 系統の遺伝子導入ラットを確立した。導入遺伝子は子孫に安定に伝達され、図 1 の下段のプロット図に示されるように、ほぼ全臓器で発現が見られた。

30

【 0 0 3 1 】実施例 2

5 0 日令の遺伝子導入及び野生型ラットに M N U 5 0 m g / k g の用量にて静脈内投与を行い、乳腺腫瘍の発生について病理組織学的検索を行うと共に、導入遺伝子と内在性 c - H a - r a s の点突然変異の有無を検索した。1 2 8 系列の遺伝子導入ラットは M N U 投与後 3 週目より乳腺腫瘍が触知され、8 週後で全部の遺伝子導入ラットのすべての乳腺に多発性の腺がんが発生したが、野生型ラットでは 8 週後においても腫瘍の発生率は 2 9 . 2 % であった (表 1 及び図 2 参照) 。 1 0 2 系列も M N U 投与後 1 6 週で遺伝子導入ラットにのみ多発性の腺がんを認めた。この結果を次の表 4 、及び、図 2 に示す。なお、図 2 中の、黒丸印で示される T g は本発明の遺伝子導入ラットであり、黒四角印で示される W i l d は遺伝子を導入していない野生型ラットである。

40

【 0 0 3 2 】

【表 4】

50

表 4 遺伝子導入ラットにおけるMNUによるがんの誘発

| ラット種別 | MNU 処置 | がん発生時期 | 検 索 ラット数 | がんの発生したラット数(%) | ラット1匹当たりのがんの数 |
|---------------|--------|--------|----------|----------------|---------------|
| H r a s 1 0 2 | 投与群 | 18週 | 23 | 20 (87.0) | 5.83±5.31 |
| H r a s 1 0 2 | 非投与群 | 18週 | 13 | 10 (76.9) | 3.00±2.86 |
| H r a s 1 2 8 | 投与群 | 8週 | 22 | 22 (100) | 14.0±6.42** |
| H r a s 1 2 8 | 非投与群 | 8週 | 24 | 7 (29.2) | 0.46±0.93 |

** 非投与群と比べて有意差 (P<0.01)

【0033】しかし、これらの腫瘍では、導入したヒトのHa-rasと内在性のラットのHa-rasのいずれにも点突然変異は検出されなかった。一方、野生型(遺伝子の導入をしていない)のラットで、MNU処置により発生した乳腺腫瘍では、内在性のHa-rasに点突然変異が28.6%の割合で検出された。結果を表に示す。表中のエクソンの数字は、ゲノムのエクソンの順番を示し、数値はその位置に点突然変異が検出されたラットの数(%)を示している。

【0034】また、遺伝子導入128系ラット及び野生型ラットについて、c-H-ras遺伝子の発現をノーザンブロット法により調べた。結果を図3に示す。GAPDHにより検出された。図3の下段のバンドは、調べた腫瘍部位及び正常部位のmRNAのサンプル量がほぼ均等であることを示す対照である。その結果、遺伝子導入128系ラットでは、c-H-ras遺伝子の発現は腫瘍部位及び正常部位のいずれにおいても量的な変化は認められないことが示された。

【0035】以上より、ヒト正常型c-Ha-ras遺伝子導入ラットはMNU誘発乳腺発がん非常に高感受

性であり、その原因として導入遺伝子の点突然変異以外の活性化機構が関与していると考えられた。

【0036】実施例3

20 発がん物質として知られている、7,14-ジメチルベンズ[a]アントラセン(DMBA)、及び、2-アミノ-1-メチル-6-フェニルイミダゾ[4,5-b]ピリジン(PhIP)をそれぞれ用いて、実施例2と同様にして、遺伝子導入128系ラットの発がん性を調べた。結果を、図6(DMBA)、図7(PhIP)に示す。遺伝子導入128系ラットは、いずれの発がん物質についても高発がん感受性を示した。なお、図6及び図7中の、黒丸印で示されるTgは本発明の遺伝子導入ラットであり、黒四角印で示されるWildは遺伝子を導入していない野生型のラットである。DMBAによる乳腺腫瘍の発生数、発生率、ラット1匹当たりの腫瘍数及び腫瘍サイズを表5に示し、RFLP解析によるコドン12又はコドン61の変異数を表6に示す。

