

平成 30 年 6 月 7 日現在

機関番号：36102

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2016～2017

課題番号：16K15333

研究課題名(和文)ヌクリング遺伝子欠失マウスを応用した新規発がん性予測システムの開発

研究課題名(英文)Development of novel carcinogenicity prediction system using Nucling gene deficient mouse

研究代表者

坂井 隆志(SAKAI, TAKASHI)

徳島文理大学・その他の研究科・教授

研究者番号：80284321

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,800,000円

研究成果の概要(和文)：ヌクリングKOマウスはSPF環境下、通常食にて飼育の場合、野生型と変わらず生育するが、12ヶ月齢を過ぎると有意に肝炎・肝がんなどの炎症性疾患発症率が上昇した。高脂肪食、高糖食投与による影響(体重増加、耐糖能異常、インスリン抵抗性獲得など)がKOマウスでは高率に出現した。通常食飼育での遺伝子発現様式を調べると、インスリン及びその制御因子の発現量にKOマウスでは異常が認められた。肝毒性のある試薬の投与で、野生型よりも有意に早期にKOマウスで肝臓の脂肪変性や肝炎・肝がんの発症が確認できた。以上より、少なくとも肝臓にストレスのかかる物質の探索には有用な予測システムとなることが期待される。

研究成果の概要(英文)：We confirmed the usefulness of Nucling-KO mouse from various viewpoints as a material for new carcinogenicity prediction system. The KO mice fed normal chow diet grow in the same manner as the wild-type under the SPF environment, but after 12 months of age the incidence of inflammatory diseases such as hepatitis and liver cancer rose significantly. The effects of high fat diet or high sugar diet administration (body weight gain, impaired glucose tolerance, insulin resistance etc.) appeared at a high rate in KO mice. Examination of the gene expression pattern revealed abnormalities in the expression level of insulin and its regulators in KO mice. With the administration of hepatotoxic reagent DEN, onset of fatty liver, hepatitis, and liver cancer could be confirmed in KO mice significantly earlier than wild type. From the above, it is expected that it will be a useful prediction system for at least searching for substances that are stressful to the liver.

研究分野：病態医学

キーワード：発がん 炎症性疾患

## 1. 研究開始当初の背景

マウスヌクリング遺伝子は全長 1411 アミノ酸をコードし、またその配列中にはアンキリンリピート、ロイシンジッパーモチーフ及び二つの t-SNARE コイルドコイルドメインといったタンパク質間相互作用に重要と思われる複数のモチーフが同時に存在する構造を有する (Sakai et al. J. Biochem. 2003, **JB 論文賞**)。これまでの研究成果より、我々は本遺伝子のコードする蛋白分子が細胞傷害性ストレス時に誘導される複数の細胞死 (アポトーシス) 誘導情報伝達経路を制御していることを示す知見を得ている (Kim et al. J. Biochem. 2013)。我々は、ヌクリングの発現異常が潜在的に乳がんを発症しやすくなることを見だし、そのことから離乳後の乳腺退縮時のアポトーシス現象にヌクリングが重要であることを証明し、これを報告した (Dang et al. J Biol. Chem. 2015)。また肝炎に伴う肝がんの発症機構においては、肝実質細胞及びクッパー細胞における NF-κB の活性化 及びそれに伴う アポトーシス抑制 が極めて重要な役割を担っていることが明らかとなってきた。ヌクリング KO マウスでは初代培養胚性線維芽細胞において NF-κB の持続的活性化 が観察されていたが (Liu, Sakai et al. Biochem. J. 2004)、生体肝組織においても多くの **ヌクリング** KO マウス個体において NF-κB の持続的活性化を最近確認している。また、同 KO マウスでは 肝炎・肝がんの自然発症率 が生後一年を経過した集団で著増することが観察されている。

## 2. 研究の目的

化合物の発がん性に関する生体スクリーニングに動物投与実験は欠かせないが、通常のげっ歯類を用いた発がん性試験は投与期間として2年間ほどを要する。ヌクリングノックアウト (KO) マウスは、この投与期間を大幅に短縮することが期待できる。ヌクリン

グ KO マウスは胎児発生に異常は認められず成獣にまで発育するが、生後1年から2年の肝癌自然発症率が SPF 環境において約 30% (野生型の4~5倍) に達し、さらにヌードマウスの遺伝子背景を加えることで乳癌自然発症率が約 20% (野生型はほぼ 0%) になる。本研究の目的は、ヌクリング KO マウスの、発がん性スクリーニングに対する生体試料としての有用性の評価を行うこととする。

