

令和 3 年 8 月 19 日現在

機関番号：16401

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2018～2020

課題番号：18K09169

研究課題名(和文) VHL病の腎がん発生におけるセカンドヒット遺伝子変異の探索

研究課題名(英文) Second-hit gene mutations for developing renal cell carcinoma in VHL disease

研究代表者

辛島 尚 (Karashima, Takashi)

高知大学・教育研究部医療学系臨床医学部門・准教授

研究者番号：60304672

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,400,000円

研究成果の概要(和文)：本研究の目的はVHL遺伝子変異に続くセカンド/サードヒット遺伝子変異を導入することで、腫瘍形成能を有するVHL疾病モデルマウスを製作することである。VHLもしくはPBRM1単独、VHL/PBRM1ダブルヘテロ変異マウスにおいて、いずれも腫瘍形成能を認めなかったが、PBRM1ヘテロ変異マウスの約50%が生後7週を中心(3.5～23週)に死亡し、1匹は尿崩症を発症した。原因として、免疫不全が考えられた。一方、VHL/PBRM1ダブルヘテロ変異マウスはいたって健康であった。VHL変異に引き続くPBRM1変異は、ホメオスタシスを保つために正の意味で惹起された可能性を考えた。

研究成果の学術的意義や社会的意義

臨床形態を表現するVHL病モデルマウスの製作に現時点では至っていないが、研究の過程において、新たなPBRM1の役割が示唆された。PBRM1は、クロマチンの調節に作用をし、成体では主に、脾臓、リンパ節、胸腺、下垂体に高発現している。このことからPBRM1は免疫システムにおいて重要な役割を担う可能性があり、本研究結果は新たな疾患概念の礎になる可能性がある。

研究成果の概要(英文)：The purpose of the present study is to produce a VHL disease model mice capable of tumorigenesis by introducing a second / third hits gene mutations following the VHL gene mutation. No tumorigenicity was observed in VHL or PBRM1 alone or in VHL / PBRM1 double heterozygous mutant mice. However about 50% of PBRM1 heterozygous mutant mice died mainly at the 7th week after birth (3.5-23 weeks). A mouse developed diabetes insipidus. The cause might be immunodeficiency. On the other hand, VHL / PBRM1 double heterozygous mutant mice were very healthy. We considered that the PBRM1 mutation following the VHL mutation may have been positively triggered to maintain homeostasis.

研究分野：泌尿器科

キーワード：腎癌 VHL PBRM1 CRISPR/Cas9 セカンド/サードヒット遺伝子変異 免疫不全

1. 研究開始当初の背景

近年の腎がん研究において、その発生は僅か数個の遺伝子変異で形成されるとされ、数百にも及ぶ遺伝子変異の積み重ねで起こる他の癌とは異なる。共通する変異はフォン・ヒッペル・リンドウ (Von Hippel-Lindau; VHL) がん抑制遺伝子を基盤とし、Protein polybromo-1 (PBRM1) 遺伝子、BRCA1 associated protein-1 (BAP1) 遺伝子の変異がそれに続くことが解かっている。

VHL病は、3番染色体短腕にあるVHLがん抑制遺伝子変異を原因とし、腎臓の淡明細胞がん、中枢神経や網膜の血管芽腫、褐色細胞腫などの全身に腫瘍が多発する常染色体優性の遺伝性疾患である。本疾患の自然史は未だ不明な点が多く、これまでのVHLノックアウト/トランスジェニックマウスではヒトと同様の腫瘍形成は認められず、臨床像を正確に反映する疾病モデルを用いた観察が望まれる。

2. 研究の目的

我々は、VHL病の表現型発生にはVHL遺伝子変異に続き、他の遺伝子の二次ないし三次変異(セカンド/サードヒット)が必要と以前より仮説していた。本研究の目的はVHL遺伝子変異に続くセカンド/サードヒット遺伝子変異を導入することで、腫瘍形成能を有するVHL疾病モデルマウスを製作することである。

