

トランスジェニックマウスを用いた PNET と ヒルシュスプルング病の遺伝子連関の解析

(課題番号 10671665)

平成10年度～平成12年度科学研究費補助金 (基盤研究 (C) (2))
研究成果報告書

平成13年3月

研究代表者 金子道夫

(筑波大学臨床医学系 教授)

平成10－12年度科学研究費 補助金
基盤研究（C）（2）

研究成果報告書

1. 課題番号 10671665

2. 研究課題

トランスジェニックマウスを用いたPNETと
ヒルシュスプルング病の遺伝子関連の解析

3. 研究組織

研究代表者	金子道夫	（筑波大学臨床医学系教授）
分担研究者	渡邊芳夫	（名古屋大学小児外科）
研究協力者	金子節子	（筑波大学臨床医学系）
研究協力者	橋田かなえ	（筑波大学医科学研究科）

4. 研究経費

平成10年度	1700千円
平成11年度	1000千円
平成12年度	1000千円
計	3700千円

5 研究発表

1)論文

1. 金子道夫、金子節子、橋田かなえ、大川治夫、深水昭吉、梶原典子、杉山文博
神経原性腫瘍を特異的に発生するトランスジェニックマウス。
小児がん 35(2):174-179, 1998
2. 金子節子、金子道夫：
小児軟部腫瘍に対するキメラ転写産物検出による分子遺伝学的診断の有用性の検討
小児がん 37(4):504-508, 2001
3. Horiguchi H, Kaneko M, Matsui M, Fujiwara M, Ohtsubo R, Kamma H, Ogata T:
Establishment and characterization of a typical primitive neuroectodermal tumor cell line.
In vitro Cellular and Developmental Biology.-Animal 1998;34:439-442.
4. 金子節子、金子道夫、橋田かなえ
Primitive neuroectodermal tumorを特異的に発生する遺伝子導入マウスに対するエチルニトロソウレアの腫瘍発生修飾効果。
小児がん 投稿中
5. Michio Kaneko, Setsuko Kaneko, Kanae Hashida, , Noriko Kajiwara, Humihiro Sugiyama, Jun-ichi Hata, Akiyoshi Hukamizu
Primitive Neuroectodermal tumor in transgenic mice carrying the E1 gene of adenovirus with the human renin promoter.
Cancer Research submitted

2)口頭発表

1. 金子道夫、金子節子、橋田かなえ、大川治夫。
Primitive neuroectodermal tumorを特異的に発生する遺伝子導入マウスに 対するエチルニトロソウレアの腫瘍発生修飾効果。
第35回日本小児外科学会総会 1998.
2. Kaneko M. The role of pediatric surgery in the treatment of childhood tumors. (Round

table discussion). The First Joint Conference with PAPS on Pediatric Surgical Oncology.
(Beijing) 1999.

3. 金子道夫、金子節子：

キメラmRNA の検出による分子遺伝学的診断の臨床応用
第15回日本小児がん学会(大阪) 1999.11.18-19

4. 金子道夫、金子節子：

パラフィン包埋試料からの小児軟部腫瘍特異的なキメラ転写産物の検出
第16回日本小児がん学会(大宮) 2000.11.27-28

5. 佐野仁彦、麦島秀雄、平野幹人、山田亜古、七野浩之、陳基明、原田研介、吉田
行広、川野 寿、金子道夫：

右足背部に発症した滑膜肉腫の1例 キメラ遺伝子の検出
第16回日本小児がん学会(大宮) 2000.11.27-28

I はじめに

ヒトアデノウイルス 12 型 (Ad12) はマウスなどの齧歯類の末梢、中枢神経系に強い造腫瘍性があり、それにはウイルスゲノムの転写因子である E1A、E1B 遺伝子の関与が知られている。筑波大学応用生物化学系の深水、筑波大学動物実験センターの杉山等はレニン産生腎腫瘍を得ることを目的に、C57BL/6 マウスを用いて腎で特異的に発現すると考えられるヒトレニン遺伝子のプロモーターと Ad12 の E1A・E1B 融合遺伝子を組み込んだトランスジェニックマウスを作成したところ、予想に反して腎腫瘍は認められず、トランスジェニックマウスの嗅脳、後腹膜および骨盤部に primitive neuroectodermal tumor (PNET) が特異的に発生し、しかもこの発癌はマウスゲノムに組み込まれたアデノウイルス遺伝子による安定した遺伝性を有していた。E1A、E1B の遺伝子発現は腫瘍組織に限られ、またその腫瘍には c-myc、N-myc、L-myc 遺伝子発現の著しい上昇が見られた。

この発癌にはレニンプロモーターよりも Ad E1A、E1B が強く作用していると考えられる。E1A 蛋白は RB 癌抑制遺伝子蛋白と、E1B 蛋白はやはり癌抑制遺伝子である p53 蛋白と結合してその機能を阻害し、細胞を増殖に導くことが知られ、現在非常に活発な研究が行われているホットな分野である。導入遺伝子の作用と PNET 発癌のメカニズムを明らかにするため、このトランスジェニックマウスの非腫瘍組織、および腫瘍組織で RB、p53 がどのような変化を、どの時期に受けているかを知ることはきわめて重要である。また、導入した遺伝子はマウスの 7 番染色体に組み込まれているが、ヒトの PNET/Ewing 肉腫で特異的に検出される EWS/ETS family 融合遺伝子の検討をトランスジェニックマウスに発生する腫瘍でも行う必要がある。

さらに興味深いことに、トランスジェニックマウスの一部に腸管の拡張をきたして死亡するものがみられた。結腸下部が狭く、その口側の腸管は著しく拡張して、ヒルシュスプルング病に酷似した病態であった。ヒルシュスプルング病は ret 遺伝子の異常、エンドセリン B 受容体 (ETB-R) 遺伝子の異常に起因することが報告されており、臨床的にも neurocristopathy として、神経系腫瘍を含む広範な神経堤細胞の発生異常との関連が注目されている。

このトランスジェニックマウスは筑波大学で作成されたユニークなマウスで、類縁のトランスジェニックマウスは国内外ともに全くない。小児外科の立場で見ると、ウイルス遺伝子の組み込みにより神経系に特異的に発癌すること、腫瘍組織がヒトでは得にくい neuroectodermal tumor であること、生後比較的早期に発癌することから、小児の PNET/Ewing 肉腫、神経芽腫などの発癌モデルとして重要であるとともに、ヒルシュスプルング類縁疾患を発生するきわめて重要なトランスジェニックマウスが開発されたと考えられる。このトランスジェニックマウスを研究することで、腫瘍発生ならびにヒルシュスプルング病類縁疾患の病因論的解析が遺伝子レベルで急速に進展する可能性が非常に高い。

II 研究目的

ヒトレニン遺伝子のプロモーターと Ad12 の E1A・E1B 融合遺伝子を組み込んだトランスジェニック (TG) マウスを作成した結果、嗅脳、後腹膜および骨盤部に primitive neuroectodermal tumor (PNET) が特異的に発生し、しかもこの発癌はマウスゲノムに組み込まれたアデノウイルス遺伝子による安定した遺伝性を有していた。導入遺伝子蛋白のうち、AdE1A、E1B タンパクはそれぞれ癌抑制遺伝子タンパクの pRb、p53 と結合してその作用を阻害する。さらに、TGマウスの一部にヒルシュスプルング病に酷似した症例が発生した。

そこで、以下の4点の解明を目的に研究を行った。

1. 1-1) このTGマウスでの PNET の発生頻度、発生時期、発生部位、組織型、免疫組織学的特性について、さらに詳細な研究を行う。
1-2) TGマウスに見られる腸管拡張の病態を解明するため、拡張腸管の神経節細胞のアセチルコリンエステラーゼ活性、腸管関連神経伝達物質および ret 遺伝子異常の有無を調べる。
2. TG マウス発生腫瘍での E1A、E1B 遺伝子の関与と発癌のメカニズムを知るため、pRb のリン酸化により細胞周期の G1/S 期移行の促進に関与する cyclinD1 と、p53 の転写誘導を受けて細胞の G1 期停止に働く p21 遺伝子の発現を調べる。
3. 導入遺伝子蛋白のうち、E1B 蛋白は癌抑制遺伝子 p53 蛋白と結合してその機能を阻害する。一方、p53 欠損マウスに化学発癌物質であるエチルニトロソウレア (ENU) を経胎盤投与すると、脳内に glioblastoma が高率に発生することが知られている。そこで、E1B を発現する TG マウスでの、ENU の腫瘍発生修飾効果を調べる。
4. ヒトの PNET/Ewing で見られる特異的な EWS/ETS family キメラ遺伝子の検索を TG マウスで発生する PNET についても行い、EWS 遺伝子と ETS family 遺伝子の融合の可能性を調べる。

Ⅲ 研究成果報告

1. 神経原性腫瘍を特異的に発生するトランスジェニックマウスの腫瘍の性状および腸管拡張トランスジェニックマウスにおける腸管神経系の研究

【目的】 ヒトアデノウイルス 12 型 (Ad12)はマウスなどの齧歯類の末梢、中枢神経系に強い造腫瘍性があり、それにはウイルスゲノムの転写因子である E1A、E1B 遺伝子が関与していることが知られている。Fukamizu 等、Sugiyama 等は腎腫瘍を得ることを目的に、腎で特異的に発現すると考えられるヒトレニン遺伝子のプロモーターと Ad12 の E1A・E1B 融合遺伝子を組み込んだトランスジェニック (TG) マウスを作成したところ、予想に反して腎腫瘍は認められず、TGマウスの嗅脳、後腹膜および骨盤部に primitive neuroectodermal tumor (PNET)が特異的に発生し、しかもこの発癌はマウスゲノムに組み込まれたアデノウイルス遺伝子による安定した遺伝性を有していた。そこで、この TG マウスでの PNET の発生頻度、発生時期、発生部位、組織型、免疫組織学的特性についてさらに詳細な研究を行った。さらに、トランスジェニックマウスの一部に腸管が拡張し、ヒルシュスプルング病に酷似した病態で死亡するものが見られたため、拡張腸管の神経節細胞のアセチルコリンエステラーゼ活性、腸管関連神経伝達物質および ret 遺伝子異常の有無を調べ、ヒルシュスプルング病との病因論的関連性を検討した。

【材料および方法】

1) 実験動物

トランスジェニックマウス作成のため導入された融合遺伝子 (hRNE1AB) の構造を 図 1 に示す。hRNE1AB がヘテロに組み込まれたトランスジェニックマウスと wild type の C57BL/6J マウス (日本クレア) を交配させて得られた仔のうち、導入遺伝子が positive と判明した 154 匹を研究に用いた。交配には生後 10 週以上の性成熟に達したものを使い、全てのマウスは室温 23 ± 1°C、明期 12 時間、暗期 12 時間のサイクルのもとで、滅菌飼料および滅菌水を与えて飼育した。

2) DNA 分析

生まれた仔マウスは生後 28 日目に離乳させ、オス、メスを分けた。その後、尾の一部を切断してドットプロットハイブリダイゼーション法により導入遺伝子の有無を確かめた。尾部から DNA を常法に従って抽出し、アルカリ変性後、ナイロンメンブレン (Gene Screen Plus, DuPont) 上にスポットした。hRNE1AB のうち E1B 遺伝子の一部である 1.4-kb の HindIII DNA 断片 (図 1) をプローブとして FITC 標識し、ハイブリダイゼーション後アルカリフォスファターゼ結合-抗 FITC 抗体と反応させ、さらに蛍光基質 (AttoPhos) (Amersham Life Science) との反応で生成される蛍光物質を蛍光スキャニングシステム (Storm Scanning System, Molecular Dynamics) で検出した。交配で得られた仔マウスは全部で 394 匹、そのうち導入遺伝子 positive マウス

は 154 匹で、遺伝子導入率は 39% であった。

3) 病理解析

マウスを毎日仔細に観察し、体の外形、活動状態、動作などの異常の有無をチェックした。腫瘍発生日は、それが原因と考えられるマウスの異常に最初に気付いた日とし、その日を出生後の週齢で表した。異常が確定した時点でマウスの全身解剖を行い、腫瘍や病変の発生部位を特定し、写真撮影後、組織を 10% 中性ホルムアルデヒドで固定して HE 染色、PAS 染色および免疫組織染色用試料とした。また、解剖した全てのマウスについて、頭部を 10% 中性ホルムアルデヒドで固定後、70% エタノールで脱脂、0.3M EDTA-0.15M ピロリン酸カリウム液で脱灰してから頭骨を 2mm ごとにスライスし、断面をマクロで調べた後 HE 染色して脳・頭骨内腫瘍の有無を確認した。下肢マヒのマウスでは脊髄内腫瘍発生の可能性があり、脊髄を脊椎骨とともに取り出して同様に脱灰後 HE 染色した。体幹と嗅脳に発生した腫瘍から電子顕微鏡用試料を作成した。前者では摘出腫瘍を 2.5% グルタルアルデヒド/0.1M リン酸バッファ (pH7.4) 中で素早く細切し固定、後者では血管内に生食灌流に続いて 2% グルタルアルデヒド・2% パラホルムアルデヒド/0.1M リン酸バッファ (pH7.4) で灌流固定後頭蓋骨を開いて腫瘍を取り出し、細切、固定した。さらに 1% 四酸化オスミウム/0.1M リン酸バッファで後固定し、エタノール列で脱水し、エポキシ樹脂 (Epon 812)(TABB Laboratories) に包埋した。超薄切片を酢酸ウラニルおよびクエン酸鉛で染色後、電子顕微鏡(H-7000, HITACHI)で観察した。腸管拡張マウスについては、肛門側狭小腸管と口側拡張腸管を 10% 中性ホルムアルデヒドで固定した他、切り出してそのまま Tissue-Tek O.C.T. Compound (Miles) に包埋して-80°Cで凍結保存した。

4) 腫瘍の免疫組織学的検索

ホルムアルデヒド固定-パラフィン包埋腫瘍について、MIC2 (DAKO), protein gene product 9.5 (PGP9.5) (Biogenesis), tyrosine hydroxylase (TH)(Chemicon International), neuron-specific enolase (NSE)(DAKO), CD57 (Leu-7)(Becton Dickinson), glial fibrillary acidic protein (GFAP) (DAKO), neurofilament(NF)(DAKO), S100(DAKO), desmin (DAKO), vimentin (DAKO), myoglobin (DAKO)の発現を avidin-biotin-peroxidase complex (ABC) 法を用いて検索した。

5) 拡張腸管の免疫組織学的検索および組織化学的検出

肛門側狭小腸管と wild type の正常腸管を PLP 固定後 O.C.T. compound に包埋し、PGP 9.5, TH, S100, vasoactive intestinal polypeptide(VIP), calcitonin gene related peptide (CGRP), nitric oxide synthetase(NOS), microtubule-associated protein 2 (MAP2), c-Ret, synaptobrevinおよび synaptosin の発現を腫瘍の場合と同様に調

べた。O.C.T. Compound 包埋した腸管については、神経節細胞の acetylcholinesterase の酵素活性を Karnovsky-Roots 法により証明した。

【結果】

1) 腫瘍の発生頻度および発生時期

融合遺伝子 hrNE1AB をヘテロに持つトランスジェニックマウス 154 匹の剖検結果を表 1 に示す。腫瘍発生マウスは 154 匹中 134 匹、実にトランスジェニックマウスの 87% に達し、腫瘍はすべて PNET であった。腸管拡張症マウスは 8 匹(5%)で、そのうち 4 匹にはいずれも頭骨内に PNET が認められた。また、皮膚潰瘍、膿瘍、尿路や肺の感染症が 11 匹、水腎・水尿管症が 1 匹あったが、これらの病変は wild type の C57BL/6J マウスにも見られた。剖検しても診断のつかなかったマウスは 4 匹であった。PNET の発生は生後 7 週齢から 74 週齢で見られたが、その頻度を 10 週ごとの週齢別に比較すると (図 2)、生後 21-30 週と 31-40 週の PNET 発生頻度がそれぞれ 26.6%、25.3% と断然高く、生後 21 週から 40 週までの 20 週間にトランスジェニックマウスの半数以上にあたる 80 匹、52% に PNET が発生した。PNET の同時多発マウスは 14 匹、全体の 9.1%で、生後 10 週以前の早期発生例に最も多く見られ (5 匹)、この時期の PNET 発生例の 50%を占めた。8 匹に、直腸～結腸が狭小で、その口側の腸管が拡張するヒルシュスプルング病と酷似した腸管拡張による腹部膨満が観察された。この腸管拡張症は生後 9 日目(2 週)で見出された例が 1 例あったが、他の 7 例は全て生後 29 週齢以降の成体マウスで、新生児期にその多くが発症するヒトのヒルシュスプルング病とは発生時期が異なっていた。