【0037】

【表5】

表 5 腫瘍の頻度と発生数

| ラット数 | 発がんラット数(%) | 腫瘍/ラットの数 | がん腫瘍サイズ(mm) |
|------------|------------------------|------------------------|-------------|
| Hras128 14 | 13 (92.9) ^a | 9.39±9.79 ^b | 12.6±9.22 |
| Wild 12 | 4 (33.3) | 0.83±1.75 | 13.4±8.20 |

^a P<0.01; ^b P<0.001 (マン-ホイットニー-U試験: Mann-Whitney U-test)

【0038】

【表6】

表 6

| | | Ha-ras 突然変異 | | | | |
|-----------|----|---------------------|---------------------|---------|----------|-------|
| 被験 腫瘍数 | | 導入遺伝子(ヒト) | | | 内在性(ラット) | |
| | | コドン12 | コドン61 | 合計 | エクソン1 | エクソン2 |
| Hras128 | 20 | 5(25%) ^a | 7(35%) ^b | 12(60%) | 0 | 0 |
| Wild | 7 | - | - | - | 0 | 0 |

a : 3例がGGCからTGCへ; 1例がGCCへ; 1例がコドン13のGGTからGTTの変異に加えA C/G C/Gへ変異した。

b : 4例がCAGからCTGへ; 3例がCAGからCATへ変異した。

【0039】遺伝子導入ラットはDMBAにも感受性が高く、RFLP解析により導入遺伝子のコドン12(5/20)及び61(7/20)に変異が検出された。同様にPhIPによる乳腺腫瘍の発生頻度と遺伝子変異の

結果を表7及び表8に示す。

【0040】

【表7】

表 7

腫瘍の頻度と発生数

| ラット数 | 発がん ラット数(%) | 腫瘍/ラット の数 | がん腫瘍サイズ (mm) |
|---------|----------------|---------------------|------------------------|
| Hras128 | 6 | 6(100) ^a | 9.67±4.76 ^b |
| Wild | 4 | 0(0) | 0 |

^a P<0.005; ^b P<0.01

【0041】

【表8】

表 8

Ha-ras 突然変異

| 被験 腫瘍数 | | 導入遺伝子(ヒト) | | | 内在性(ラット) | |
|-------------|----|------------------------|-----------------------|----------------------|----------|-------|
| | | コドン12 | コドン61 | 合計 | エクソン1 | エクソン2 |
| Hras 128 | 20 | 5(38.55%) ^b | 3(23.1%) ^b | 8(61.5) ^a | 0 | 0 |

a : 2例がGGCからGACへ; 2例がGGCからGTCへ; 1例がGGCからTGCへ変異した。

b : 3例(すべて)がCAGからCATへ変異した。

【0042】遺伝子導入ラットはPhIPにも感受性が高く、RFLP解析により導入遺伝子のコドン12(5/20)及び61(3/20)に変異が検出された。

【0043】実施例4

実施例2と同様にして、N-メチル-N-ニトロソメチルベンジルアミン(NMBA)0.5mg/kgを、5

週に亘って、17回静脈内投与することにより誘発した遺伝子導入128系ラット及び野生型ラットの食道腫瘍の発生頻度と遺伝子変異の結果を表9に示し、そのコドン12及び61の変異の結果を表10に示す。

【0044】

【表9】

表 9

食道腫瘍の頻度と発生数

| ラット数 (雄) | 発がん ラット数(%) | 数/ラット の数 | サイズ(mm) |
|-------------|----------------|----------------------|-------------------------|
| Hras128 | 19 | 19(100) ^a | 11.05±7.83 ^b |
| Wild | 18 | 11(58.3) | 1.67±2.06 |

a : P<0.005; b : P<0.0001

【0045】

【表10】

表 1 0

Ha-ras 突然変異

| | 被験腫瘍数 | 導入遺伝子(ヒト) | | | 内在性(ラット) | |
|---------|-------|----------------------|-------|---------|-----------------------|-------|
| | | コドン12 | コドン61 | 合計 | エクソン1 | エクソン2 |
| Hras128 | 25 | 19(76%) ^a | 0 | 19(76%) | 2(8%) ^b | 0 |
| Wild | 14 | - | - | - | 8(57.1%) ^b | 0 |

a : 17例がGGCからGACへ変異した。 ; 1例がGGCからTGCへ変異した。
 ; 1例がコドン12のGGCからGACへの変異に加えてコドン14のGTGからGTAに変異した。
b : 3例(すべて)がCAGからCATへ変異した。

