

平成30年6月4日現在

機関番号：37116

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2015～2017

課題番号：15K21565

研究課題名(和文)複製終了不全モデルマウスを用いた老化と発がん機構の解析

研究課題名(英文) Analysis of aging and carcinogenesis mechanism using replication incompleteness model mice

研究代表者

香崎 正宙 (KOHZAKI, Masaoki)

産業医科大学・産業生態科学研究所・助教

研究者番号：90717977

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,100,000円

研究成果の概要(和文)：本研究では、複製終了に関する分子Xのノックアウトマウスを作製し、複製終了機序が破綻することによる発がんや老化などへの影響を個体レベルで解析することを目的とする。これまでに、様々なマウス系統でのX遺伝子ノックアウトマウス樹立を試み、X遺伝子ノックアウトマウスを得ることができたが、実験で用いる必要匹数の確保が技術的に困難であった。そこで、従来のCre/loxP系によるX遺伝子コンディショナルノックアウトマウスを作製することにした。現時点で、loxPで挟まれたX遺伝子のヘテロノックアウトマウスまで得られている。

研究成果の概要(英文)：Inappropriate replication completion may cause genome instability, a characteristic of almost all human cancers. However, the direct relationship between incompleteness of replication and cancer remains largely unknown. Here we sought to establish replication completion-related X gene knockout mice to address the hypothesis and confirm the phenotypes. Although we established gene X knockout mice as a mouse model for replication incompleteness, we found that gene X is partially essential for viability and the viability depends on mouse strains. It was practically difficult for us to conduct several experiments with these mice. Hence, we changed strategy to make conventional conditional X gene knockout mice. At present, we obtained the floxed X gene mice.

研究分野：分子生物学、放射線・化学物質影響科学

キーワード：DNA複製 細胞周期チェックポイント トランスジェニックマウス コンディショナルノックアウト 発がん 老化

1. 研究開始当初の背景

酵母の遺伝学が、その有用性・簡易性から、複製開始や細胞分裂といった生物の根本的な機能解析には欠かせない。1980年代に Hartwell らは、酵母を用いた細胞周期制御因子の同定と、細胞周期チェックポイントの概念を提唱し(PMID:2683079)、生物の本質的な機能は、酵母からヒトまで保存されている事を明らかにし、この功績によってノーベル賞を受賞した。我々は、この細胞周期チェックポイント概念中で最も理解が進んでいない複製終了期のチェックポイントに着目した。そもそも細胞は、どうやって 3×10^9 以上もある膨大な塩基の中から、複製が完了していない数カ所の塩基領域を検索しているのだろうか？酵母では複製終了チェックポイントが存在しないという結論の論文が発表されており(PMID:17347440)、さらに脊椎動物では、G2期での複製終了と分裂期の明確な区別が難しく、多くの研究者が脊椎動物でも複製終了チェックポイントは存在しないか、解析する事が困難であり、明確な結論を出すことは難しいと考えているのが現状である。

単細胞生物と多細胞生物とでは、細胞がん化という点からも理解出来るが、違った生物学的側面を持っていても不思議では無い。細胞がん化の概念の一つに、DNA 組換え・DNA 修復・DNA 複製の異常が遺伝的不安定性と変異の蓄積を誘導することで、結果的にがん化するモデルがある。そこで、今までの科学的知見を元に包括的に分析し、これら DNA 組換え・DNA 修復・DNA 複製関連因子の中から、遺伝子X(未発表のため、遺伝子Xとする)が、特に DNA 複製の終了をチェックする際に重要な機能を持つと仮説を立てた。実際にこの仮説を検証するために、脊椎動物細胞を用いて様々な実験系で機能解析を行ったところ、仮説を支持する矛盾のない結果が得られた。