2) PNET の発生部位

PNET の部位別発生頻度を 10 週ごとの週齢別に比較した結果 (図 3)、きわめて特徴的なパターンが見出された。同一個体の複数部位に発生した PNET はそれぞれ別々に数えた。PNET 発生部位は口元から尾の先まで体の全てに及んだが、生後 20 週齢までは腹部、骨盤部、四肢、体幹に発生する例がほとんどで、1-10 週齢までの 92%、11-20 週齢までの 69% をこれらの部位が占めた。しかし、生後 21 週を過ぎると頭部、特に脳・頭骨内腫瘍が激増し、生後 20 週齢まではわずかに 2 例、全体の 8%であった脳・頭骨内発生例が、21-30 週齢では 44%、31 週齢以降は 60% あるいはそれ以上に達した。21-30 週齢期は PNET 発生部位が最も多彩で、他の時期にはまれな脊髄発生が 3 例、縦隔内発生が 2 例あった。生後 21 週以降、腹部、四肢、体幹発生 PNET は全体で 4 匹に見られただけであったが、骨盤部発生 PNET は 21 週以後も全体の 21% (26 匹) に認められた。これは、オスマウスでの、膀胱下面に接し前立腺をまき込んで発生する PNET 例の増加によるものであった。生後 21 週齢以後は脳・頭骨内を含む頭頸部と骨盤部に発生する PNET が全体の 92% を占め、20 週齢までとは全く異なるパターンを示した。

3) PNET の形態学的特性

トランスジェニックマウスに発生した PNET は PAS 染色 negative であった。脳・頭骨内発生
の PNET はクロマチンに富む核と乏しい細胞質からなる小型の円形～紡錘形細胞が rosette
を形成する髄芽腫であった(図 4)。電子顕微鏡所見では medullo-ependymal rosette の lumen
に多数の cilia を認め、rosette 周囲の細胞には junctional complexes が存在し、上皮性の特徴
を有していた(図 5)。オスマウスの膀胱下面に接し前立腺をまき込んで生じた PNET では、比較
的大きな円筒形細胞からなる tubular rosettes が認められた(図 4)。脳・頭骨内と一部の骨盤
部以外に発生した PNET はすべて小円形～小多角形細胞が不規則に配列し未分化な形態を
有する末梢型 PNET (図 4) で、電子顕微鏡所見では glycogen、neuropil の発達が証明された
が、神経分泌顆粒はほとんどなかった(図 5)。

4) PNET の免疫組織学的特性

ホルムアルデヒド固定-パラフィン包埋した PNET の免疫組織学的検索を ABC 法により行っ
た結果、neurofilament protein の発現が undifferentiated type で認められたが、他の神経腫瘍
マーカーの発現はいずれの組織型でもほとんど見られず(表 2)、すべて分化度の低い PNET
であることが判明した。

5) 腸管拡張症マウス腸管の病理組織学的性状

腸管拡張症マウスの肛門側狭小結腸を HE 染色して観察した結果、狭小腸管壁内に明らかに
成熟した Auerbach 神経節細胞が存在した(図 6)。また、Karnovsky-Roots 法により
acetylcholinesterase 染色を行ってその活性を調べたが、acetylcholinesterase 活性の高い外
来性神経線維束の増生はなく(図 7)、トランスジェニックマウスで見られる腸管の病態はヒルシ
ュスプルング病そのものではないと考えられた。

6) 腸管拡張症マウス腸管の免疫組織学的特性

PLP固定-O.C.T.compound 包埋した肛門側狭小結腸と wild type の正常腸管について免
疫組織学的検索を行い両者を比較した結果、ヒルシュスプルング病で異常の見られる、狭小
結腸での腸管神経伝達物質の異常は認められず、両者に明らかな違いは見出せなかった
(表 3)。狭小結腸と拡張腸管でも同様な結果であった。

【考察】

本研究の結果、導入遺伝子 hrNE1AB をヘテロにもつトランスジェニックマウスの、実に 87%
に特異的に PNET が発生し、5% に腸管拡張症が見られた。約 8% に皮膚潰瘍、膿瘍、尿路や
肺の感染症、水腎・水尿管症が認められたが、これらは wild type の C57BL/6J マウスでも見ら
れる疾患であり、本来このトランスジェニックマウスでは、おそらくほぼ 100%近くの高頻度で
PNET が発生するものと考えられる。PNET は神経芽腫とも関連の深い腫瘍であるが、幼小児
には稀である。このトランスジェニックマウスで見られる発癌は遺伝子の組み込みによる、安定

した遺伝性のある発癌であり、神経系に特異的に発癌すること、ことに、ヒトでは得にくい neuroectodermal tumor であること、生後比較的早期から発癌することから、小児の PNET/Ewing 肉腫や神経芽腫などの発癌モデルとしてきわめて重要である。Ogawa は Ad12 を C3H/BiB 新生仔マウスの頭蓋内あるいは腹腔内に接種した結果、前者では 30.2% のマウスの脳・脊髄内、後者では 82.6% のマウスの腹腔内に、いずれも形態学的変異に富む neuroepithelial tumor が発生したと報告した。我々のトランスジェニックマウスで見られる PNET は発生部位に関連する2種類の形態学的特徴をもつが、Ogawa が報告した腫瘍と病理学的にはほぼ同一の組織型で、E1A、E1B 両遺伝子の発現が腫瘍組織でのみ確認されることから、トランスジェニックマウスの発癌には Ad12 の転写因子である E1A、E1B が共に強く作用していると考えられる。Fukamizu 等はヒト angiotensinogen プロモーターと E1A・E1B 融合遺伝子を組み込んだトランスジェニックマウスで、やはり PNET が発生したと報告した。このことは、PNET 発生には E1A、E1B が関与し、プロモーターの種類は関係しないことを示唆している。E1A、E1B 蛋白質は癌抑制遺伝子産物 Rb 蛋白質、p53 蛋白質とそれぞれ結合してその機能を阻害し、細胞周期の進行を引き起こすことが知られ、現在非常に活発な研究が行われているホットな分野である。また、この導入遺伝子はマウスの7番染色体に組み込まれているが、今後組み込み部位前後の遺伝子構造と、PNET や Ewing 肉腫に特異的な融合遺伝子との関連を検討する必要がある。トランスジェニックマウスの 5% にヒルシュスプルング病に酷似する腸管拡張症が観察された。しかし、そのほとんどは成体マウスでの発生例で、肛門側狭小結腸の壁内には成熟した Auerbach 神経節細胞が存在し、acetylcholinesterase 活性の高い外来性神経線維束の増生もなかった。また、腸管の神経伝達物質、神経関連蛋白・酵素を免疫組織学的に詳細に検索したが、正常マウスとの間に差を見出し得なかった。したがって、本病態はヒルシュスプルング病そのものではなく、その類縁疾患、あるいは敗血症や腹膜炎などが原因の二次的腸管拡張である可能性がある。しかし、この腸管拡張という病態は wild type や、hRNE1AB が negative の C57BL/6J マウスでは全く観察されないため、hRNE1AB の組み込みと腸管拡張との間には何らかの関連性があると考えられ、さらに研究を進める必要がある。PNET を特異的にしかもきわめて高頻度に発生するこのトランスジェニックマウスは筑波大学で作成されたユニークなマウスで、類縁腫瘍を発生するトランスジェニックマウスはわずしか報告されていない¹⁾。したがって、今後このマウスを用いた神経腫瘍の分子遺伝学的研究が急速に進展する可能性は非常に高いと思われる。

図1 融合遺伝子(hRNE1AB)の構造
 ヒトレニンプロモーターとヒトアデノウイルス type 12 の
 E1A・E1B からなる全長 8.5kb の融合遺伝子

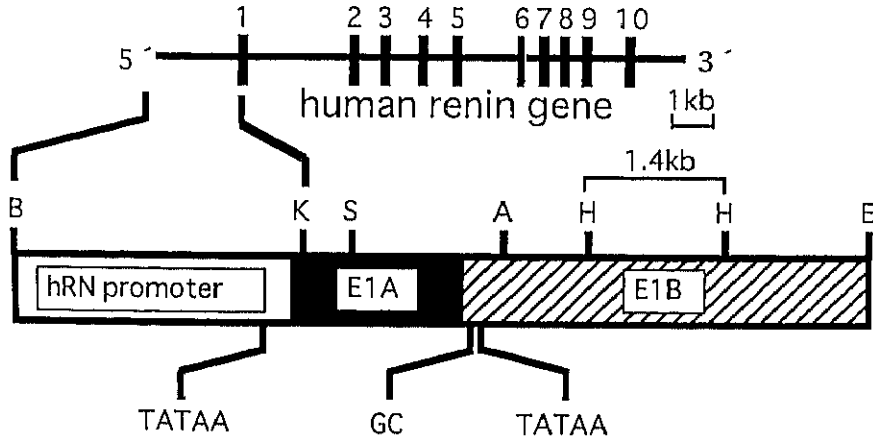


図2 PNET の発生週齢
 生後21週から40週までの20週間にトランスジェニックマウスの52%にPNETが発生した。

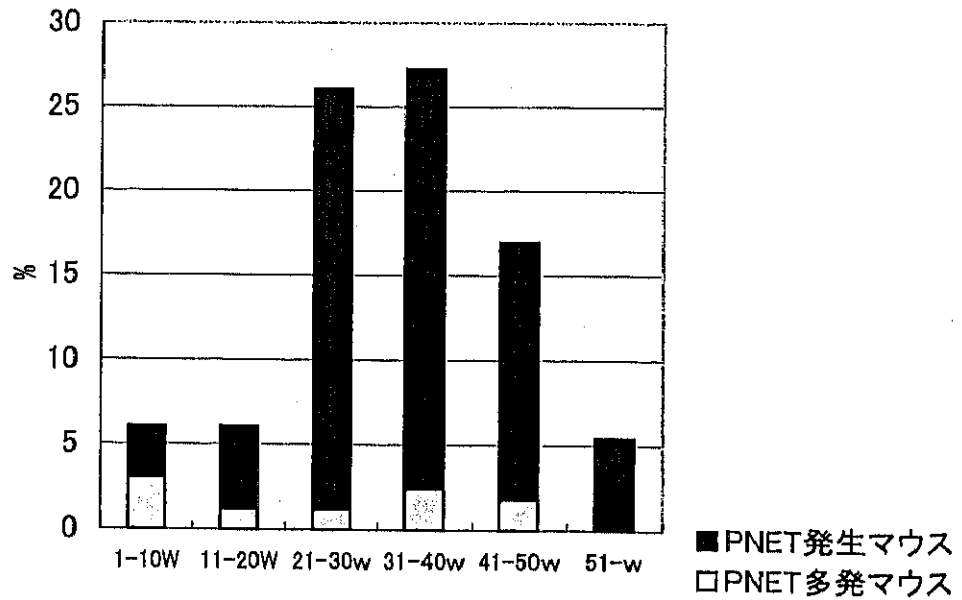


図3 PNET の部位別発生頻度

生後20週齢までは腹部、骨盤、四肢、体幹発生例がほとんどであったが、21週以降は頭部、特に脳・頭骨内発生PNETが激増し、20週までとは全く異なる頻度パターンを示した。

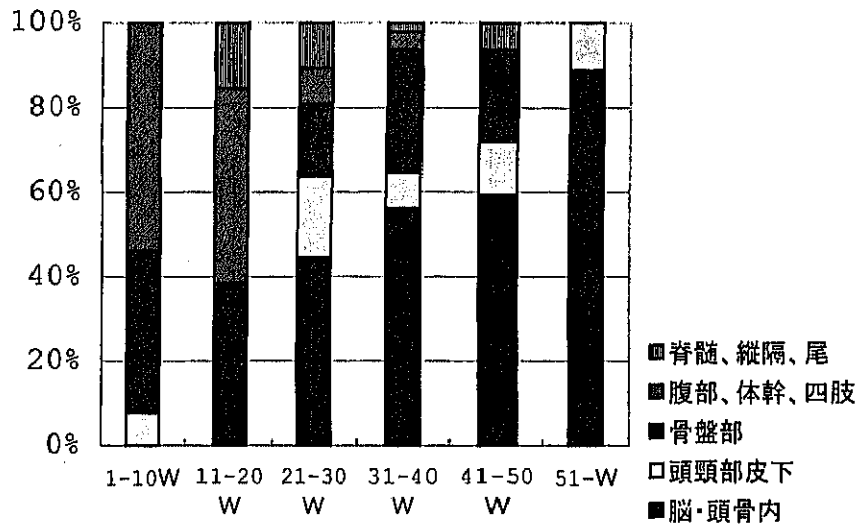


図4 PNETのHE染色像 (×100)

上： 脳・頭骨内発生PNET。小型の円形～紡錘形細胞がロゼットを形成している。

中： 雄の骨盤部発生PNET。medulloependymal type の tubular rosette が見られる。

下： 腹部原発のPNET。 undifferentiate type の末梢型PNET

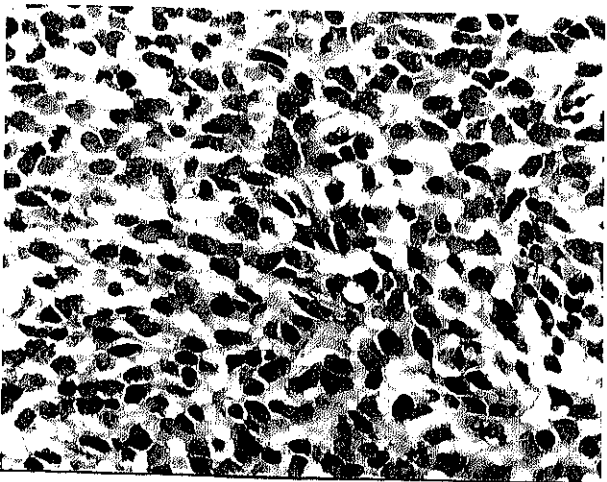
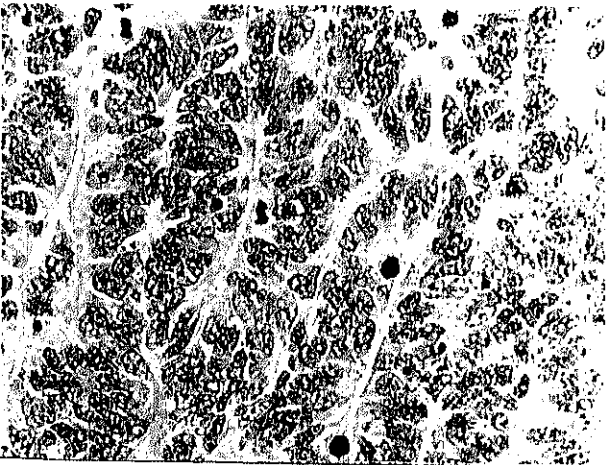
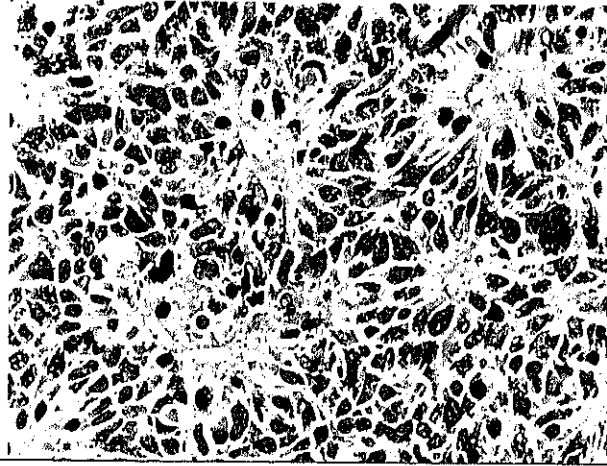


図5 PNETの電子顕微鏡像

上：脳内発生PNET (×9000) medulloependymal rosette の lumen に多数の cilia を認める。

下：体幹発生PNET (×8000) undifferentiate type で、glycogen, neuropil が発達するが、神経分泌顆粒はほとんどない。