【 0 0 4 6 】 遺伝子導入ラットはNMB A誘発食道がんにも極めて感受性が高く、RFLP解析では導入遺伝子のコドン12に高率(76%)に変異を認めた。食道がんにおいては、ras遺伝子変異は乳腺の場合よりも大きい役割をはたしていると考えられた。

【 0 0 4 7 】 実施例 5

実施例 2 と同様に、遺伝子導入 1 2 8 系ラット及び野生

型ラットに 0 . 0 5 % の N - ブチル - N - (4 - ヒドロキシブチル) ニトロサミン (BBN) を 1 0 週に亘り、飲料水にて投与して発生させた膀胱腫瘍の発生頻度を表 1 1 に示し、そのコドン 1 2 及び 6 1 の変異を表 1 2 に示す。

【 0 0 4 8 】

【 表 1 1 】

表 1 1

膀胱腫瘍 の頻度と発生数

| | ラット数 (雄) | 発がんラット数 (%) | 腫瘍/ラットの数 | 膀胱癌発生数 |
|---------|----------|-------------|-----------------------|-------------|
| Hras128 | 20 | 19(95) | 13.2±6.8 ^a | 11/14(35.3) |
| Wild | 15 | 15(100) | 7.1±5.2 | 4/13(30.8) |

a : P < 0 . 0 0 0 1

【 0 0 4 9 】

【 表 1 2 】

表 1 2

Ha-ras 突然変異

| | 被験腫瘍数 | 導入遺伝子(ヒト) | | | 内在性(ラット) | |
|---------|-------|----------------------|-------|---------|----------------------|-------|
| | | コドン12 | コドン61 | 合計 | エクソン1 | エクソン2 |
| Hras128 | 21 | 2(9.5%) ^a | 0 | 2(9.5%) | 0 | 0 |
| Wild | 25 | - | - | - | 1(4.0%) ^b | 0 |

a : GGCからGACへ変異した。
b : GGAからGAAへ変異した。

【 0 0 5 0 】 遺伝子導入ラットはBBN誘発膀胱がんに対してやや感受性が高く、PCR-SSCP解析では導入遺伝子の変異は低頻度(7.4%)ながら認められた。

【 0 0 5 1 】 実施例 6

ファルネシルプロテイントランスフェラーゼ活性阻害剤 40 による発がん抑制作用が知られており (R . Mangués, et

al., Cancer Res., 58, 1253-1259, 1998)、本発明の遺伝子導入ラットについてファルネシルプロテイントランスフェラーゼ活性阻害剤である d - リモネンを用いて発がん抑制作用を試験した。その結果を次の表 1 3 に示す。

【 0 0 5 2 】

【 表 1 3 】

表 1 3 H r a s 1 2 8 トランスジェニックラットのMNU乳腺発がんおよび d - リモネン (ファルネシルトランスフェラーゼ活性阻害物質) の影響

| 処理 | ラット数 | ラット一匹当りの腫瘍数 | 平均腫瘍サイズ | |
|-----------------|------|-------------|--------------------------|----------------------------|
| | | | mm (直径) | mm ³ (体積) |
| 5% d - リモネン添加飼料 | 9 | 19.4 ± 6.71 | 8.23 ± 4.88 ^a | 269.5 ± 735.5 ^a |
| 基礎飼料 | 8 | 26.4 ± 8.52 | 10.7 ± 7.34 | 637.7 ± 1669 |

^a : P < 0 . 0 1

【 0 0 5 3 】 この結果により、d - リモネンが有意に発 5 0 がん抑制作用を示すことが示された。

【 0 0 5 4 】 実施例 7

がん誘発物質の経胎盤投与による影響を調べた。エチルニトロソ尿素を胎盤に投与し、各臓器における発がん数

を調べた。その結果を次の表 1 4 に示す。

【 0 0 5 5 】
【 表 1 4 】

表 1 4 ニトロソエチルウレア経胎盤投与による c-Ha-ras トランスジェニックラットの腫瘍発生

| 系 | 腫瘍をもつ動物数 / 総動物数 | 腫瘍の頻度 | | | | |
|----------|--------------------|-------|-------|------|------|------|
| | | 乳腺腫瘍 | 皮膚乳頭腫 | 腎腫瘍 | 脾腫瘍 | 中枢神経 |
| Hras128雌 | 6/9 | 5/9 | 0 | 2/9 | 2/9 | 3/9 |
| Wild128雌 | 0/7 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| Hras128雄 | 8/15 | 4/15 | 3/15 | 6/15 | 0/15 | 6/15 |
| Wild128雄 | 2/6 | 0 | 0 | 0 | 0 | 2/6 |