3. 研究の方法

(1) VHL および PBRM1 遺伝子変異の選別

VHL変異の選別は、まずはヒト Tyr98His と Arg167Trp を用いる。これらは、Type1 と 2B に相当するVHL病と認識しており、当教室での基礎データの蓄積が多い遺伝子変異である。ヒト Tyr98His に相当するマウスの変異はマウス Tyr64His (mY64H) である。

また、PBRM1 遺伝子変異は Truncated で行った。

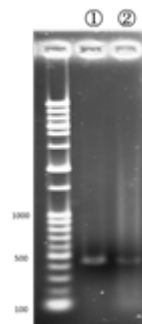
(2) Clustered regularly interspaced short palindromic repeats / CRISPR associated proteins9 (CRISPR/Cas9) を用いた遺伝子導入とマウスの選別

変異 VHL 遺伝子を持つドナーベクターとともに、切断したい標的塩基配列に相補的な配列を含む guide RNA と DNA 切断酵素 Cas9 タンパク質をマウスの受精卵に顕微鏡下注射を行う。この受精卵を仮親マウスの卵管へ移植する。出産されたマウスの組織を用いたシーケンスを行い、ゲノム編集が行われたマウスを選別した。

(3) ジェノタイピング

変異 VHL がノックインされている産仔をスクリーニングするために、ジェノタイピングとダイレクトシーケンスによって、F0 ファウンダーマウス(初代)の同定を行った。次にF0マウスと野生型マウスの自然交配により、次世代(F1)マウスを作製し、ダイレクトシーケンスにてノックインの解析を行う。得られたF0およびF1マウスを継代する。

Y64Hノックインマウス F0-①②
Genotyping



2.19 エレクトロポレーション(Y64H)
2.20 2細胞期胚移植
3.11 出産 *最終的に仔2匹
4.2 Tail cut ~ Genotyping

Genotyping

PCR

Q5 High-Fidelity DNA polymerase
GenomeDNA(tail): 1μL/20μL reaction mix
Primer: mVHL-Y64H-F1, -R1
Expected size: 451bp.
Annealing 67°C, Extension 20sec.
35 cycles

電気泳動にてバンド確認 (5μL/well)

PCR clean-up; ExoSAP-IT
SQ
Big Dye ver.3.1
Purified PCR products: 1μL/20μL reaction mix
Primer: mVHL-Y64H-F1
カラム精製
SQ3130 (Run time 2hr.)

(4) $mVHL^{Tyr64His/Tyr64His}$ と $mVHL^{wt/Tyr64His}$ の製作と観察

両側アレルのゲノム編集マウス $mVHL^{Tyr64His/Tyr64His}$ と片側アレル変異の $mVHL^{wt/Tyr64His}$ を製作し、産仔、表現型の観察、腹部超音波検査、体重変化の観察を行った。

(5) $mPBRM1^{-/-}$ と $mPBRM1^{wt/-}$ の製作と観察

両側アレルのゲノム編集マウス $mPBRM1^{-/-}$ と片側アレル変異の $mPBRM1^{wt/-}$ を製作し、産仔、表現型の観察、腹部超音波検査、体重変化の観察を行った。

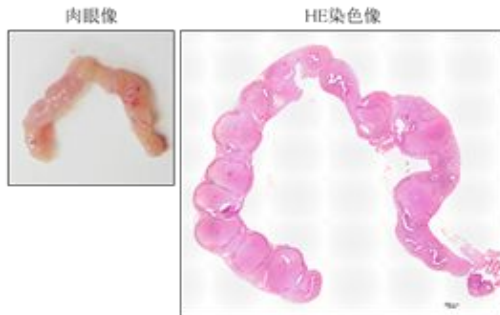
(6) $mVHL^{wt/Tyr64His}/mPBRM1^{wt/-}$ の製作と観察