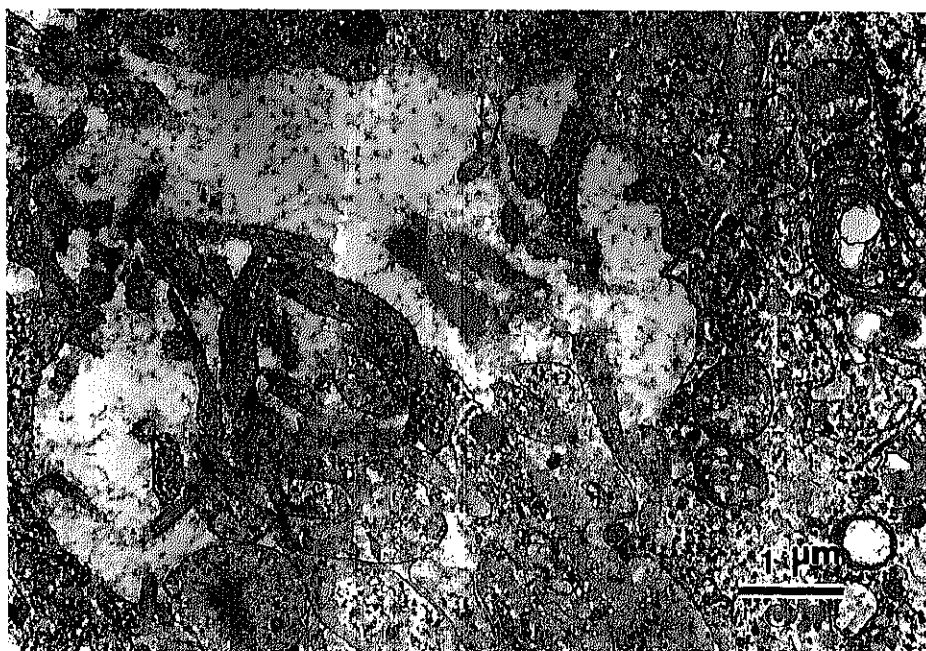


図6 腸管拡張症マウスの肛門側狭小腸管のHE像 (×100)
狭小腸管壁内に成熟した Auerbach 神経節細胞が存在する。

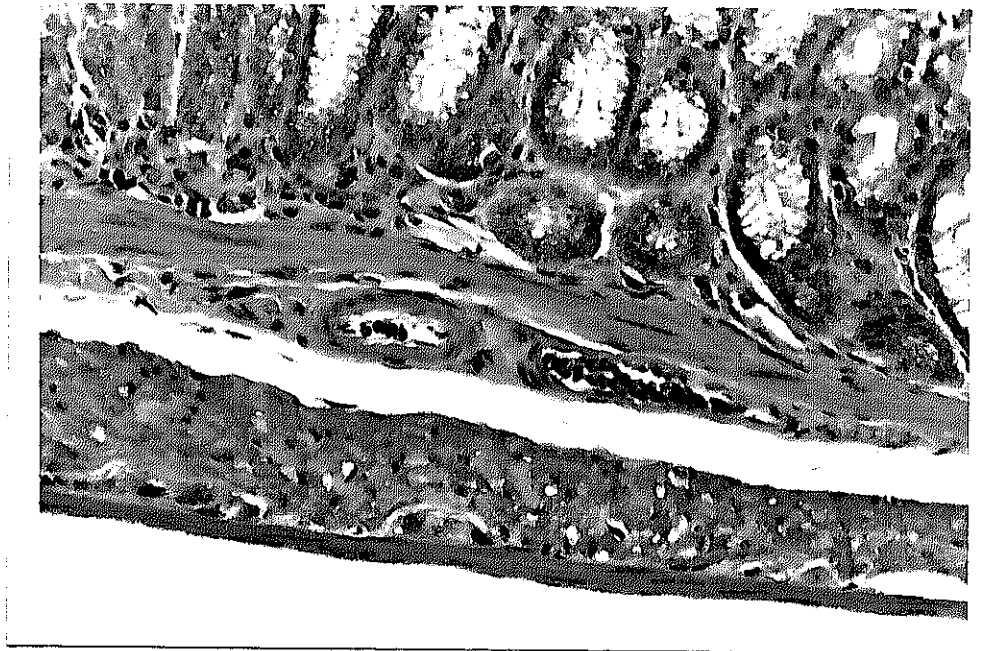


図7 Karnovsky-Roots 法による acetylcholinesterase の組織化学標本 (×100)
粘膜固有層に acetylcholinesterase 活性の高い外来性神経線維束は見られない。

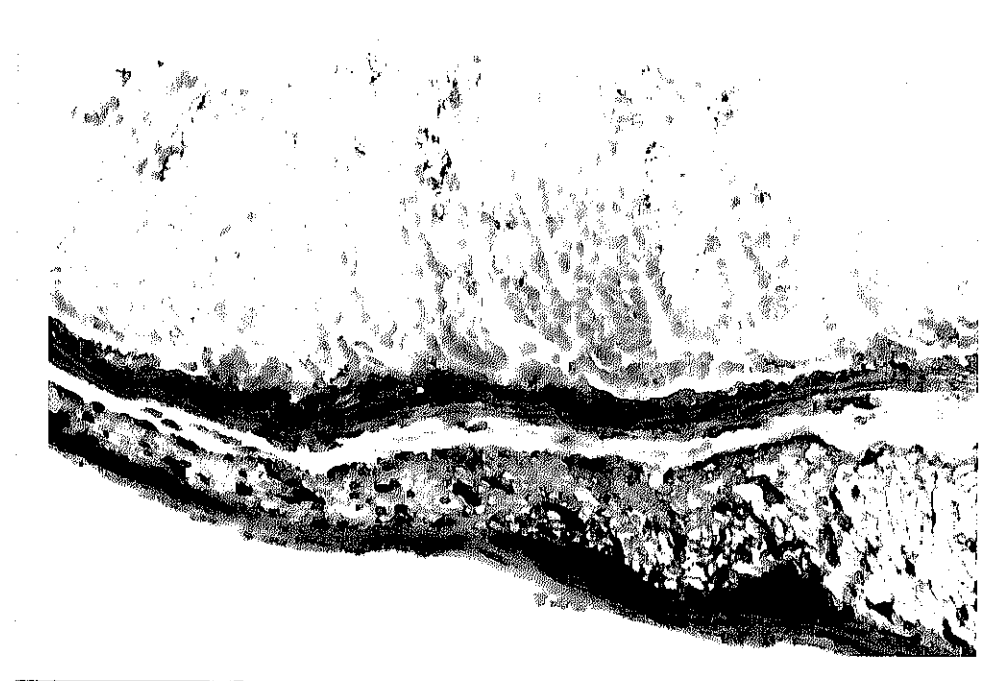


表1 トランスジェニックマウスの剖検結果

仔マウス総数	394
遺伝子導入マウス	154 (遺伝子導入率 39.1%)
PNET	134 (87.0%)
腸管拡張	8 (5.2%)
潰瘍・膿瘍・感染症	11 (7.1%)
水腎・水尿管症	1 (0.6%)
不明	4 (2.6%)

表2 PNETの免疫組織学的検索結果

発生部位	脳・頭骨内	骨盤部	その他
組織型	medullo- ependymal rosette	medullo- ependymal rosette	undifferentiated
MIC2	—	—	—
PGP9.5	±	±	±
TH	—	—	—
NSE	—	—	—
GFAP	—	—	—
NF	—	—	+
S100	—	—	—
desmin	—	—	—
vimentin	—	—	—
myoglobin	—	—	—

表3 ヒルシュスプルング病およびその類縁疾患に関連する
神経抗原の検索結果

	wild type	腸管拡張トランスジェニックマウス
PGP9.5	+++	+++
TH	++	++
S-100	-	-
NOS	++	+
VIP	+++	+++
c-Ret	++	++
CGRP	+++	+++
synaptobrevin	++	++
synaptosin	+++	+++
MAP 2	-	-

TH: tyrosine hydroxylase

NOS: nitric oxide synthetase

VIP: vasoactive intestinal polypeptides

CGRP: calcitonin-gene-related peptide

MAP: microtubule associated protein

2. Primitive neuroectodermal tumor を特異的に発生するトランスジェニックマウスに対するエチルニトロソウレアの腫瘍発生修飾効果の研究

【目的】

ヒトレニンプロモーターと human adenovirus type12 の *E1A*・*E1B* 融合遺伝子 (*hRNE1AB*) をヘテロに持つトランスジェニックマウスを作成したところ、高頻度に神経原性と考えられる悪性腫瘍 primitive neuroectodermal tumor(PNET) を発症した。*E1A*、*E1B* 遺伝子タンパクはそれぞれ癌抑制遺伝子タンパク pRb、p53 と結合してその働きを抑制する。

N-ethyl-N-nitrosourea(ENU) は発癌を誘発するアルキル化剤であり、マウスでは肝臓癌、肺腺腫、リンパ腫を引き起こすことが報告されている。Oda らの研究によると p53 遺伝子のノックアウトマウスに ENU を投与すると、ヘテロで欠損したマウスでは 3.6%、ホモでは 64.7% のマウスで、脳に特異的に glioblastoma の発生が見られた。しかし、ENU 非投与の場合はいずれも全く glioblastoma を発症しなかった

我々のトランスジェニックマウスには *E1B* 遺伝子が導入されており、p53 遺伝子欠損マウスと同様に p53 の機能が抑制されている可能性がある。そこで、この融合遺伝子をヘテロに持つトランスジェニックマウスと wild type を交配させ、妊娠したメスに発癌物質である ENU を投与し、胎盤を通して胎児に起こる腫瘍発生修飾効果を、発生時期、腫瘍の種類、組織型について非投与の場合と比較して検討した。

[材料および方法]

1) 実験動物および ENU 投与

実験にはトランスジェニックマウスと同じ C57BL/6J 系マウスを使用した。*hRNE1AB* 遺伝子をヘテロに持つ雌マウスと wild type の雄マウス、または *hRNE1AB* 遺伝子をヘテロに持つ雄マウスと wild type の雌マウスを雄雌 1 匹ずつ同じケージに入れ、交配させた。翌日を妊娠 0.5 日目として 3.5 日後(同居させてから 4 日目) に雄と雌を分け、その後雌マウスは出産まで単独で飼育した。妊娠した 21 匹の雌マウス全匹に対し、妊娠 14.5 日後に N-ethyl-N-nitrosourea(ENU) を注射器を用いて腹腔内投与した。妊娠中の雌マウスの投与日の体重を計測し、ENU を 25mg/kg になるように生理的食塩水 (0.9%NaCl) に溶解して投与した。

2) 仔マウスの飼育および観察

全ての妊娠雌マウスについて出産の状況、出生仔の生存の状況を観察した。生まれた仔マウスは、生後 0 日目から 28 日間母マウスと一緒に飼育した後、離乳させた。雄雌別に数匹ずつ同一のケージにて飼育した。生後 28 日目に尾を切断してドットプロットハイブリダイゼーション法により導入遺伝子の有無を確かめた。ENU 投与の雌マウス

から生まれ、生後一週間以上生存した仔マウスは 167 匹、このうち、遺伝子がヘテロで導入されていたマウスは 62 匹、遺伝子が導入されていないマウスは 105 匹で、これら 2 群の腫瘍発生経過を観察し、腫瘍発生後は剖検して肉眼および HE 染色により発生部位および腫瘍の種類、組織型を確認した。また ENU 非投与で生まれた遺伝子導入マウス 165 匹を ENU 非投与群とし、同様に経過を観察した。マウスの体に腫瘍を認めた日、または腫瘍が原因で体が不活発になったと思われる日を出生後の週齢で特定し、発見数日後あるいは十数日後に個体の全身解剖を行い、肉眼および HE 染色により腫瘍の発生部位を特定した。

統計学的検定は、各群の生存期間(週)における腫瘍発生マウスの割合 について Kaplan-Meier 法の Logrank(Mantel-Cox) 検定(両側検定)を行い、有意水準 5%として検定した。

【結果】

1) 得られた仔マウスおよび腫瘍発生頻度

妊娠雌マウス 21 匹に ENU を投与した結果、216 匹の仔マウスが得られた。このうち 8 日以上生存した仔マウスは 167 匹で、遺伝子導入(positive)マウスは 62 匹、negative マウスは 105 匹で、遺伝子導入率は 37%であった。ENU 投与群 167 匹全例を解剖し、腫瘍発生の有無を精査したが、このうち PNET 発生マウスは 56 匹で、全て遺伝子 positive マウスであり、遺伝子導入マウスの実に 90%を占めていた(表 1)。ENU 投与群では、非投与群では全く観察されなかったリンパ腫、肺腺腫および肝・小腸腺腫が観察され、特に肺腺腫は遺伝子 positive マウスの 53%、negative マウスの 68%に認められた。導入遺伝子 negative のマウスでは PNET は全く発生しなかった。negative のマウス 105 匹のうち、異常を発見して解剖したのは 5 匹のみで、残りの 100 匹は外見上何の異常もなく飼育を続け、生後 1 年を経過した時点で全て解剖した。p53 欠損マウスで見られたような、ENU 投与による glioblastoma の発生はなかった。

一方、ENU 非投与の遺伝子 positive マウス群では、165 匹のうち 145 匹(88%)に PNET が発生した。ENU 投与で観察されたリンパ腫、肺腺腫あるいは肝・小腸腺腫は全く観察されなかった(表 1)。

ENU 投与と非投与のトランスジェニックマウスについて PNET 発生累積生存率を調べ、Kaplan-Meier 法の Logrank(Mantel-Cox) 検定を用いて有意差検定を行った。ENU 投与群の PNET 発生時期の方が早い傾向があったが、 $p=0.15$ で投与群と非投与群に有意差は見られなかった(図 1)。

2) 腫瘍発生時期と発生部位

ENU 投与群、ENU 非投与群とも、20 週齢以前と 21 週齢以降で腫瘍発生部位のパターンは大きく異なっていた。両群とも、20 週齢以前の PNET の 50%以上は腹部、体幹、四肢あるいは骨盤部発生で、脳・頭骨内発生 PNET は全体の 8%以下であったが、21 週齢以降は

脳・頭骨内に発生する PNET の割合が激増し、10 週ごとに区切って PNET の発生頻度を調べると、いずれも 40% 以上は脳・頭骨内発生 PNET で占められていた。さらに、両群とも、生後 21 週齢以後は脳・頭骨内を含む頭頸部と骨盤部に発生する PNET が全体の 90% を占め、20 週齢までとは全く異なるパターンを示した(図 2)。ENU 投与、非投与による PNET 発生部位および腫瘍発生頻度に有意差は見られなかった。

3) 腫瘍の種類、組織型について

発生した腫瘍の種類は、PNET、リンパ腫、肺腺腫および肝・小腸腺腫の 4 種類であった。導入遺伝子 positive 群では ENU 投与の有無に関わらず高頻度に PNET を発生した。また、ENU 投与群では遺伝子導入に関係なく、リンパ腫、肺腺腫、肝・小腸腺腫(図 3) を発生した。ENU 投与の有無に関わらず導入遺伝子 positive マウスに発生した PNET のうち、脳・頭骨内、および骨盤部に発生した腫瘍の一部はいずれも medullo-ependymal rosette を形成し、それ以外の部位の腫瘍は全て rosette を形成しない PNET であった(図 4)。

【考察】

融合遺伝子 hRNE1AB が導入されたトランスジェニックマウスには E1B 遺伝子が導入されており、p53 遺伝子ノックアウトマウスと同様に p53 の機能が抑制されている可能性がある。また E1A 遺伝子も導入されており、Rb の機能が抑制されている可能性もある。

N-ニトロソ化合物である ENU には強い発癌性があり、齧歯類では腫瘍発生動物モデルとして 1964 年以來多く用いられてきた。本研究の目的は融合遺伝子 hRNE1AB をヘテロに持つトランスジェニックマウスを用いて ENU の経胎盤投与を行い、胎児に引き起こされる腫瘍発生修飾効果を、発生時期、部位、腫瘍の種類、組織型について非投与の場合と比較して検討することである。

妊娠雌マウス 21 匹に ENU を投与し 8 日以上生存した仔マウスは 167 匹、62 匹の遺伝子導入 (positive)マウスと 105 匹の遺伝子非導入 (negative)マウスが得られ、遺伝子導入率は 37% であった。ENU 投与群 167 匹のうち PNET 発生マウスは 56 匹で、全て遺伝子 positive マウスであり、遺伝子導入マウスの実に 90% を占めていた。ENU 投与群では、非投与群では全く観察されなかったリンパ腫、肺腺腫および肝・小腸腺腫が観察され、特に肺腺腫は遺伝子 positive マウスの 53%、negative マウスの 68% に認められた。これらの腫瘍は、全て ENU による発癌としてすでに知られている腫瘍であり、発生頻度は導入遺伝子の有無に関係なく両方のグループでほぼ同じ値であった。導入遺伝子 negative のマウスでは PNET は全く発生しなかった。negative のマウス 105 匹のうち、異常を発見して解剖したのは 5 匹のみで、残りの 100 匹は外見上何の異常もなく飼育を続け、生後 1 年を経過した時点で全て解剖した。

一方、ENU 非投与の遺伝子 positive マウス群では、165 匹のうち 145 匹(88%) に PNET

が発生した。PNET の発生率は ENU 投与群と非投与群で差が見られなかった。ENU 投与で観察されたリンパ腫、肺腺腫あるいは肝・小腸腺腫は全く観察されなかった。wild type のマウスに ENU を投与するとリンパ腫、肺腺腫その他の腫瘍を発生するという報告から、遺伝子 positive 群、negative 群のいずれでもこれらの腫瘍が同様に発生したのは ENU を投与したためと考えられる。

Oda らの研究によると、p53 遺伝子を欠損したノックアウトマウスに ENU を経胎盤投与すると、脳に、特異的に、glioblastoma を引き起こすという報告があり、ホモで 64.7%、ヘテロで 3.6% の仔マウスに発生した。E1B 遺伝子の発現により p53 遺伝子の機能が抑制されている可能性がある、我々のトランスジェニックマウスに ENU を投与すると、同様に glioblastoma が発生する可能性が考えられたが、ENU を投与しても glioblastoma の発生は全く見られず、ENU 投与の有無で腫瘍の種類、組織型にも変化は見られなかった。