【 0 0 5 6 】 本発明の遺伝子導入ラットでは、雌、雄共に、短期間に各臓器での発がんが有意に増加することが示された。

【 0 0 5 7 】

【 発明の効果 】 本発明のヒト正常型 c - H a - r a s 遺伝子を導入したラットは、従来の遺伝子導入マウスではできなかった多くのがんに対する発がん物質のスクリーニング、発がんプロモーター及びがん予防・抑制物質のスクリーニングが可能となるのみならず、多数のがんの発がん機構の解析が可能などの利点を有し、本発明は産業上有用な遺伝子導入ラットを提供するものである。

【 図面の簡単な説明 】

【 図 1 】 図 1 の上段は、導入したヒト正常型 c - H a - r a s の遺伝子構造をノーザンプロット法にて示す。図 1 の下段は、遺伝子導入ラットの各器官における、導入遺伝子の発現を示したものであり、A、B は対照となる GAPDH の発現量を示す。

【 図 2 】 図 2 は、遺伝子導入 1 2 8 系ラットの MNU 投与による乳腺の高発がん感受性を示すものである。

【 図 3 】 図 3 は、遺伝子導入 1 2 8 系ラットの腫瘍部位と正常部位における導入遺伝子の発現をノーザンプロット法により示すものである。

【 図 4 】 図 4 は、ヒト c - H a - r a s 遺伝子のコドン 1 2 及び 6 1 の RFLP 解析の結果を示すものである。

【 図 5 】 図 5 は、DNA 希釈による RFLP 感受性の評価を示すものである。

【 図 6 】 図 6 は、遺伝子導入 1 2 8 系ラットの DMBA 投与による乳腺の高発がん感受性を示すものである。

【 図 7 】 図 7 は、遺伝子導入 1 2 8 系ラットの PhIP 投与による乳腺の高発がん感受性を示すものである。

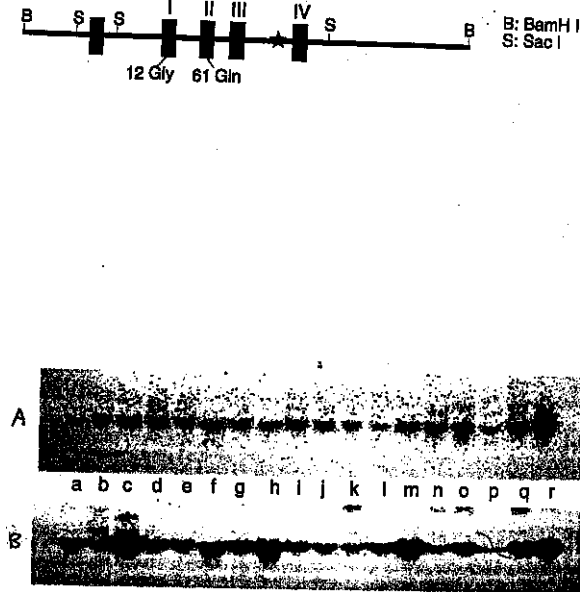
【 符号の説明 】

- a 子宮
- b 皮膚
- c 筋肉
- d 膀胱
- e 卵巣
- f 腎臓
- g 大腸
- h 小腸
- i 腺胃
- j 前胃
- k 脾臓
- l 肝臓
- m 心臓
- n 肺
- o 胸腺
- p 唾液腺
- q 小脳
- r 大脳
- Tg 本発明の遺伝子導入ラット
- Wild 遺伝子を導入していない野生型のラット