2. 研究の目的

脊椎動物の細胞レベルで我々の仮説が証明できたので、次の段階として哺乳類のヒト細胞を用いても同じように仮説が成り立つのか検証する。さらに、遺伝子X欠損マウスの個体レベルでの機能解析を行う。遺伝子Xの欠損によって個体レベルで生じる、造血系を含めた各臓器への影響と、発がんや老化との関連性を明らかにすることで、複製終了不全が正常にチェックされることの生物学的な重要性を検証することが目的である。これらの点が明らかになれば、哺乳類動物の幼齢期から老齢期にかけて、包括的に複製終了不全チェックポイントの発がんへの寄与の大きさを理解することができると考えられるので、将来的にヒトにおけるがんの予防法や治療法への応用も期待される。

3. 研究の方法

-FVB 系統、129x1/SvJ 系統背景での X 遺伝子ノックアウトマウス樹立の試み-

C57BL/6 系統背景での遺伝子 X ノックアウトは胎生致死性であったので、繁殖力の高い FVB 系統や、ES 細胞の樹立効率がよい 129x1/SvJ 系統との掛け合わせによって(PMID:11358863)、胎生致死性の回避実験を実施した。

-CRISPR/Cas9 技術を用いたヒト細胞 X 遺伝子破壊-

X 遺伝子欠損ニワトリ DT40 細胞の表現型が、ヒト細胞にまで保存されているか検討するために、X 遺伝子欠損ヒト細胞 HCT116 細胞の樹立を実施した(PMID:23287718)。

-in vivo マウス TAKE 法-

産業医大動物研究センターの宮田博規博士の協力によって、受精卵内に直接標的遺伝子に対する sgRNA と Cas9 タンパクを、エレクトロポレーションで導入して遺伝子改変動物を作製する TAKE 法の産業医大での樹立を試みた(PMID:25269785)。

-in vivo マウス GONAD 法-

大塚正人博士(東海大)と、産業医大動物研究センターの宮田博規博士の協力によって、妊娠マウスの卵管膨大部に、標的遺伝子に対する sgRNA と Cas9 タンパクを直接エレクトロポレーションで導入する GONAD 法の産業医大での樹立を試みた(PMID:26096991)。

-Floxed 遺伝子 X マウス樹立-

近年、国際的なコンソーシアムによって、網羅的な致死遺伝子 Floxed マウスライブラリーが樹立されつつある(PMID:15340423)。検索の結果、European Mouse Mutant Archive (EMMA)に、Floxed 遺伝子 X マウスが登録されていたので、このマウスを使用して、コンディショナル遺伝子 X ノックアウトマウスを樹立することにした。

4. 研究成果

X 遺伝子欠損ヒト細胞 HCT116 細胞を樹立して表現型解析を行ったところ、X 遺伝子欠損 DT40 細胞の表現型と一致する表現型を示した。ジュネーブ大学の共同研究者らが独立して樹立した X 遺伝子欠損ヒト細胞株を用いた表現型解析でも同様の実験結果が確認されている。これらの事から、少なくとも脊椎動物では複製終了チェックポイント機能が存在することが示された。

129x1/SvJ 系統との掛け合わせによって、低い頻度ではあるが、遺伝子 X ノックアウトマウスを樹立することができた。しかし、残念ながら低出生率によって実験に用いる匹数の確保が難しく、129x1/SvJ 系統への戻し交配によっても低出生率の改善は観察され

なかった。この遺伝的背景が複雑なマウスを使用して表現型解析を行っても、表現型の解釈が難しく、この方法でのノックアウトマウスの樹立と、実験による表現型解析を断念した。

上記の問題を解決するために、近年発展がめざましい CRISPR/Cas9 技術に基づく in vivo コンディショナルノックアウトマウス作製方法を試みた。TAKE 法では、エレクトロポレーション後の受精卵から、離乳率が 23.6-42.5%と安定して遺伝子改変マウスがえられたが、ssODN を鋳型とした遺伝子 X イントロン部位への正確な loxP ノックインが難しく、モザイク形成の問題が解決できなかった。一方、GONAD 法は妊娠マウスの卵管膨大部に直接エレクトロポレーションを行うので、TAKE 法よりも技術的に難しく、遺伝子改変マウスの樹立成功率は 1/2-1/3 と低くなってしまった。また、この方法でもモザイク形成等の問題は解決できなかった。上記二つの独立した二つの in vivo 実験を通じて目的のノックアウトマウスの樹立はできなかったものの、産業医大での in vivo マウス CRISPR/Cas9 導入実験系の基盤は整った。