癌抑制遺伝子 Rb をヘテロで欠損したマウスは、ほぼ 100% 下垂体腫瘍を発生する。このマウスに ENU を投与すると、下垂体腫瘍がやはり高頻度に発生するが、発生時期が早くなったという報告がある。Riley によると、ENU により引き起こされる腫瘍は Rb 遺伝子の影響を受けないが、Rb 遺伝子により引き起こされる腫瘍は ENU によりその増殖が促進されるという。その理由として Riley は、Rb 遺伝子欠損マウスにおいて、ENU は下垂体腫瘍を発癌させるのに必要な変異を引き起こす、または、Rb の欠損した状態で完全な形質転換が起こり、そこで ENU が増殖速度に変化を与えた、と述べている。

同じ癌抑制遺伝子である p53 ノックアウトマウスに ENU と同じアルキル化剤の dimethylnitrosamine を投与した結果、p53 遺伝子の欠損により、アルキル化剤により引き起こされる腫瘍の増殖速度が早まったとの報告がある。我々のトランスジェニックマウスで ENU 投与と非投与の場合について PNET 発生累積生存率を調べ、Kaplan-Meier 法の Logrank(Mantel-Cox) 検定を用いて有意差検定を行った結果、ENU 投与群の PNET 発生時期の方が早い傾向があったが、 $p=0.15$ で投与群と非投与群に有意差は見られなかった。

以上のことから、ヒトアデノウイルス 12 型の E1A、E1B 遺伝子を組み込んだトランスジェニックマウスに ENU を投与しても、pRB および p53 の機能は抑制されず、このトランスジェニックマウスの発癌と ENU の作用は独立した事象であると考えられた。

図1 ENU 投与と非投与のトランスジェニックマウスの累積生存率

ENU 投与群の PNET 発生時期の方が早い傾向があったが、 $p=0.15$ で投与群と非投与群に有意差は見られなかった。

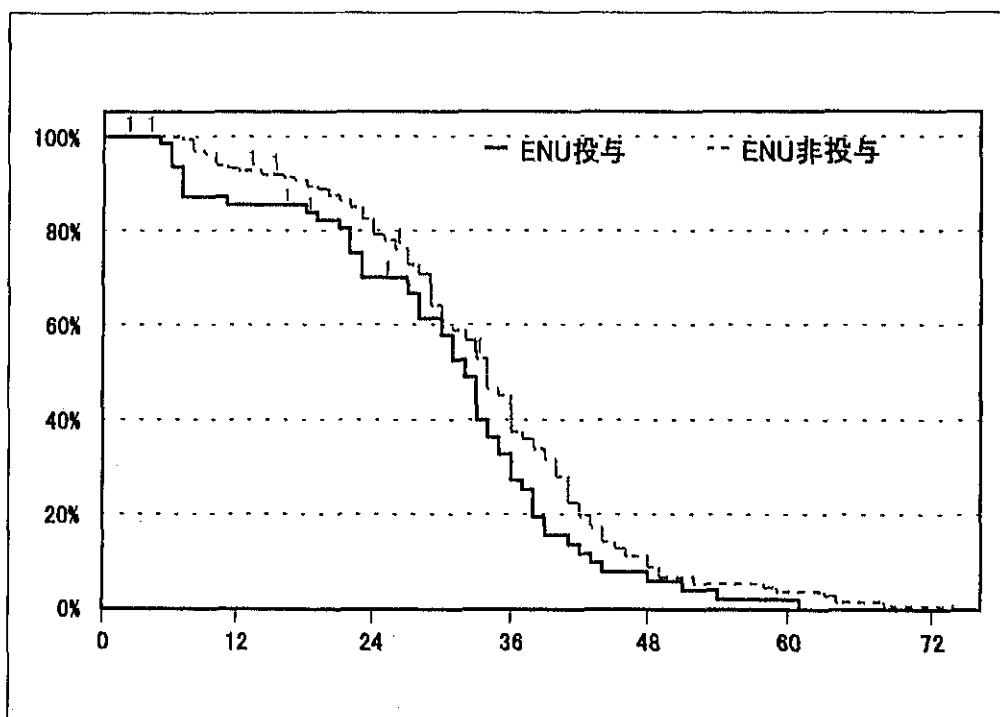


図2 ENU 投与群と ENU 非投与群の部位別 PNET 発生頻度

上：ENU 投与群 下：ENU 非投与群

両群とも、20 週齢以前の PNET の 50% 以上は腹部、体幹、四肢あるいは骨盤部発生であるが、21 週齢以降は脳・頭骨内に発生する PNET の割合が激増し、脳・頭骨内を含む頭頸部と骨盤部に発生する PNET が全体の 90% を占め、20 週齢までとは全く異なるパターンを示す。ENU 投与、非投与による PNET 発生部位に有意差は見られない。

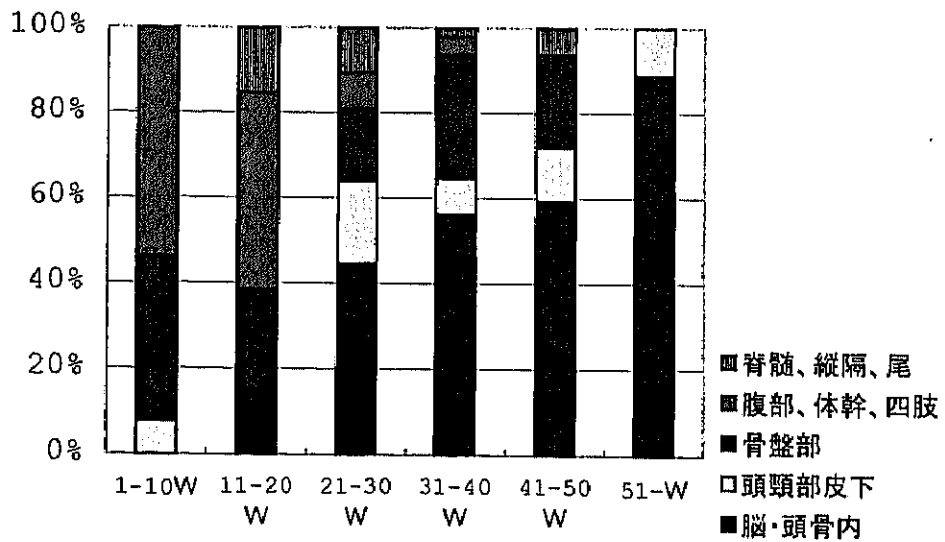
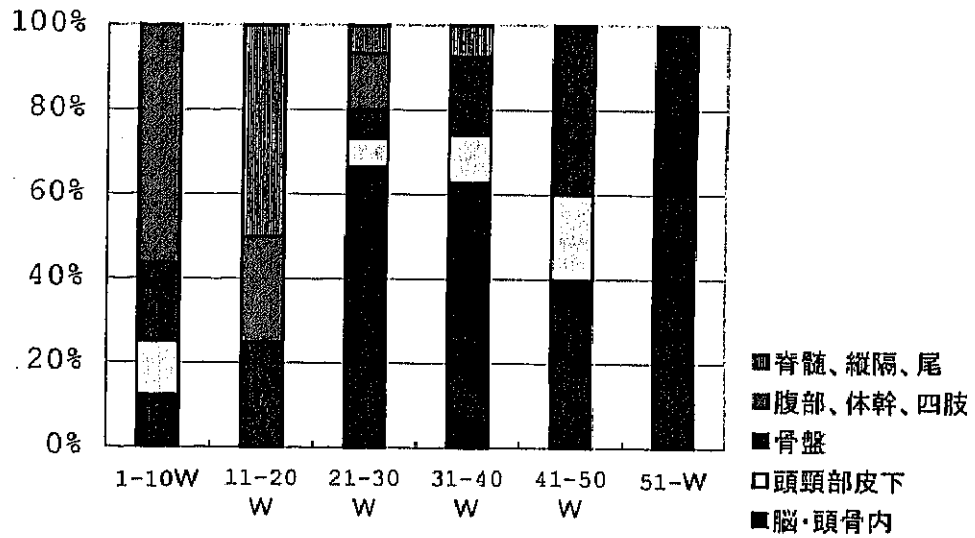


図3 ENU投与群に発生した腫瘍

上：リンパ腫 中：肺腺腫 下：小腸腺腫

ENU投与群では遺伝子導入に関係なく、リンパ腫、肺腺腫、肝・小腸腺腫を発生した。

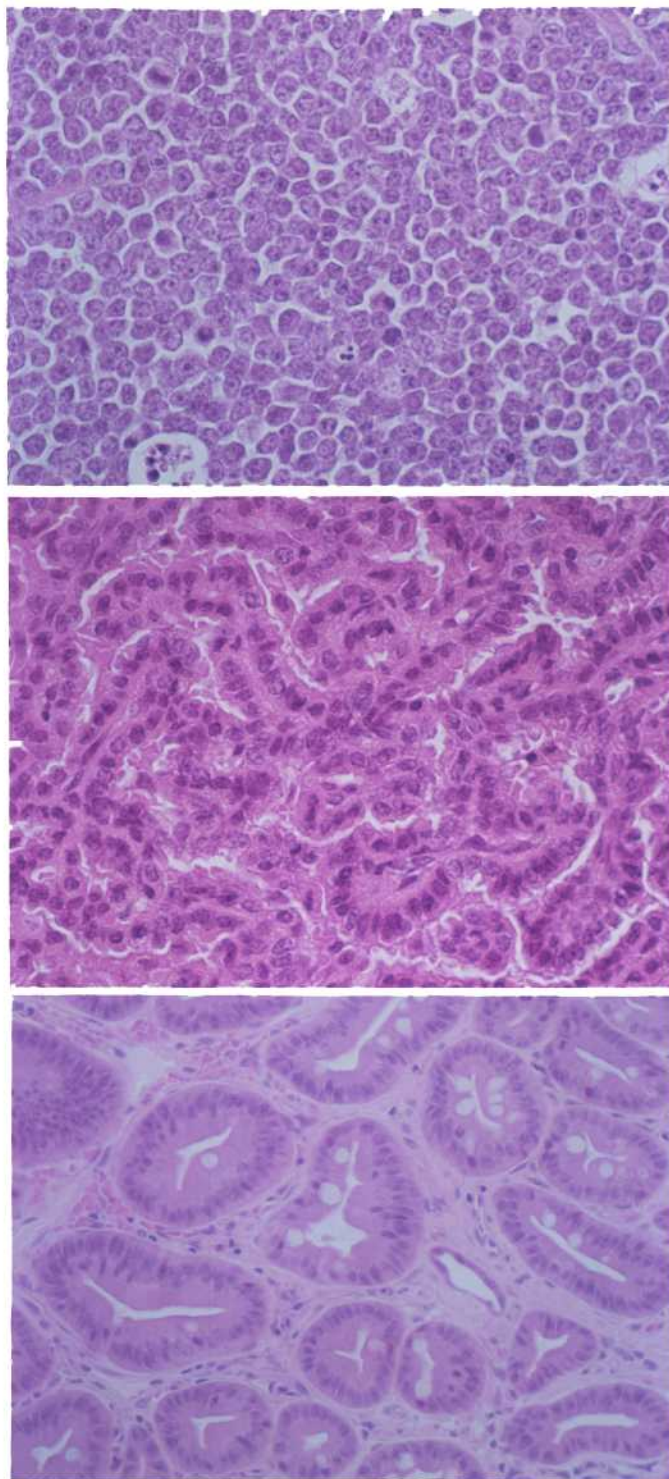


図4 導入遺伝子 positive マウスに発生した PNET

上：脳内発生 PNET 下：頭頸皮下発生 PNET

導入遺伝子 positive マウスに発生した PNET のうち、脳・頭骨内、骨盤の一部に発生したものはいずれも medullo-ependymal rosette を形成し、それ以外の部位の腫瘍は全て rosette を形成しない PNET であった。

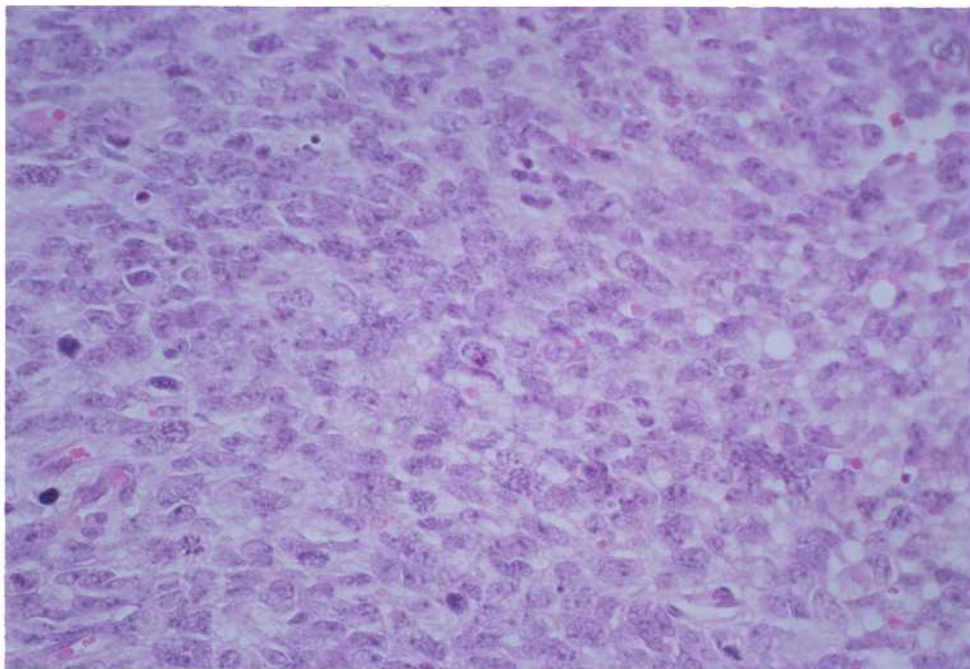
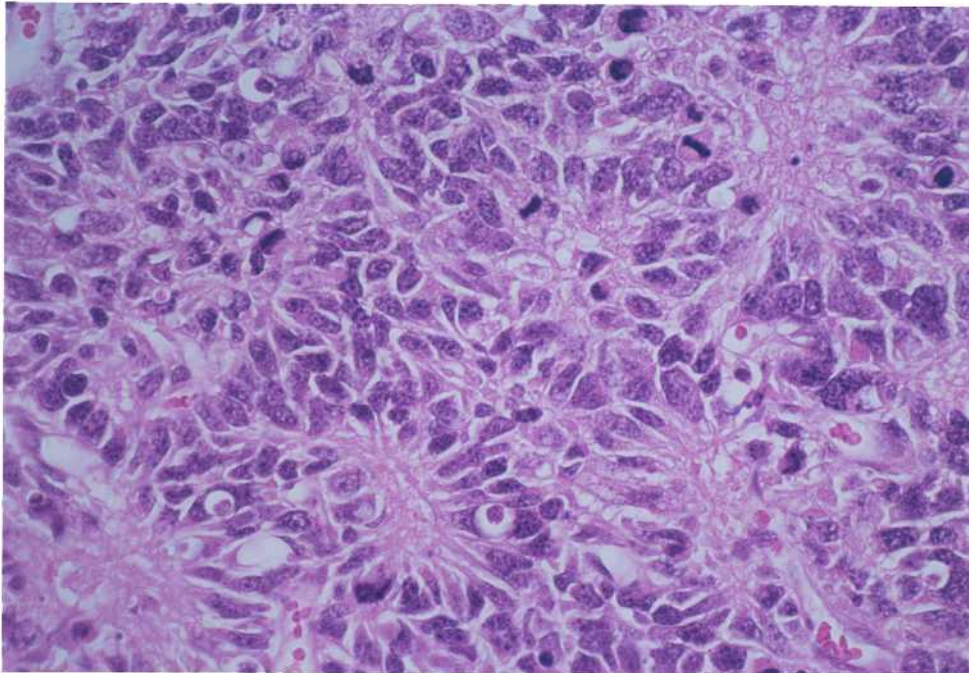


表1 ENU投与群と非投与群の発生腫瘍

hRNE1AB	ENU投与群		非投与群
	有	無	有
仔マウス数	62	105	165
PNET	56 (90%)	0	145 (88%)
リンパ腫	2 (3%)	2 (2%)	0
肺腺腫	33 (53%)	71 (68%)	0
肝・小腸腺腫	3 (5%)	4 (4%)	0

3. ヒトレニンプロモーターとヒトアデノウイルス 12 型 E1A・E1B 融合遺伝子を組み込んだトランスジェニックマウス発生腫瘍のサイクリン D1 および p21 遺伝子発現