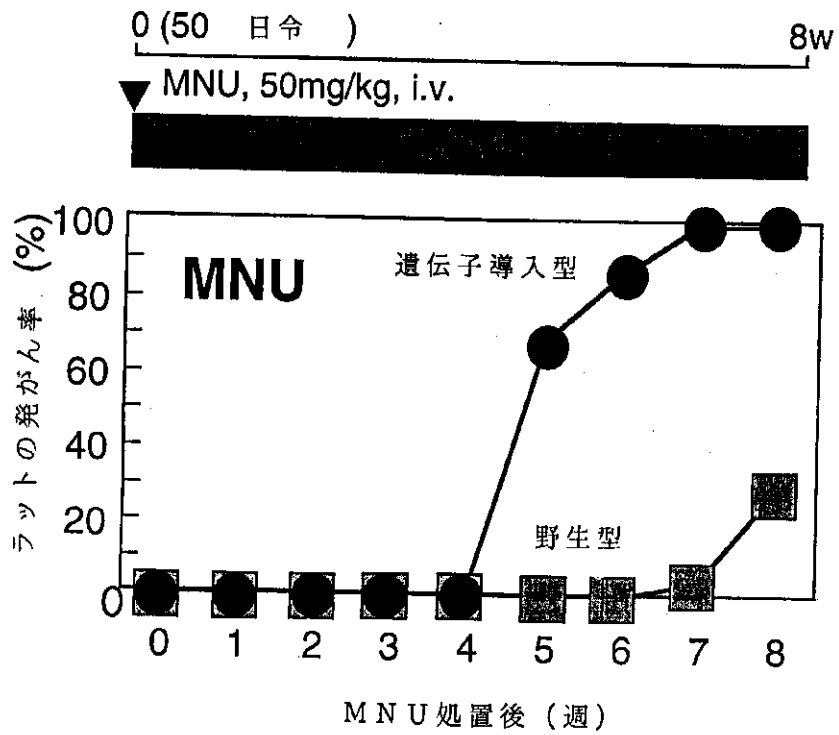
20

30

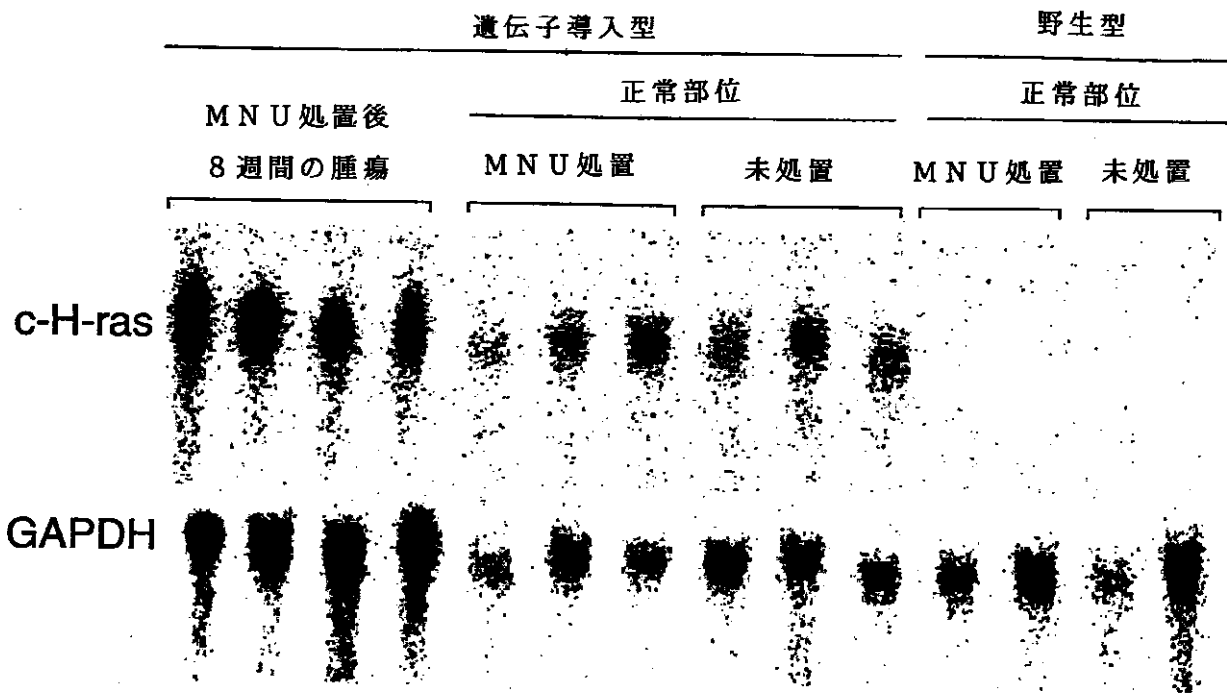
【 図 1 】



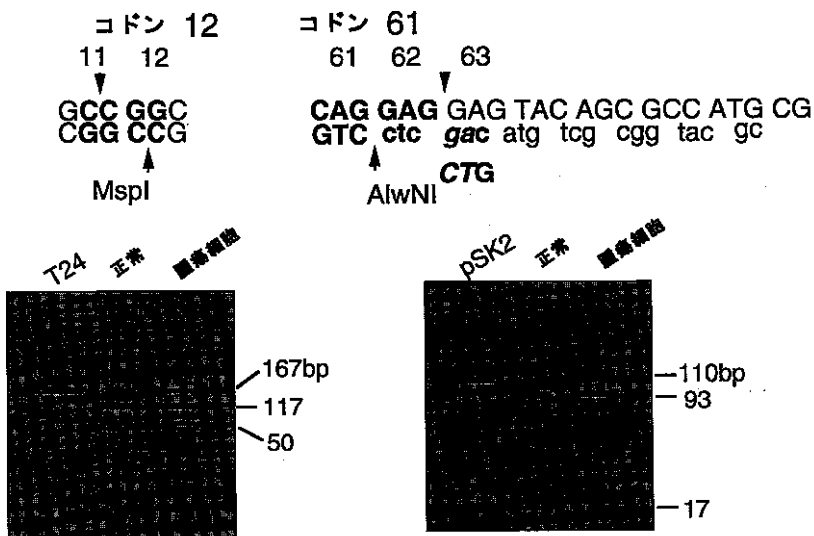
【 図 2 】