こうした経緯から、最終的に従来の手法によって Floxed コンディショナル X 遺伝子ノックアウトマウスを作製することにした。EMMA から Floxed 遺伝子 X マウスを導入し、ジェノタイピングでヘテロ X 欠損マウスを同定した。現在、FLPe 発現マウスと掛け合わせて lacZ と neo 遺伝子を除去する段階である。今後、Cre-ERT2 マウスと交配させて、TAM 処理によって条件的に X 遺伝子のエキソン 2 を除去することで、遺伝子 X の年齢依存的な発がんや老化における機能解析を行う予定である。今回用いた Floxed 遺伝子 X マウスは C57BL/6N 背景なので、将来的に戻し交配の必要性が無く、直ぐに実験を始められる点が重要である。

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文](計 3 件)

Okazaki R, Ohga K, Yoko-O M, Kohzaki M. A Survey about the Radiation Effects and A Health Survey of Fukushima Inhabitants after the Fukushima Daiichi Nuclear Power Plant Accident. *J UOEH*. 39: 277-290 (2017) Japanese 査読有 doi: 10.7888/juoeh.39.277.

Kohzaki M, Ootsuyama A, Moritake T, Okazaki R. Relationship between Osteosarcoma and Ionizing Radiation Hypersensitive human B lymphocyte cells lacking RecQL4 helicase. *Radiat Biol Res Commun*. 50: 113-134 (2015) Review 査読有

<http://iss.ndl.go.jp/books/R100000002-1000000036398-00>.

Kohzaki M, Ootsuyama A, Moritake T, Abe T, Kubo T, Okazaki R. What have we learned from a questionnaire survey of citizens and doctors both inside and outside Fukushima?: survey comparison between 2011 and 2013. *J Radiol Prot*. 35: N1-17 (2015) 査読有 doi: 10.1088/0952-4746/35/1/N1.

[学会発表](計 13 件)

香崎 正宙, Role of DNA repair pathways in cancer progression, GDN genome stability, 2017 年 2 月、群馬

香崎 正宙, Comparative analysis of whole genome CNV/Indel and replication fork abnormality induced by oncogene overexpression and ionizing radiation, GDN radiation biology & therapy, 2016 年 1 月、東京

香崎 正宙, p53-independent role of RecQL4 C-terminus, including helicase and Hrq1 domains in ionizing radiation and cisplatin induced DNA damage repair, BMB2015, 2015 年 12 月、神戸

香崎 正宙, Evaluation of a novel type of DNA double strand breaks induced by ionizing radiation for protecting workers in long-term decommission of Fukushima Daiichi Nuclear Power Plant, ICRH, 2015 年 6 月、Seoul (Korea)

香崎 正宙, A role of novel type of DNA double strand breaks induced by IR in cancer predisposed autosomal recessive diseases, ICRR 2015, 2015 年 5 月、京都

[産業財産権]

出願状況(計 1 件)

名称: 誤りがち DNA 修復経路の抑制によるがんの治療

発明者: 香崎 正宙

権利者: 産業医科大学

種類: 日本国特許出願

番号: 特願 2017-138916

出願年月日: 2017 年 7 月 18 日

国内外の別: 国内

[その他]

ホームページ等

<http://www.uoeh-u.ac.jp/facilities/labo/kankyohyakabumon/housyasenkenkouigaku/staff.html>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

香崎 正宙 (KOHZAKI, Masaoki)
産業医科大学・産業生態科学研究所・助教

研究者番号：90717977

(2) 研究分担者

該当なし

(3) 連携研究者

該当なし

(4) 研究協力者

宮田博規 (MIYATA, Hironori)

大塚正人 (OHTSUKA, Masato)