【目的】

ヒトレニンプロモーターと Adenovirus(Ad)12 型の E1A・E1B 融合遺伝子をヘテロに持つトランスジェニック(TG)マウスでは、88%もの高頻度で体の様々な部位に特異的に PNET が発生する。Ad E1A、Ad E1B タンパクはそれぞれ pRb、p53 と結合してその働きを阻害する。細胞周期の G1 期から S 期への移行で働く G1 サイクリンのひとつである cyclinD1 はサイクリン依存性キナーゼ 4(Cdk4)あるいは 6(Cdk6)と複合体を形成して活性化する。cyclinD1/Cdk4 複合体は pRb を標的基質としてこれをリン酸化し、G1/S 期移行を促進する。また、p21 遺伝子は p53 の転写誘導を受け、cyclinD1/Cdk4 複合体に結合することでキナーゼ活性を阻害し、細胞を G1 期で停止させる。E1A、E1B 遺伝子を高発現している我々のトランスジェニック(TG)マウス発生 PNET での cyclinD1 および p21 の遺伝子発現を real time 定量 RT-PCR 法を用いて調べ、発癌との関連性を検討した。

【材料および方法】

1) RNA の抽出および real time 定量 RT-PCR 反応

市販の RNA 抽出試薬 ISOGEN (Nippongene, Tokyo, Japan)を用い、TG マウス発生腫瘍、TG マウス発生腫瘍由来株細胞 TRN、TG マウスの正常脳と肝臓およびマウス神経芽腫由来株細胞 C1300 からフェノール/チオシアン酸グアニジン法により RNA を抽出した。Dnase 処理後、それぞれ 900 ng の total RNA から、逆転写酵素と oligo(dT)₁₆ を用いて cDNA を合成し、その 1 μ l を real time 定量 RT-PCR 反応に使用した。real time 定量 RT-PCR は SYBR GREEN PCR core reagents kit (PE Applied Biosystems, Foster City, CA)を用い、マウス神経芽腫由来株細胞 C1300 細胞を standard として ABI PRISM 7700 Sequence Detection System (PE Applied Biosystems) を使用して行った。サーマルサイクルの条件は、95℃で 30 秒間変性、59℃で 30 秒間アニーリング、72℃で 1 分間伸長を 40 回繰り返した。

2) RT-PCR 反応に用いたプライマー

real time 定量 RT-PCR 反応で用いたプライマーは、

cyclin: 5'-TGCGAGCCATGCTTAAGACTG-3'(sense)
5'-CAAGAAACGGTCCAGGTAGTT-3' (anti-sense),
p21: 5'-AGTTGCGCCGTGATTGCGAT-3'(sense)
5'-AGGAAGTACTGGGCCTCTTGT-3'(anti-sense)

であった。

【結果】

cyclinD1、p21 共に、マウス神経芽腫由来株細胞 C1300 を standard とし、GAPD を内在性コントロールとして遺伝子発現量を調べた。その結果、cyclinD1/GAPD 遺伝子発現比はマウス神経芽腫株細胞 C1300 が 0.887 であったのに対し、TG マウス発生腫瘍、TG マウス発生腫瘍由来株細胞 TRN ではそれぞれ 0.0288, 0.0806 で極端に cyclinD1 の発現が抑制されており、分化を遂げた TG マウスの正常脳と正常肝の値 0.0456, 0.029 と同程度でほとんど 0 といえた。一方、p21/GAPD 遺伝子発現比は C1300 が 1.015、TG マウス発生腫瘍、TG マウス発生腫瘍由来株細胞 TRN ではそれぞれ 0.547, 4.743 で、TRN で高値を示した。TG マウスの正常脳と正常肝の値は 0.807 と 0.224 であった(表 1)。

【考察】

癌抑制遺伝子 Rb は、網膜芽腫の癌抑制遺伝子として単離された。その遺伝子産物 Rb 蛋白質は E2F をはじめとする細胞増殖を支配する正の転写因子群 (Rb 結合蛋白質) と結合して細胞周期の G₁ 期から S 期への進行を抑制していると考えられる。Rb 蛋白質は、G₁ 期初期には低リン酸化型であるが、S 期以降は高リン酸化型として存在する。E2F をはじめとする転写因子群は、低リン酸化型の Rb 蛋白質とのみ結合する。G₁ 期に Rb 蛋白質と結合して活性を制御されていた細胞蛋白質が、G₁ 期に Rb 蛋白質が高リン酸化型となるとともに遊離して活性となり細胞は S 期に移行する。pRb から解離し活性化した E2F は cyclinE の発現を誘導し、cyclinE/Cdk2 複合体を活性化する。これが pRb をさらにリン酸化してその機能をより完全に中和する。これにより、pRb と E2F と cyclinE/Cdk2 のあいだに正のフィードバックループが形成され、E2F と cyclinE は相互に活性化する。

一方、癌抑制遺伝子産物 p53 は DNA 型癌ウイルス SV40 の largeT 抗原と結合する細胞蛋白質として同定された。p53 蛋白質は、放射線や薬剤によって DNA に障害を受けた細胞の細胞周期を止めたり、アポトーシスを引き起こす役割がある。p53 蛋白質は転写因子であり、その制御下にある遺伝子がいくつか同定されているが、cyclinD/Cdk (cyclin-dependent-kinase)4 複合体の機能を阻害する p21 遺伝子の発現制御が最も重要だと考えられている。障害を受けた細胞では p53 発現量が増加して 21kD の蛋白質である WAF-1/Cip(Cdk-interacting protein) 1 遺伝子プロモーターに作用し、その転写を活性化する。WAF-1/Cip1(p21)は cdk と複合体を作り cyclin-cdk 複合体の G₁ 期から S 期進行に不可欠なキナーゼ活性を抑えるため、障害が回復されるまで細胞周期の進行を G₁ 期に止める。

TG マウス発生腫瘍、TG マウス発生腫瘍由来株細胞 TRN の cyclinD1 遺伝子発現はマウス神経芽腫株細胞 C1300 と比較して極端に抑制されており、分化を遂げた TG マウスの正常脳と正常肝と同程度でほとんど 0 であった。cyclinD1 はこれまで多くの癌でその遺伝子増幅と異常発現が報告されているが、cyclinD1/Cdk4 複合体の下流で作用する pRb に関し

ても癌細胞における変異の頻度が高い。そして、cyclinD1/Cdk4 複合体の上流で作用する p16 と cyclinD1 と pRb の遺伝子変異には負の相関関係が存在し、Rb 遺伝子が欠失した細胞では cyclinD1 の発現レベルは低いことが知られている。さらに、p16、cyclinD1、pRb 遺伝子はそれぞれ遺伝子群を形成しているが、癌細胞で変異の対象となっているのはその中の 1 種類ずつの遺伝子で、p16、cyclinD1、pRb によって構成されるシグナル経路は特異的に細胞の癌化抑制に働き、いずれか 1 つの変異により機能できなくなるという。我々の TG マウス発生 PNET では E1A 遺伝子が高発現しており、pRb の働きが阻害されていると考えられるため、p16・cyclinD1・pRB のシグナル経路は pRB だけの変異でもはや機能しなくなったものと思われた。TG マウス発生 PNET では E1B 遺伝子も高発現して p53 の働きを阻害するため、我々は p53 によってその発現が誘導される p21 の発現は抑制されると予想した。実験の結果、TG マウス発生腫瘍での p21/GAPD 遺伝子発現比は 0.547 で C1300 のほぼ 1/2 に抑制されていたが、TG マウス発生腫瘍由来株細胞 TRN では 4.743 で C1300 より高値であった。その原因は不明であるが、S 期進行の異常とアポトーシス誘導関連遺伝子の異常に今後興味を持たれる。

表 1. CyclinD1 および p21 の遺伝子発現

	CyclinD1/GAPD	p21/GAPD
C1300	0.887	1.015
TG 腫瘍	0.0288	0.547
TRN	0.0806	4.743
TG 脳	0.0456	0.807
TG 肝	0.0290	0.224

4. 小児軟部腫瘍に対するキメラ mRNA 検出による分子遺伝学的診断の臨床応用およびトランスジェニックマウス発生 PNET での融合遺伝子検出の試み

【はじめに】小円形細胞からなる軟部悪性腫瘍の早期確定診断は、各腫瘍ごとに有効な治療が開発されている現在、ますます重要になってきた。従来、鑑別診断には免疫染色が広く行われるが、抗原の発現結果の解釈には、その特異性や感受性の面から注意深い検討が必要である。近年、軟部悪性腫瘍において、腫瘍特異性が高いと考えられる染色体転座の結果形成されるキメラ遺伝子の検出に、reverse transcription polymerase chain reaction (RT-PCR) 法がよく用いられるようになり、Ewing 肉腫/PNET、横紋筋肉腫、滑膜肉腫、脂肪肉腫、悪性黒色腫、粘液型軟骨肉腫、線維形成性小円形細胞腫瘍などで遺伝子レベルの診断に威力を発揮している。本論文では筑波大学臨床医学系小児外科で経験した PNET のうち、RT-PCR 法を用いて PNET 特異的なキメラ転写産物を検出し、横紋筋肉腫との鑑別診断の決め手とした 2 例について報告し、その臨床的有用性を明らかにする。さらに、ヒトレニンプロモーターとヒトアデノウイルス 12 型 E1A・E1B 融合遺伝子を組み込んだトランスジェニック(TG)マウスに発生した PNET について融合遺伝子の検索を行ない、EWS 遺伝子の mRNA 変異の有無を調べた。

【症例】

症例 1. 9 才女児。腹痛・頻尿で発症の後、性器出血をきたし、便秘を主訴に当院を紹介された。CT で小骨盤腔を占拠する充実性腫瘍が認められ、MRI では子宮、陰後壁から発生した横紋筋肉腫を初診時に強く疑った。

症例 2. 14 才男児。1998 年、打撲後臀部痛を訴え、1999 年 1 月 MRI を施行して右梨状筋内に腫瘤陰影を指摘された。3 月の MRI で明らかな増大傾向があり、脊柱管内への進展も見られ、横紋筋肉腫を疑って生検を施行した。生検組織の永久標本では、症例 1、2 とも、腫瘍は胞体の乏しい小円形細胞肉腫であった(図 1)。

【材料および方法】

1. RNA の抽出および RT-PCR 反応

市販の RNA 抽出試薬 ISOGEN (Nippongene, Tokyo, Japan)を用い、症例 1、2 の生検腫瘍およびトランスジェニックマウスで発生した PNET からフェノール/チオシアン酸グアニジン法により RNA を抽出した。それぞれ 900ng の total RNA から、逆転写酵素と oligo(dT)₁₆ を用いて RT-PCR kit (GeneAmp RNA PCR kit)(Perkin-Elmer, Roche Molecular Systems, Branchburg, NJ)により cDNA を合成し、その 1 μ l を PCR 反応に使用した。PCR には TaKaRa の Taq DNA ポリメラーゼと PCR buffer(Takara Shuzo, Shiga, Japan)を用い、dNTP 濃度は各 200 μ M、プライマー濃度は各 300nM とした。PCR は各 tube 20 μ l で行い、サーマルサイクルの条件は、95 $^{\circ}$ C で 1 分間変性、60 $^{\circ}$ C で 1 分間アニー

リング、72℃で2分間伸長を30回繰り返した。

2) RT-PCR 反応に用いたプライマー

Ewing 肉腫/PNET で認められる染色体転座 t(11;22)(q24;q12)、t(21;22)(q22;q12)あるいは t(17;22)(q12;q12)の結果形成されるキメラ遺伝子 EWS/FLI-1、EWS/ERG あるいは EWS/E1A-F と、胞巣型横紋筋肉腫に見られる染色体転座 t(2;13)(q35;q14)または t(1;13)(q36;q14)の結果形成されるキメラ遺伝子 PAX3/FKHR または PAX7/FKHR を検出するために RT-PCR 反応で用いたプライマーを表 1 に示した。

3) PCR 生成物のサブクローニングとシーケンス

RT-PCR 反応終了後、反応液の一部を 1.5%アガロースゲルで泳動し、エチジウムブロマイドで染色した。予想サイズの PCR 生成物が得られた場合は、その DNA 断片を TA クローニングキット (Original TA cloning kit) (Invitrogen, Carlsbad, CA) を用いてクローニングし、さらに、ダイデオキシ法 (ABI PRISM Ready Reaction Kit) (Perkin-Elmer) により、蛍光ラベルされたサイクルシーケンス反応の生成物を DNA シークエンサー (ABI PRISM 310 Genetic Analyzer) (Perkin-Elmer) で検出・解析して塩基配列を調べた。

4) 免疫組織化学的検索

ホルマリン固定後、パラフィン包埋した腫瘍について、DAKO ENVISION 染色システム法 (DAKO, Glostrup, Denmark) を用い、MIC2 (NeoMarkers, Union City, CA)、neuron-specific enolase (NSE)、S-100 蛋白、neurofilament proteins (NFP)、vimentin、desmin および myoglobin (いずれも DAKO) の発現を調べ、RT-PCR の結果と比較した。

5) ノーザンブロット法による EWS 遺伝子変異の検出

TG マウス発生腫瘍、そのヌードマウス移植腫瘍、TG マウスの正常脳・脾臓・腎臓およびヒト PNET から total RNA を抽出し、その 20 μg を用いてホルムアルデヒドによる変性ゲルで電気泳動後、常法に従ってブロッティングを行なった。マウス EWS mRNA の exon1 から exon6 を含む 482 base の cDNA プロブを RI ラベルし、60℃で一晩ハイブリダイズ後メンブランを洗浄し、BAS 2000 (FUJIFILM, Tokyo, Japan) を使用して EWS mRNA を検出し、その変異の有無を調べた。

【結果】

症例 1 および 2 の生検腫瘍組織から得られた mRNA をそれぞれ cDNA に変換後、Ewing 肉腫/PNET に特異的なキメラ遺伝子 EWS/FLI-1、EWS/ERG および EWS/E1A-F と、胞巣型横紋筋肉腫に特異的なキメラ遺伝子 PAX3/FKHR および PAX7/FKHR の各領域のプライマーで PCR を行った。その結果、両方の腫瘍とも、Ewing 肉腫/PNET に高頻度に見出

される染色体転座 t(11;22)(q24;q12)で形成される EWS/FLI-1 のキメラ転写産物に相当するバンドが検出された (図 2)。横紋筋肉腫に特異的なキメラ転写産物は得られなかった。この DNA 断片をクローニングし、さらに塩基配列を調べたところ、症例 1、2 の腫瘍とも、PCR で得られたキメラ転写産物の DNA サイズは同じ 531-bp であり、ともに EWS の exon7 と FLI-1 の exon5 の切断・融合で生じた融合転写産物であることが判明した。RT-PCR の結果が判明するのは生検の翌日あるいは翌々日であり、予想されるキメラ転写産物のバンドが検出されれば、さらに 1 週間程度でその塩基配列が解析可能であった。後に行ったホルマリン固定-パラフィン包埋腫瘍組織の免疫染色では、症例 1 の腫瘍組織が MIC2 弱陽性、症例 2 が MIC2 陽性であった (図 3)。MIC2 gene product は Ewing 肉腫/PNET の細胞膜できわめて高率に陽性を示す腫瘍マーカーとして知られる。S-100 蛋白、NFP、desmin および myoglobin は、症例 1、2 の腫瘍ともに、いずれも陰性であった。以上の結果から、当初、横紋筋肉腫を強く疑った症例 1 および 2 はどちらも PNET と確定した。

TG マウスで発生した PNET についてヒト Ewing 肉腫/PNET に特異的なキメラ遺伝子 EWS/FLI-1 の領域のプライマーで PCR を行ったが、キメラ転写産物に相当するバンドは見出されなかった (図 4)。EWS/ERG および EWS/E1A-F の各領域のプライマーについても同様であった (data not shown)。ノーザンプロット法により EWS mRNA の遺伝子変異を調べた結果、EWS/FLI-1 融合遺伝子 positive のヒト PNET では正常な EWS mRNA の他に、それより分子量の大きい EWS/FLI-1 融合転写産物が検出されたが、TG マウス発生 PNET では EWS/ETS family 遺伝子の融合転写産物は全く検出されなかった (図 5)。

【考察】

本症例は、2 例とも横紋筋肉腫が強く疑われたが、迅速な遺伝子診断とその後の免疫染色の結果とを合わせて PNET と確定した。Ewing 肉腫/PNET では、従来、特異的な染色体転座 t(11;22)(q24;q12)が 80%以上の高率で、また、別の染色体転座 t(21;22)(q22;q12)が 10%程度で認められ^{10),13),15)}、その結果形成される EWS/FLI-1 および EWS/ERG のキメラ転写産物を RT-PCR 法で検出することで遺伝子診断が可能となった。近年、頻度は低いが、Ewing 肉腫/PNET で t(17;22)(q12;q12) および t(7;22)(p22;q12)の染色体転座と、それに伴う EWS/E1A-F および EWS/ETV1 のキメラ遺伝子も見出された。本研究では、これらのうち、EWS/FLI-1、EWS/ERG および EWS/E1A-F のプライマー対を用いて生検腫瘍のキメラ遺伝子検索を行い、EWS/FLI-1 のキメラ転写産物を検出・同定する事ができた。筑波大学小児外科がこれまでに経験した Ewing 肉腫および PNET はそれぞれ 4 例および 8 例で、そのうち Ewing 肉腫の全例と PNET の 8 例中 4 例で EWS/FLI-1 の融合転写産物が検出された (data not shown)。EWS/FLI-1 陰性の PNET 4 例からは、今のところ、他のキメラ遺伝子は検出されていない。検体から良好な RNA が抽出できれば、RT-PCR 法により、迅速かつ明確にキメラ転写産物が検出できる。従って、この方法は、診断が困難な小円形細胞からなる軟部悪性腫瘍の識別に今後ますます威力を発揮すると考えられるが、常に腫瘍特異