VHLとPBRM1ダブルヘテロマウスを製作し、産仔、表現型の観察、腹部超音波検査、体重変化の観察を行った。

4. 研究成果

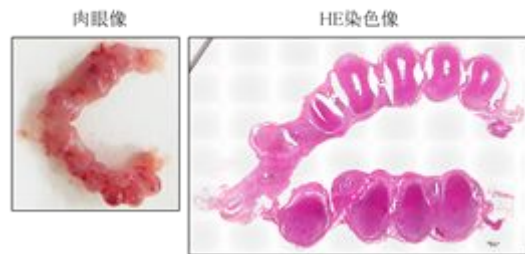
(1)(2)(3)(4)

mVHL-Y64H/WT × mVHL-Y64H/WT 交配
F2マウス (6.5E)



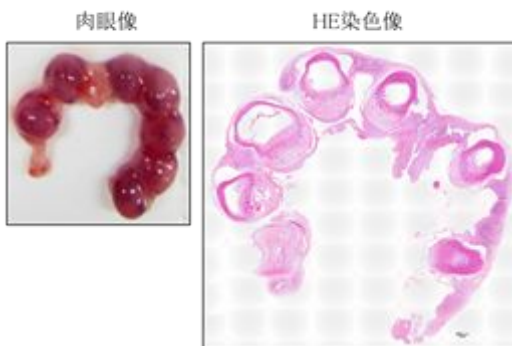
6.5E 胎児がいるべきところに出血が認められた。

mVHL-Y64H/WT × mVHL-Y64H/WT 交配
F2マウス (8.5E)



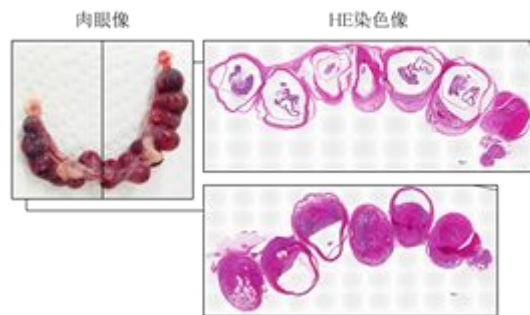
8.5E 胎盤迷路部の発育がWT と比べて不良である。

mVHL-Y64H/WT × mVHL-Y64H/WT 交配
F2マウス (9.5E)



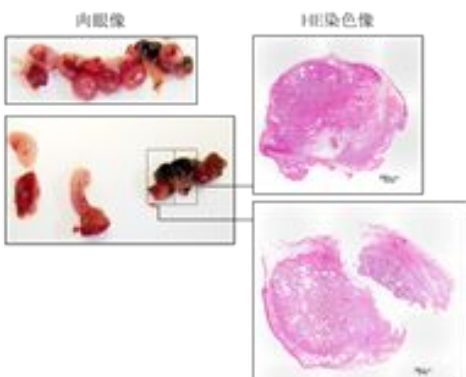
9.5E 迷路部が発育しておらず、鬱血している。胎盤の発育が一様に不良であった。

mVHL-Y64H/WT × mVHL-Y64H/WT 交配
F2マウス (11.5E)



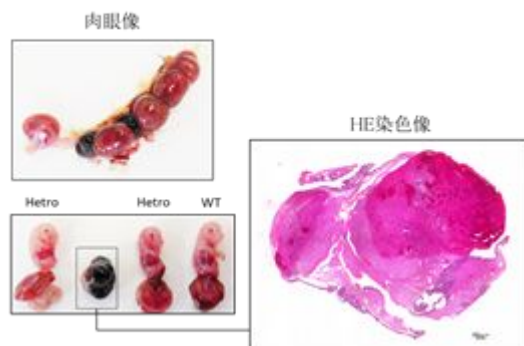
11.5E Y64H/Y64H は胎盤が小さく、全体の発育が不良であった。迷路部は壊死しつつある。

mVHL-Y64H/WT × mVHL-Y64H/WT 交配
F2マウス (12.5E)