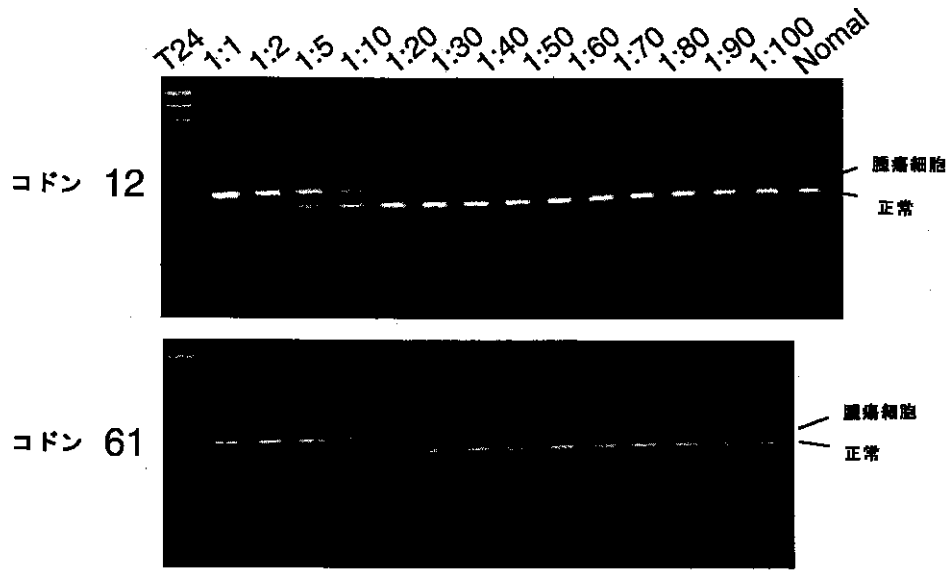
【図 3】



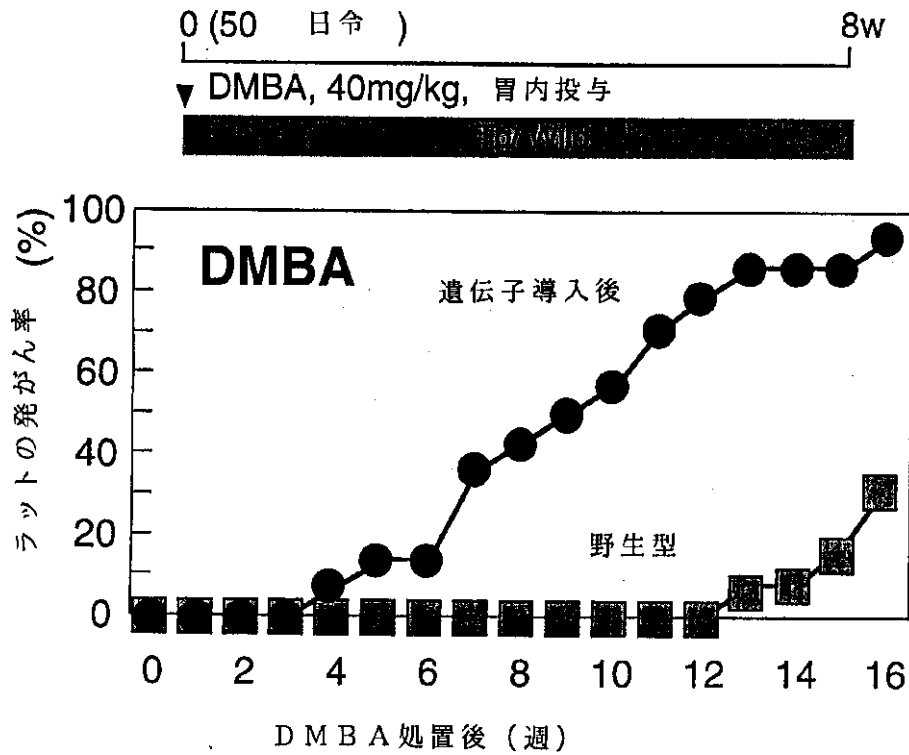
【図 4】



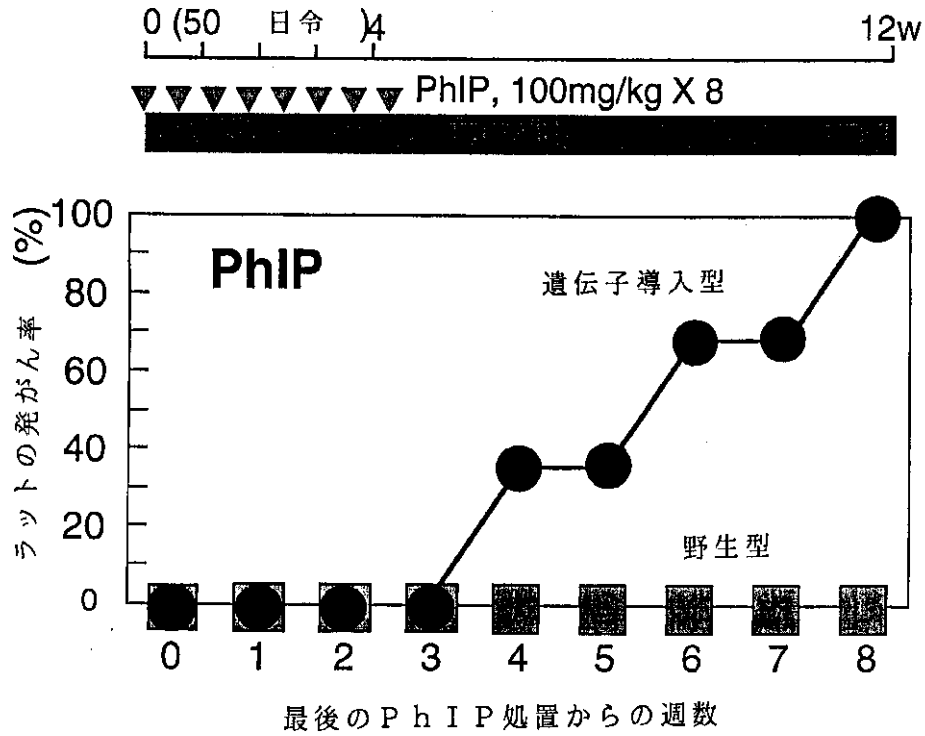
【図 5】



【図 6】



【図7】



フロントページの続き

(51)Int.Cl.⁶
C 1 2 R 1:91)

識別記号

F I

(72)発明者 鳥山 弘靖
千葉県松戸市日暮 4 - 2 - 5

(72)発明者 落谷 孝広
東京都中央区築地 5 - 1 - 1 国立がんセンター築地宿舎218号

(72)発明者 関谷 剛男
神奈川県藤沢市鵠沼海岸 7 - 17 - 20