的なキメラ転写産物が見出されるとは限らず、また、特に Ewing 肉腫/PNET では遺伝子の異常に亜型が多く、今後も新たなキメラ遺伝子が見つかる可能性がある。さらに、横紋筋肉腫や神経芽腫でも EWS/FLI-1 転写産物が検出されたとの報告もあり、EWS/FLI-1 融合転写産物の存在が必ずしも Ewing 肉腫/PNET だけに特徴的とはいえない可能性が出てきた。したがって、軟部悪性腫瘍の確定診断に際しては、キメラ遺伝子の検出結果と、臨床所見、病理組織学的・免疫組織学的所見などを合わせた注意深い解釈および検討が必要と考えられる。

TG マウスで発生した PNET についてもヒト Ewing 肉腫/PNET に特異的なキメラ遺伝子 EWS/FLI-1、EWS/ERG および EWS/E1A-F の各領域のプライマーで PCR を行ったが、いずれのキメラ転写産物に相当するバンドも見出されなかった。ノーザンプロット法により EWS mRNA の遺伝子変異を調べても、EWS/FLI-1 融合遺伝子 positive のヒト PNET では正常な EWS mRNA の他に、それより分子量の大きい EWS/FLI-1 融合転写産物が検出されたが、TG マウス発生 PNET では EWS/ETS family 遺伝子の融合転写産物は全く検出されなかった。したがって、TG マウスに発生する PNET ではヒトで見られる Ewing 肉腫/PNET 特異的な染色体転座は起こらず、それに伴う EWS/ETS family 遺伝子の融合転写産物も生じないことが判明した。

図1 生検腫瘍の病理組織像 (HE 染色。×100)

左：.症例 1。 右：.症例 2。ともに、胞体の乏しい小円形肉腫である。

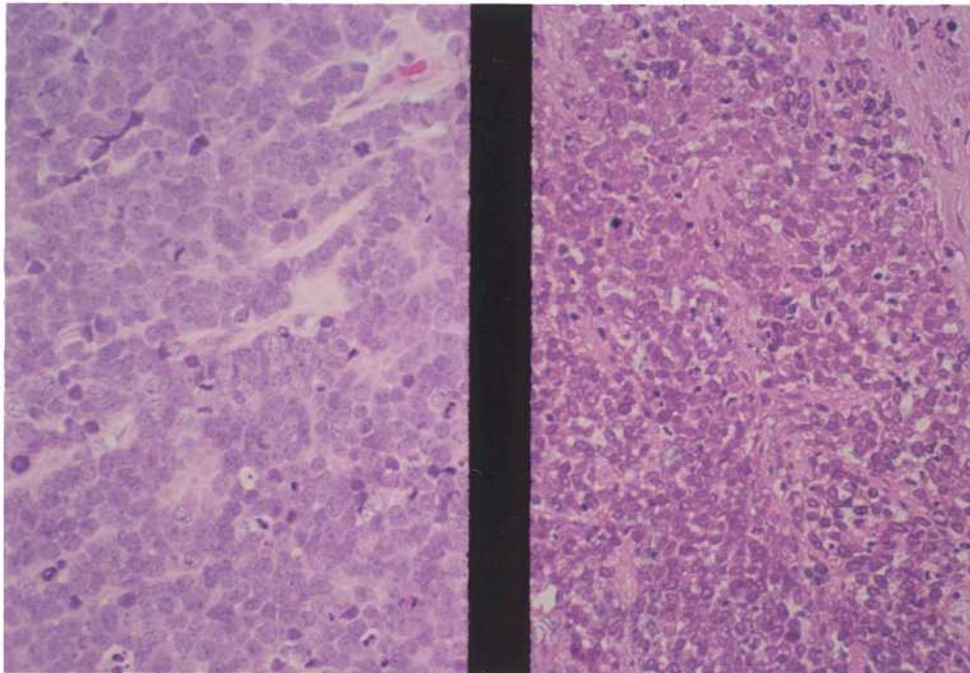


図2 生検腫瘍の RT-PCR 産物の泳動結果

Ewing 肉腫/PNET 特異的なキメラ転写産物の検出。1:EWS/FLI-1、2:EWS/ERG、3:EWS/E1A-F、P1:EWS/FLI-1 の陽性コントロール、A: 症例 1 の生検腫瘍、B: 症例 2 の生検腫瘍、M:DNA マーカー。症例 1、症例 2 の腫瘍とも、EWS/FLI-1 のキメラ転写産物に相当する 531-bp のバンドを認める。

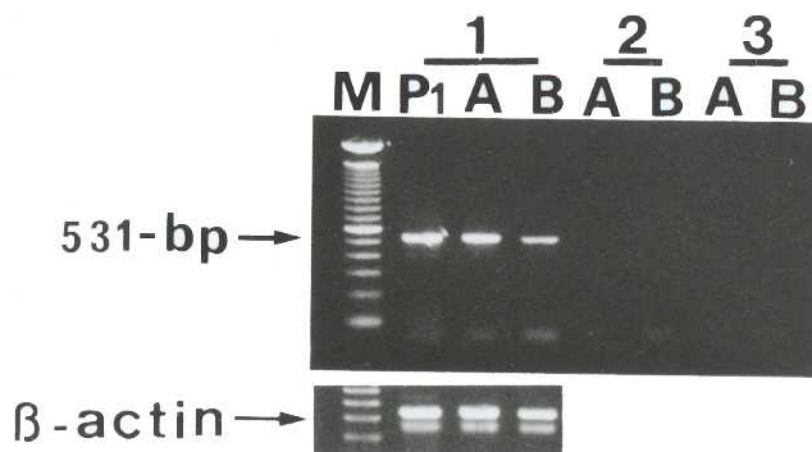


図3 生検腫瘍の MIC2 免疫染色(×100)

左：症例1、 右：症例2。症例1, 2ともに MIC2 陽性であった。

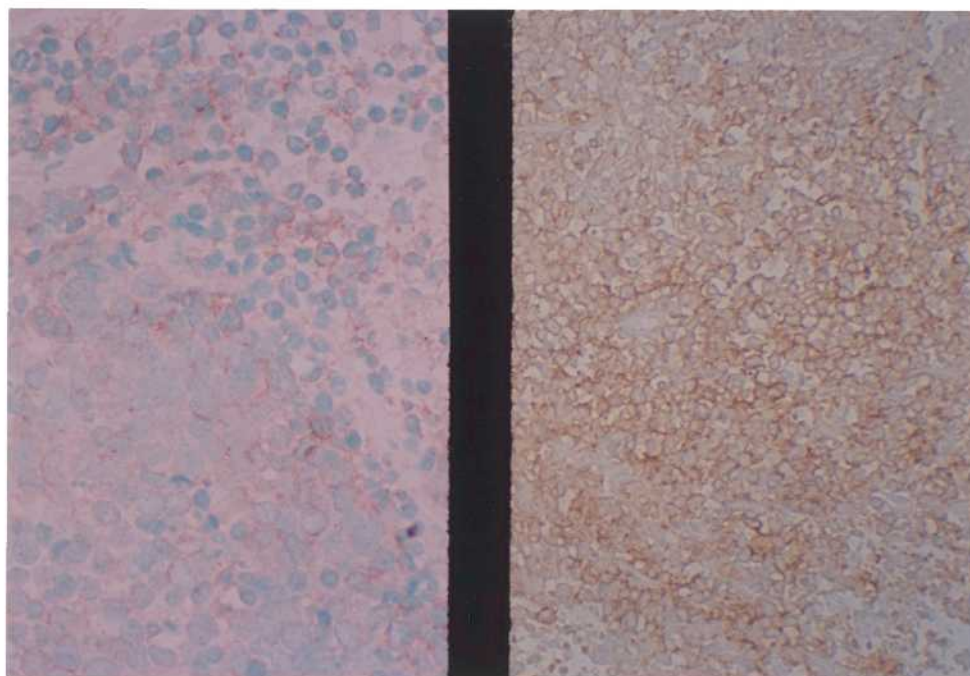


図4 TG マウス発生 PNET の RT-PCR 産物の泳動結果

P： EWS/FLI-1 の陽性コントロール、 1：TG マウス発生 PNET、
2：そのヌード Maus 移植腫瘍。

ヒト Ewing 肉腫/PNET に特異的なキメラ遺伝子 EWS/FLI-1 の領域のプライマーで PCR を行ったが、キメラ転写産物に相当するバンドは見出されなかった。

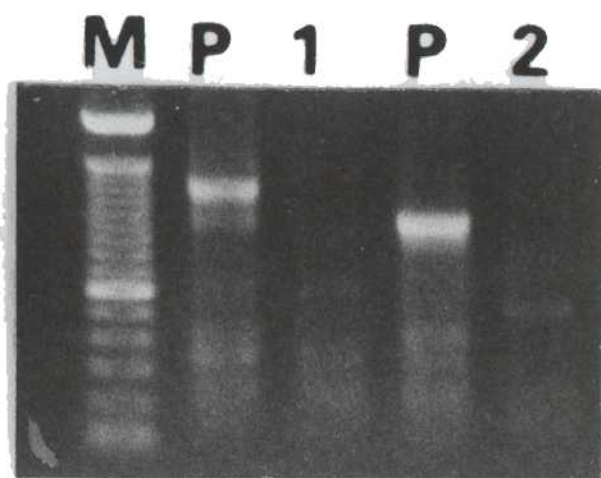


図5 ノーザンブロット法によるTGマウス発生PNETのEWS検出

1 : EWS/FLI-1の陽性コントロール、2 : TGマウス腎、3 : 脾、4 : 脳、5 : TGマウス発生PNETのヌードマウス移植腫瘍、6 : TGマウス発生PNET。

EWS/FLI-1融合遺伝子 positive のヒトPNETでは正常なEWS mRNAの他に、それより分子量の大きいEWS/FLI-1融合転写産物（図の矢印）が検出されたが、TGマウス発生PNETではEWS/ETS family 遺伝子の融合転写産物は全く検出されなかった。

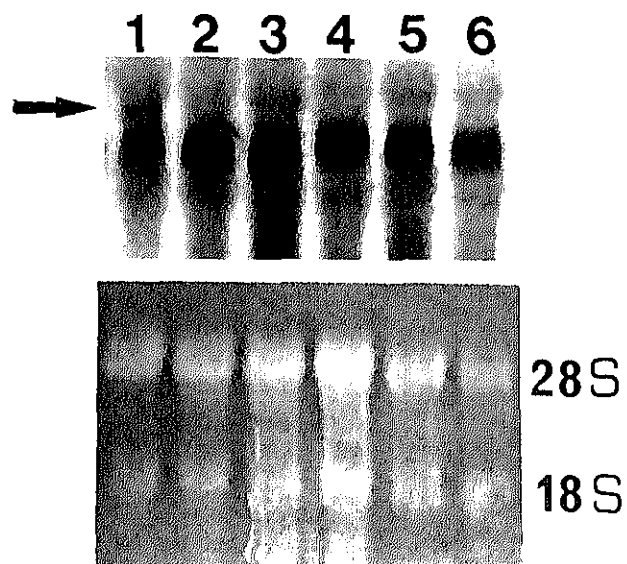


表1 RT-PCR 反応に用いたプライマ

遺伝子(プライマー名)	塩基配列
EWS(ESBP-1)	5'-CGACTAGTTATGATCAGAGCAGT-3'
FLI-1(11.3)	5'-ACTCCCCGTTGGTCCCCTCC-3'
ERG	5'-TCATGTTCTCCGATAGAGTTTGTG-3'
E1A-F	5'-GTAATTCATGGCTGGCCGGTTC-3'
PAX3(5'-PAX3)	5'-GCACTGTACACCAAAGCACG-3'
PAX7(5'-PAX7)	5'-TTTGAGAGGACCCACTACCC-3'
FKHR(3'-FKHR)	5'-AACTGTGATCCAGGGCTGTC-3'

Exclusive Tumorigenesis of Primitive Neuroectodermal Tumor in Transgenic Mice Carrying the E1 Genes of Adenovirus with the Human Renin Promoter^{1,2}

Michio Kaneko, MD, PhD, Setsuko Kaneko, PhD, Kanae Hashida, MS,¹ Noriko Kajiwara, Fumihiko Sugiyama PhD, Jun-ichi Hata, MD, PhD, Akiyoshi Fukamizu, PhD⁴

Institute of Clinical Medicine[M. K., S. K., H. K.], Laboratory Animal Research Center [N. K., F. S.] Institute of Applied Biochemistry [A. F.],⁴ University of Tsukuba, 1-1-1, Tennodai, Tsukuba, 305-8575, Japan

Department of Pathology [J. H.], Keio University School of Medicine, 35, Shinanomachi, Shinjuku, Tokyo, 160-8582, Japan

Supported in part by a grant-in-aid for Scientific Research (08672051, 10671665) from the Ministry of Education, Science and Culture of the Japanese Government.

Running title PNET in transgenic mice

ABSTRACT

Background: Fused genes of the human renin promoter and human adenovirus type 12 E1A-E1B (hRNE1AB) were introduced into the fertilized ova of C57BL/6J mice to produce transgenic mice. Frequent tumorigenesis was observed in the transgenic mice. E1A and E1B genes were expressed exclusively in tumor tissues and not expressed in normal tissues of the mice. *Procedure:* One hundred and sixty-five transgenic (hRNE1AB+/) mice were monitored for tumors up to 74 weeks of age. The precise biologic features of the tumors were observed and the tumors were analyzed histopathologically and cytogenetically. *Results:* One hundred and forty-five (88%) of 165 mice carrying the hRNE1AB+/ gene developed tumors, all of which were exclusively primitive neuroectodermal tumors (PNETs). More than half of the transgenic mice had PNETs from 21 to 40 weeks of age. Before 20 weeks of age, PNETs developed predominantly in the abdomen, pelvic region, trunk, and extremities and the tumor histology was the undifferentiated subtype. In contrast, after 21 weeks of age, PNETs occurred most frequently in the brain and the parameningeal region. Histologically, PNETs arising in the intracranial and parameningeal regions were medullo-ependymoblastomas or central PNETs which had clear ependymal rosettes similar to human central PNETs. Immunohistochemically, the two subtypes of PNETs were not reactive to MIC2, GFAP, NSE, NF, tyrosine hydroxylase, and other tumor markers. *Conclusion:* The PNETs occurred in almost all of the transgenic mice and had close histological similarity to their human central and peripheral counterparts, indicating that this transgenic mouse is an excellent experimental model for investigating the tumorigenesis of PNETs and related tumors. The identification of factors in murine neural cells that induce the expression of the transferred E1A and E1B genes will help elucidate the mechanism of tumorigenesis in transgenic mice and hopefully in humans.

Keywords: transgenic mouse, human adenovirus type 12, E1A and E1B, primitive neuroectodermal tumor (PNET), myc

INTRODUCTION

Inoculation of rodents with human adenovirus type 12 (Ad12) induces tumors of embryonal neuroectodermal origin in the peripheral and central nervous systems [1,2]. The transforming activity of human adenoviruses (Ad) has been mapped within the early 1 (E1) region sequences, which consist of two transcriptional units, E1A and E1B [3 - 5]. Products of E1A genes are required to activate the expression of E1B genes [6]. The E1A proteins are oncoproteins that cooperate with the E1B gene products to oncogenically transform rodent cells [7 - 9]. Fukamizu et al. established a line of transgenic mice carrying the E1A and E1B genes of Ad12 under the control of the human renin promoter, a 3-kb upstream fragment of the human renin gene, to investigate the in vivo effects of the Ad12 E1A and E1B genes on cellular transformation including the kidney [10]. Contrary to their initial expectations, the transgenic mice heritably developed primitive neuroectodermal tumors (PNETs) derived from the retroperitoneal, olfactory, and/or pelvic regions with varying incidence rates, and the phenotype was successfully maintained through generations [11]. In this paper, we investigated tumors in the transgenic mice in detail in terms of tumor incidence, age and site of tumorigenesis, and histopathological and immunohistochemical characteristics of the tumors.