## 3. 研究の方法

発がん性が確認されている種々の化合物投与に対する、ヌクリング KO マウス及びヌクリング KO ヌードマウスの癌発症率を野生型マウスと比較検討する。新規スクリーニングシステムにおける発がんマーカーの探索を試みる： ジエチルニトロソアミン (DEN) 投与による遺伝子発現パターンの変化を、同 KO マウスと野生型マウスで時系列的に比較解析する (マイクロアレイ, RNA シークエンスなど)。種々の発がん物質投与によるモニタリング検査を行い、ヌクリング KO マウスの発がん性スクリーニング用生体試料としての有用性を評価する。

## 4. 研究成果

リアルタイム RT-PCR 法を用いて、ヌクリング KO マウスの膵臓及び肝臓におけるインスリン及びその制御因子の発現を調べた。その結果、遺伝的背景は同じであるにもかかわらず KO マウスの個体間でそれらの発現量にかなりのばらつきが認められた。野生型の対象マウスではそのような大きなばらつきは認められなかった。次に、インスリンの膵臓における発現量が野生型の標準偏差内のグループ (K01) とそれ以外のグループ (K02) に分け、それぞれのグループでの膵臓及び肝臓でのインスリン遺伝子及びその上流に位

置する転写因子である Pdx-1 および MafA の遺伝子発現レベルを野生型と比較検討した。その結果、肝臓におけるインスリン発現量は野生型と比較して KO1 では有意差がなく、KO2 では優位に上昇していた。またこれら膵臓及び肝臓におけるインスリンの発現量パターンは、Pdx-1 の発現レベルパターンと酷似していた。一方 MafA の発現量パターンは、膵臓では酷似していたが、肝臓では KO1 グループ、KO2 グループともに野生型よりも有意に増加していた。次に、マイクロアレイを用いてヌクリング KO マウスの肝臓及び膵臓における種々の代謝異常症関連遺伝子の発現量の変動を検討した。その結果、正常のヌクリング KO マウスの肝臓では肝がんのマーカーである フェトプロテイン (AFP) の上昇も、regeneration marker の上昇も認められなかった。このことから同 KO マウスにおける肝がん発症率の増加の要因として胎児肝の成分が残っていると、liver regeneration が進行していると、癌幹細胞が増えているなどではないと思われ、AFP が同 KO マウスにおいても肝がんのマーカーとして有用となることが期待される。

ヌクリング KO マウス (C57Black6/J background) および同 background の野生型マウスを用意し、高脂肪食(HFD)、高グルコース食(HGD)の投与(4ヶ月)による体重増加、インスリン抵抗性、血清インスリン値、血糖値などを調べた。その結果、HFD, HGD 投与による体重の増加率が、野生型に比し KO マウスで有意に高値を示した。HFD, HGD によるインスリン抵抗性獲得も、野生型に比して KO マウスでは有意に上昇(増悪)していた。また、肝毒性のある試薬 DEN の投与で、野生型よりも有意に早期に KO マウスで肝臓の脂肪変性や肝炎・肝がんの発症が確認できた。以上より、少なくとも肝臓にストレスのかかる物質の探索には有用な予測システムとな

ることが期待される。

## 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0件)

[学会発表](計2件)

Dang HV, Sakai T, Pham TA, Tran DH, Yorita K, Shishido Y, Fukui K: A novel apoptosis associated protein, Nucling Controls Mammary Gland Involution by Regulating NF- $\kappa$ B and STAT3: Implication for the pathogenesis of breast cancer, Inaugural Symposium Biochemistry: Towards Academic Excellenc (スリランカ・ボレールズガマワ) 2016年6月22日(招待講演)  
林文琳、坂井隆志. 新規 NF- $\kappa$ B 制御因子ヌクリングはインスリンの発現制御に関与している. 第39回日本分子生物学会年会(パシフィコ横浜、神奈川)12月2日, 2016

[図書](計0件)

[産業財産権]  
出願状況(計0件)  
取得状況(計0件)

[その他]  
ホームページ等

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

坂井 隆志 (SAKAI, Takashi)  
徳島文理大学・健康科学研究所・教授  
研究者番号: 80284321

### (2) 研究分担者

( )

研究者番号:

### (3) 連携研究者

( )

研究者番号：

(4)研究協力者

林 文琳 (LIN, Wenling)

徳島文理大学・大学院博士後期課程在籍