MATERIALS AND METHODS

Mice

Methods used for the construction of the fusion transgene and the generation of transgenic mice in this paper have been reported previously [10,11]. The structure of the 8.5-kb fusion transgene (hRNE1AB) is shown in Figure 1. The 3-kb human renin promoter region was fused in front of the Ad12 E1A and E1B genes, the latter of which possessed its own natural promoter that contains transcriptionally important cis-acting DNA elements such as TATA and GC sequences. hRNE1AB-heterozygous (hRNE1AB+/) C57BL/6J mice and wild-type C57BL/6J mice (CLEA JAPAN, Tokyo, Japan) were mated to generate littermates of two different genotypes, hRNE1AB+/ and hRNE1AB / , of which 165 hRNE1AB+/ mice were monitored for spontaneously arising tumors. No liveborn hRNE1AB-homozygous (hRNE1AB+/+) mice were produced in heterozygous intercrosses (data not shown), indicating that hRNE1AB-homozygosity may be lethal during embryogenesis.

DNA Analysis

After birth, offspring were maintained with the mother until weaning at 4 weeks of age, and then males and females were housed in separate cages. The genotypes of a total of 415 offspring were determined by dot-blot hybridization using tail-tip DNA samples. Genomic DNA extracted from the tails was alkaline denatured with 2 M NaCl in 0.1 M NaOH and spotted to a GeneScreen Plus membrane (DuPont-New England Nuclear, Boston, MA). Filters were hybridized to the FITC-labeled 1.4-kb HindIII DNA fragment containing a portion of the E1B gene (Figure 1) and signal-enhanced with anti-fluorescein alkaline phosphatase conjugate and chemifluorescent substrate (AttoPhos) (Amersham Life Science, Arlington Heights, IL). The amplified signal was detected by using the Storm Scanning System (Molecular Dynamics, Sunnyvale, CA). One hundred and sixty-five mice (40% of 415 offspring) were identified as carrying hrNE1AB+ / .

Pathology

One hundred and sixty-five transgenic (hrNE1AB+ /) mice were monitored for tumors every day up to 74 weeks of age when the last mouse was observed to have a tumor. If any abnormal sign of possible tumor development (e.g., deformities, swelling, paralyses, or failure to thrive) was found, the mouse was killed and subjected to meticulous autopsy. Tissues were fixed in 10% neutral buffered formaldehyde for further histopathological and immunohistochemical analyses. Particular attention was paid to the head, including the brain which was cut into 2 mm-thick slices for detailed observation in every autopsied mouse. For electron microscopic observation, tumor tissues arising from the olfactory bulb and from the trunk were minced into small pieces and fixed with 2.5% glutaraldehyde in 0.1 M phosphate buffer, pH 7.4, at 4°C, postfixed in phosphate-buffered 1% osmium tetroxide, dehydrated, and embedded in epoxy resin. Ultrathin sections were stained with uranyl acetate and lead citrate, and observed under a H-7000 electron microscope (HITACHI, Tokyo, Japan). For mice with a severely dilated bowel and a normal-sized colon, which closely resembles Hirschsprung disease in humans, the colon and the rectum were placed in 10% neutral buffered formaldehyde or embedded in Tissue Tek O.C.T. Compound (Miles, Elkhart, IN) and stored at -80°C for histopathological and neurochemical analyses.

Immunohistochemical and Histochemical Analyses

For immunohistochemical analysis, the tumors were stained with antibodies including

neural markers as listed below using the avidin-biotin-peroxidase complex (ABC) technique on formaldehyde-fixed and paraffin-embedded sections [12]: monoclonal antibodies against MIC2, glial fibrillary acidic protein (GFAP), neurofilament protein (NF), desmin, vimentin (DAKO, Glostrup, Denmark); protein gene product 9.5 (PGP9.5) (Biogenesis, Sandown, NH); tyrosine hydroxylase (TH) (Chemicon International, Temecula, CA); CD57 (Leu-7) (Becton Dickinson, San Jose, CA); and polyclonal antibodies against neuron-specific enolase (NSE), S-100, and myoglobin (DAKO, Glostrup, Denmark). For normal-sized colons with bowel dilation, acetylcholinesterase-positive nerve fibers were assayed by the Karnovsky-Roots method using O.C.T. Compound-embedded frozen specimens [13].

RESULTS

Tumor Incidence in hRNE1AB+/ Mice

One hundred and forty-five (88%) of 165 mice carrying the hRNE1AB +/ gene developed tumors, all of which were exclusively PNETs. These tumors were readily transplantable in BALB/c nude mice (data not shown). Eight (5%) mice had severe bowel dilation, of which 5 also had developed PNETs in intracranial or parameningeal sites. In another 12 (7%) transgenic mice which were suspected to have tumors, autopsy revealed serious skin ulcers, abscesses, urinary or respiratory tract infection, and hydroureteronephrosis. These conditions could also be observed in wild-type C57BL/6J mice (data not shown) and were thus not specific to the transgenic mice. hRNE1AB+/ mice developed PNETs between the age of 7 and 74 weeks (Figure 2). Of the 88% PNET incidence, 26% and 27% incidence was observed between 21 and 30 weeks of age and 31 and 40 weeks of age, respectively. More than half of hRNE1AB+/ mice developed PNETs from 21 to 40 weeks of age (Figure 3). In 8 transgenic mice, severely dilated bowel with a normal-sized colon, causing obvious abdominal distention was observed, which closely resembles Hirschsprung disease in humans. However, the abdominal distention due to intestinal dilatation was detected mainly in adult mice, not in suckling mice, which differs from the human Hirschsprung disease predominantly detected during the neonatal period and infancy.

Sites of PNETs

hRNE1AB+/ mice developed PNETs in various sites and there was an apparent

correlation between site of tumorigenesis and mouse age (Figure 4). PNETs arising from multiple sites in the same mouse were counted separately. Before 20 weeks of age, PNETs developed predominantly in the abdomen, pelvic region, trunk, and extremities. Ninety-two percent of the tumors in mice aged 1 - 10 weeks and 69% in mice aged 11 - 20 weeks occurred in these four sites. In contrast, after 21 weeks of age, PNETs occurred most frequently in the brain and parameningeal region, where they developed in only 2 of 20 mice before 20 weeks of age. PNETs in the abdomen, trunk, and extremities were found only in 5% (6/125) of mice after 21 weeks of age, whereas PNETs arising from the pelvic region were observed in 23% (29/125) due to the marked increase in tumors occurring adjacent to the base of the bladder including the prostate in male hrNE1AB+/ mice. After 21 weeks of age, the transgenic mice had 90% PNET incidence in the head and neck regions, including the intracranial and parameningeal regions, and the pelvic region. This was strikingly different from the sites of tumorigenesis in mice aged less than 20 weeks. Infrequently, PNETs in the spinal cord and mediastinum were also observed between 11 and 30 weeks of age, in 4 and 3 of 165 transgenic mice, respectively. There were no apparent tumors in the sympathetic nervous system, adrenal medulla, or skeletal system.

Histopathological Characteristics of PNETs

PNETs in hrNE1AB+/ mice were negative for PAS staining. Histologically, PNETs arising in the intracranial and parameningeal regions were medullo-ependymoblastomas or central PNETs which had clear ependymal rosettes composed of small spindle- to polygonal-shaped cells poor in cytoplasm and rich in chromatin (Figure 5A). Electron microscopically, the cells forming rosettes were tightly attached at their apices by junctional complexes and the lumen was packed with microvilli (Figure 6A). PNETs occurring adjacent to the base of the bladder including the prostate in male transgenic mice had tubular rosettes consisting of cylindrical epithelial cells with elongated oval nuclei and distinct granular chromatin (Figure 5B). Tumors in other sites were undifferentiated or peripheral PNETs composed of irregularly arranged, small spindle-, tadpole-, or polygonal-shaped cells (Figure 5C). Under electron microscopy, peripheral PNETs had well-developed neuropils and glycogen but neurosecretory cored vesicles were rarely seen (Figure 6B).

Immunohistochemical Characteristics of PNETs

Immunohistochemically, none of formaldehyde-fixed and paraffin-embedded PNETs were reactive with the 11 antibodies, including neural markers, tested (data not shown).

Histology and Histochemical Analysis of Bowel Dilatation

Intramural and submucosal ganglion cells, which are absent in Hirschsprung disease, could be observed in the colon distal to the dilated small intestine in hematoxylin and eosin staining. The size and number of the ganglion cells and the myenteric plexus were normal (Figure 7A). No proliferation of mucosal and submucosal nerve fibers containing acetylcholinesterase was found by the Karnovsky-Root method (Figure 7B). These findings confirmed that the bowel dilatation observed in these transgenic mice was different from that in Hirschsprung disease.

DISCUSSION

Human PNETs are tumors arising from primitive neuroepithelial cells and can be subdivided into central PNETs (medulloblastomas) and peripheral PNETs such as Askin tumor. PNETs share certain morphological and surface antigen characteristics with other neural tumors (e.g., neuroblastoma, retinoblastoma, and pinealoblastoma). PNET cells are made up of small round cells with disproportionately large hyperchromatic nuclei and the cells are often clustered into rosettes. PNET is closely related to Ewing sarcoma, sharing the same genetic aberrations, and extraosseous Ewing sarcoma is a synonym for PNET.

There have been a few reports on neuroectodermal tumors in transgenic mice carrying viral genes. Transgenic mice containing JC virus early-region genes developed adrenal neuroblastomas, which metastasized to the pituitary gland, intestine, stomach, and liver. JC virus is a ubiquitous human virus that shares sequence and structural homology with simian virus 40 (SV40) [14]. Transgenic mice carrying a cDNA to the polyoma virus middle T antigen linked to the thymidine kinase promoter developed multiple neuroblastomas. Expression of the transgene was restricted to the neurons of the central and peripheral nervous tissue, probably because of a positional effect of the transgene integration [15]. All male transgenic mice carrying the gp91-phox promoter/SV40 early-region transgene developed neuroblastoma in the prostate gland. Gp91-phox is expressed exclusively in terminally differentiating hematopoietic cells of the myelomonocytic lineage. These lesions

appeared to be due to a novel transcription signal that was generated during the construction of the transgene [16].

Iwamoto et al. succeeded in producing transgenic mice carrying a hybrid gene consisting of mouse metallothionein promoter-enhancer and the *ret* oncogene (MT/*ret*). A neuroblastoma developed in one of MT/*ret* transgenic founder mice. They suggested a possible role for the *ret* oncogene in the proliferation of neural crest cells [17].

We established a line of transgenic mice carrying the E1A and E1B genes of Ad12 under the control of the human renin promoter to investigate the in vivo effects of Ad12 E1A and E1B genes on cellular transformation [10,11]. The transgenic mice heritably developed PNETs and the phenotype was successfully maintained through generations.

In the present study, 88% of transgenic mice containing the Ad12 E1A and E1B genes specifically developed PNETs in both the central and peripheral regions. Centrally occurring PNETs formed distinct rosettes and had morphological similarity to human medullo-ependymoblastoma. In contrast, most of the peripherally occurring tumors were undifferentiated PNETs histologically, closely resembling human peripheral PNETs such as Askin tumor. With regard to the age of onset, human peripheral PNETs occur predominantly in young adults and central PNETs (medulloblastomas) are found mainly in children aged less than 5 years. However, central PNETs in the transgenic mice were developed distinctly later than peripheral PNETs. Rosette-forming PNETs could also be observed peripherally but were restricted to the prostatic region in male mice. Intestinal dilatation mimicking human Hirschsprung disease was found at autopsy in 5% of the transgenic mice. Abscesses, urinary infection, pneumonitis, and hydronephrosis, which were also detected in wild-type C57BL/6J mice, were observed in another 7% of autopsied mice. These data strongly suggest that PNETs occurred in almost all of the transgenic mice and had close histological similarity to their human central and peripheral counterparts, indicating that this transgenic mouse is a good experimental model for investigating the tumorigenesis of PNET and related tumors.

In our earlier study, the transgene was located in the E2 and E3 bands of mouse chromosome 7, with which no genetic linkage to neuroectodermal tumors had been previously demonstrated. Notably, in addition to the expression of a neural marker gene N-CAM, three members of the *myc* oncogene family, *c*, *L*, and *N-myc* were co-expressed in the tumors [11]. Such co-expression of the *myc* family has not been reported in transgenic

mice that develop neuroectodermal tumors [14 - 17].

Intracranial or intraperitoneal inoculation of newborn mice with Ad12 induced tumors of embryonal neuroectodermal origin multilocally in the brain and the spinal cord in 30.2%, or in the peritoneal cavities in 82.6% of mice [1,2]. The transforming activity of Ad has been mapped within the E1 region sequences, which consist of two transcriptional units, E1A and E1B [3 - 5].

In our transgenic mice containing the Ad12 E1A and E1B genes, expression of the E1A and E1B genes was not detected in any tissues examined other than tumors and were limited only to the tumors [11]. It has been shown that the E1B TATA and GC box regions respond to E1A trans-activation [18,19]. Expression of the co-transferred E1B gene is confined only to the tumors, suggesting that its expression is regulated by E1A. Transgenic mice harboring either the E1A or the E1B gene alone did not develop tumors [20]. This finding is consistent with the suggestion that both E1 genes are required for tumorigenesis.

Fukamizu et al. established another line of transgenic mice carrying the Ad12 E1A/E1B genes under the control of the human angiotensinogen promoter, instead of the human renin promoter [21]. The transgenic mice heritably developed neuroectodermal tumors arising from the pelvic region. They considered the restricted expression of the fusion gene was probably due to the consequence of the recognition of a novel transcriptional activity created by the unique combination of the human angiotensinogen promoter and Ad12 E1A/E1B sequences in the afflicted neuroectodermal cells.

Adenovirus E1B protein binds the cellular tumor suppressor protein p53 [22] and inhibits the transcription-regulatory functions of p53 [23 - 25]. E1A gene products bind to the cellular retinoblastoma (RB) protein [26], which cripples a vital cellular growth-suppression mechanism and leads the cell into malignant transformation. pRB and p53 are both tumor suppressor gene products and both are targeted for sequestration by the oncoproteins of E1A and E1B.

In our transgenic mice, it appeared that co-activation and stable expression of the E1A and E1B transgenes in neuroepithelial cell abolished the "tumor-suppressor" function of p53 and pRB, and activated *myc* oncogenes, inducing permanent cell proliferation and tumor formation. Actually, three *myc* oncogene family members, c-, L-, and N-*myc* were co-expressed in the tumors of our transgenic mice. We must determine whether proteins other than p53 and pRB are bound by the E1A and E1B proteins for transformation to

occur and which transcriptional factors in murine primitive neuroepithelial cells induce the expression of the transferred E1A and E1B genes resulting in malignant change to PNET to elucidate the mechanism of tumorigenesis in the transgenic mice and that of PNET development in humans.

ACKNOWLEDGMENTS

The authors thank Cynthia Yenches for help in manuscript preparation.

REFERENCES

1. Ogawa K: Embryonal neuroepithelial tumors induced by human adenovirus type 12 in rodents: 1. Tumor induction in the peripheral nervous system. *Acta Neuropathol* 77:244 - 253, 1989.
2. Ogawa K: Embryonal neuroepithelial tumors induced by human adenovirus type 12 in rodents: 2. Tumor induction in the central nervous system. *Acta Neuropathol* 78:232 - 244, 1989.
3. Bernards R, Schrier PI, Houweling A, et al.: Tumorigenicity of cells transformed by adenovirus type 12 by evasion of T-cell immunity. *Nature* 305:776 - 779, 1983.
4. Schrier PI, Bernards R, Vaessen RTMJ, et al.: Expression of class I major histocompatibility antigens switched off by highly oncogenic adenovirus 12 in transformed rat cells. *Nature* 305:771 - 775, 1983.
5. Berk AJ: Adenovirus promoters and E1A transactivation. *Ann Rev Genet* 20:45 - 79, 1986.
6. Nevins JR: Mechanism of activation of early viral transcription by the adenovirus E1A gene product. *Cell* 26:213 - 220, 1981.
7. Gallimore PH, Sharp PA, Sambrook J: Viral DNA in transformed cells: II. A study of the sequences of adenovirus 2 DNA in nine lines of transformed rat cells using specific fragments of the viral genome. *J Mol Biol* 89:49 - 72, 1974.
8. Jones N, Shenk T: Isolation of adenovirus type 5 host range deletion mutants defective for transformation of rat embryo cells. *Cell* 17:683 - 689, 1979.
9. Shenk T, Flint J: Transcriptional and transforming activities of the adenovirus E1A proteins. *Adv Cancer Res* 57:47 - 85, 1991.
10. Fukamizu A, Uehara S, Sugimura K, et al.: Cell type-specific expression of the human

- renin gene. *J Biol Regul Homeost Agents* 5:112 - 116, 1991.
11. Sugiyama F, Sagara M, Matsuda Y, et al.: Heritable formation of neuroectodermal tumor in transgenic mice carrying the combined E1 region gene of adenovirus type 12 with the deregulated human renin promoter. *J Cell Biochem* 57:691 - 700, 1995.
 12. Hsu S-M, Raine L, Fanger H: Use of avidin-biotin-peroxidase complex (ABC) in immunoperoxidase techniques: A comparison between ABC and unlabeled antibody (PAP) procedures. *J Histochem Cytochem* 29:577 - 580, 1981.
 13. Karnovsky MJ, Roots L: A "direct-coloring" thiocholine method for cholinesterases. *J Histochem Cytochem* 12:219 - 221, 1964.
 14. Small JA, Khoury G, Jay G, et al.: Early regions of JC virus and BK virus induce distinct and tissue-specific tumors in transgenic mice. *Proc Natl Acad Sci USA* 83:8288 - 8292, 1986.
 15. Aguzzi A, Wagner E, Williams RL, et al.: Sympathetic hyperplasia and neuroblastomas in transgenic mice expressing polyoma middle T antigen. *New Biol* 2:533 - 543, 1990.
 16. Skalnik D, Dorfman DM, Williams D, et al.: Restriction of neuroblastoma to the prostate gland in transgenic mice. *Mol Cell Biol* 11:4518 - 4527, 1991.
 17. Iwamoto T, Taniguchi M, Wajjwalku W, et al.: Neuroblastoma in a transgenic mouse carrying a metallothionein/*ret* fusion gene. *Br J Cancer* 67:504 - 507, 1993.
 18. Wu L, Rosser DSE, Schmidt MC, et al.: A TATA box implicated in E1A transcriptional activation of a simple adenovirus 2 promoter. *Nature* 326:512 - 515, 1987.
 19. Weintraub SJ, Dean DC: Interaction of a common factor with ATF, Sp1, or TATAA promoter elements is required for these sequences to mediate transactivation by the adenoviral oncogene E1a. *Mol Cell Biol* 12:512 - 517, 1992.
 20. Koike K, Hinrichs SH, Isselbacher KJ, et al.: Transgenic mouse model for human gastric carcinoma. *Proc Natl Acad Sci USA* 86:5615 - 5619, 1989.
 21. Fukamizu A, Sagara M, Sugiyama F, et al.: Neuroectodermal tumors expressing c-, L-, and N-*myc* in transgenic mice that carry the E1A/E1B gene of human adenovirus type 12. *J Biol Chem* 269:31252 - 31258, 1994.
 22. Sarnow P, Ho YS, Williams J, et al.: Adenovirus E1b-58kd tumor antigen and SV40 large tumor antigen are physically associated with the same 54 kd cellular protein in transformed cells. *Cell* 28:387 - 394, 1982.

23. Yew PR, Berk AJ: Inhibition of p53 transactivation required for transformation by adenovirus early 1B protein. *Nature* 357:82 - 85, 1992.
24. Shen Y, Shenk T: Relief of p53-mediated transcriptional repression by the adenovirus E1B 19-kDa protein or the cellular Bcl-2 protein. *Proc Natl Acad Sci USA* 91:8940 - 8944, 1994.
25. Steegenga WT, van Laar T, Shvarts A, et al.: Distinct modulation of p53 activity in transcription and cell-cycle regulation by the large (54 kDa) and the small (21 kDa) adenovirus E1B proteins. *Virology* 212:543 - 554, 1995.
26. Whyte P, Buchkovich KJ, Horowitz JM, et al.: Association between an oncogene and an anti-oncogene: the adenovirus E1A proteins bind to the retinoblastoma gene product. *Nature* 334:124 - 129, 1988.

FIGURE LEGENDS

Fig. 1. Structure of the hrNE1AB transgene. **Top:** The human renin gene. The solid boxes represent the coding exons. **Bottom:** The hrNE1AB gene. The open, solid, and hatched boxes represent the human renin promoter, the E1A gene, and the E1B gene, respectively. TATAA and GC represent TATA and GC boxes, respectively. B, BamHI; K, KpnI; S, ScaI; A, AccI; H, HindIII; E, EcoRI.

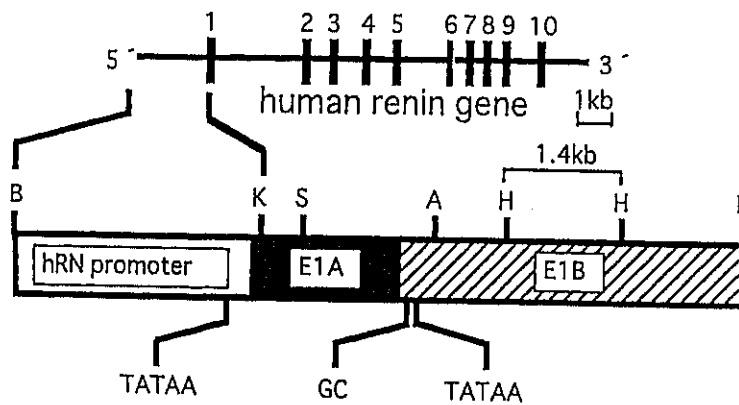


Fig. 2. Cumulative incidence curve of PNET in the transgenic mice.

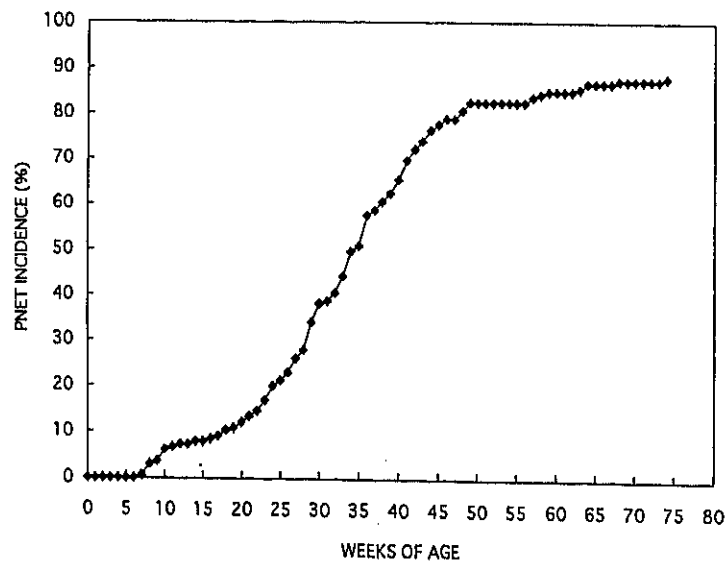


Fig. 3. Age of PNET development in the transgenic mice. More than half of the transgenic mice had PNET from 21 to 40 weeks of age.

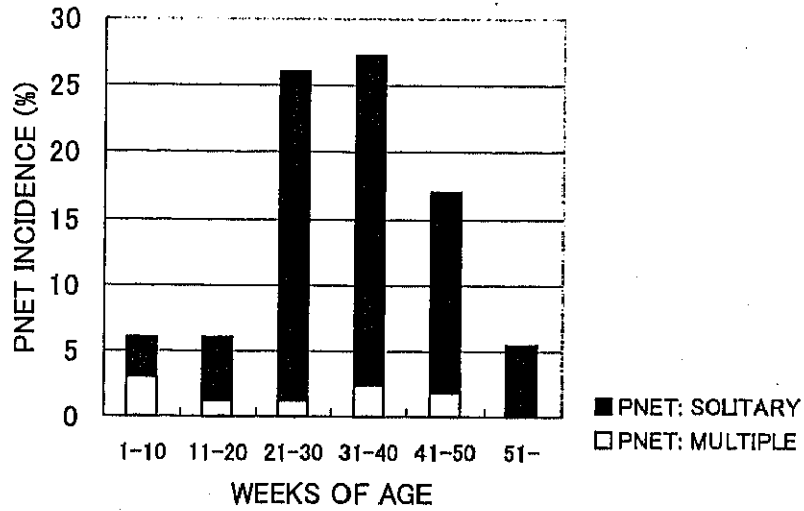


Fig. 4. Sites of PNET development. Central PNETs occurrence increased markedly after 21 weeks of age, while peripheral PNETs occurrence in the abdomen, extremities, and trunk decreased with mouse age.

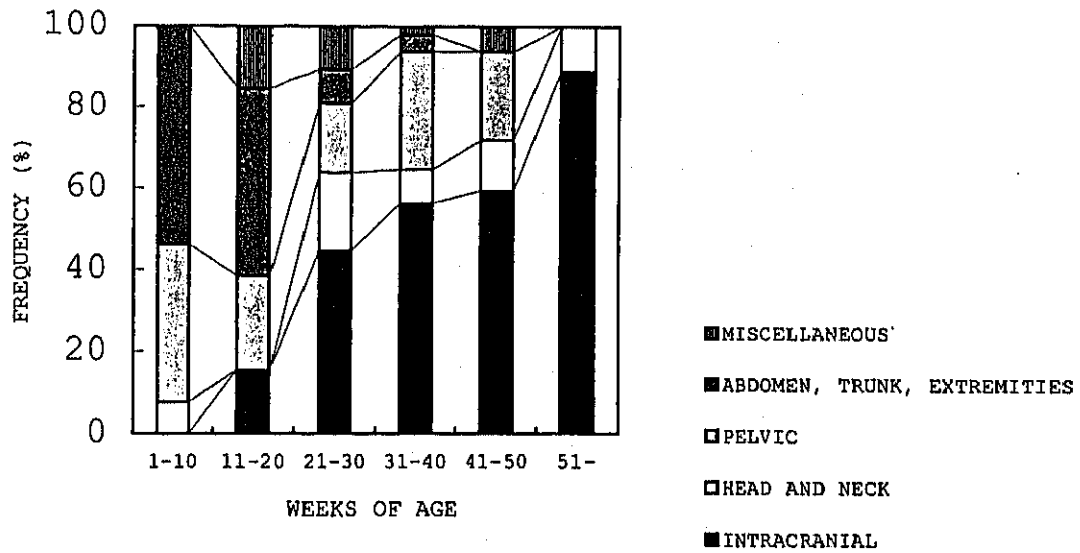


Fig. 5. Histology of PNETs (hematoxylin-eosin staining; original magnification $\times 100$). A. Intracranial PNET. Ependymal rosettes composed of small spindle- to polygonal-shaped cells poor in cytoplasm and rich in chromatin can be seen. B. PNET in male pelvic region. Cylindrical epithelial cells compose tubular rosettes. C. PNET in the abdomen. Small spindle-, tadpole-, or polygonal-shaped cells are distributed irregularly, similar to human peripheral PNET.

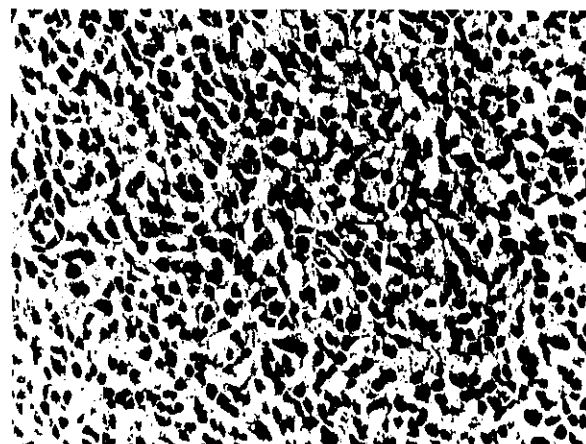
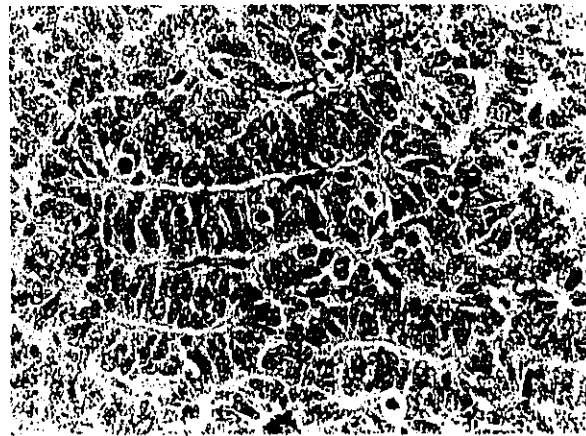
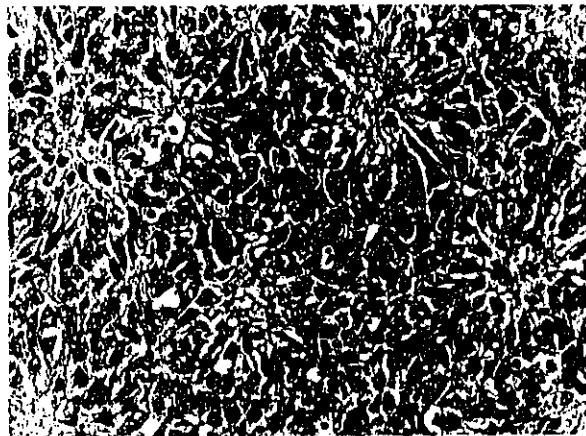


Fig. 6. Ultrastructure of PNETs. A. Intracranial PNET (original magnification $\times 6000$). The cells forming the rosettes are tightly attached at their apices by junctional complexes and the lumen is packed with microvilli, indicating the epithelial character. B. Peripheral PNET in the trunk (original magnification $\times 9000$). Tumor cells have well-developed neuropils and glycogen granules but neurosecretory cored vesicles are rarely found.

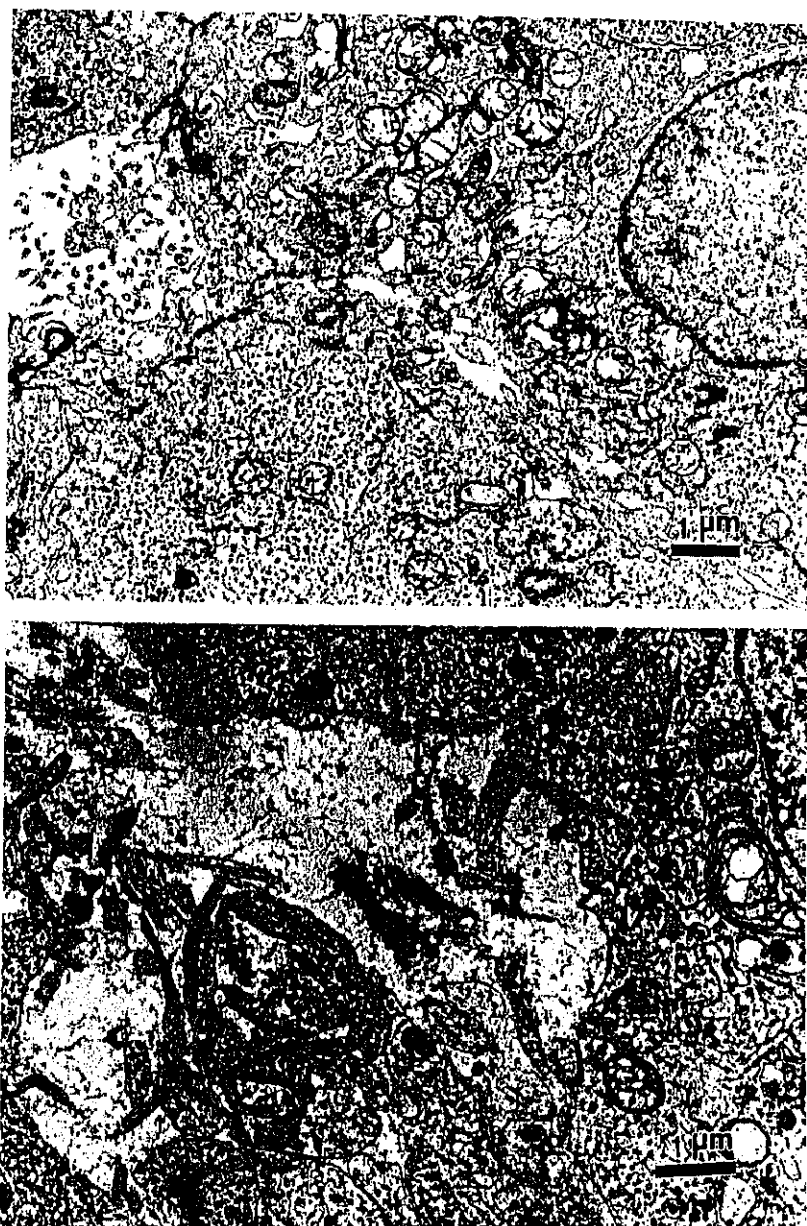


Fig. 7. A. Microscopic section of the narrow segment of the colon in transgenic mice showing abdominal distension due to severe intestinal dilatation (hematoxylin-eosin staining; original magnification $\times 100$). Normal-sized myenteric plexus of Auerbach with mature ganglion cells can be observed. B. Proliferation of acetylcholinesterase-positive nerve fibers in the submucosa is not seen (Acetylcholinesterase stain, original magnification $\times 100$). These findings are incompatible with Hirschsprung disease.



以下の頁は著作権者の許諾を得ていないため、公表できません。

p. 55 ~ p. 69

p. ~ p.

p. ~ p.

p. ~ p.

p. ~ p.