12.5E この時期には胎盤の壊死が全体に及んできており、胎盤が迷路部から脱落膜に向かって壊死をきていた。

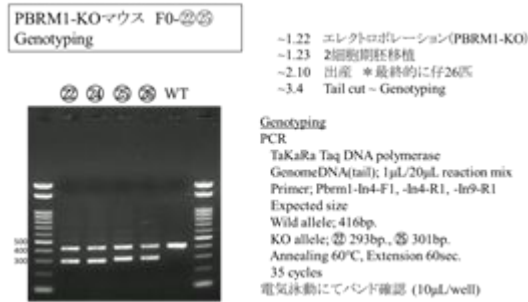
mVHL-Y64H/WT × mVHL-Y64H/WT 交配
F2マウス (14.5E)



14.5E 迷路部～結合部～脱落膜まで胎盤は全般的に壊死に達していた。

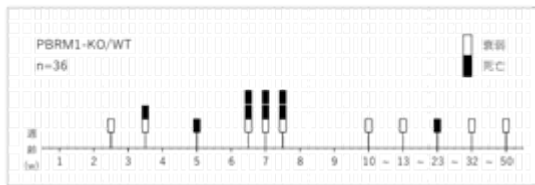
*これまで文献的に 12.5E での胎生致死とされていた現象は、今回の我々の検討で胎児自体の形成が成されない。もしくは 6.5E 未満で失われることがわかった。胎盤はその後も存在するが、胎児側の成分である迷路層の発育は悪く、胎盤全体も小さく未熟であった。9.5E には迷路部の血管の鬱血が認められ、11.5E には迷路層の壊死がはじまっていた。12.5E には、迷路層(胎児側)→結合部→脱落膜層(母体側)に向かって壊死が進み、14.5E には脱落膜層まで全体に壊死が完成していた。

(5)

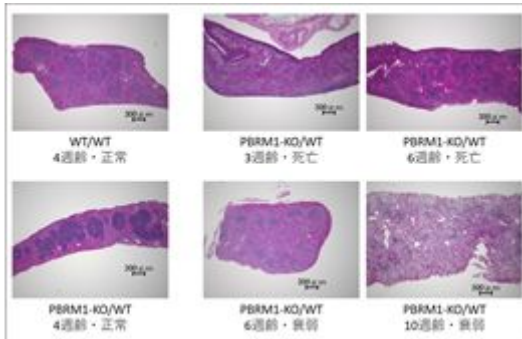


ジェノタイピングを行い、18匹の $mPBRM1^{wt/-}$ を得た。

PBRM1-KO/WTマウス 週齢別衰弱・死亡数

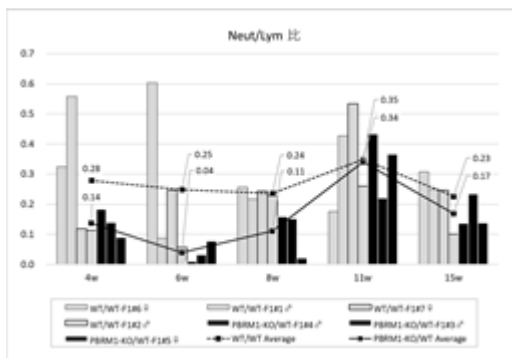


18匹中9匹の $mPBRM1^{wt/-}$ が生後7週を中心(3.5~23週)に死亡した。また、1匹は尿崩症を発症した。

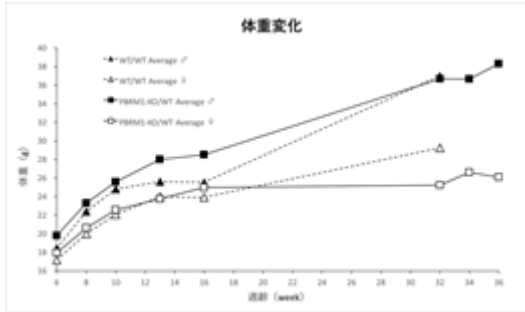


H&E 染色にて、死亡したマウス脾臓のリンパ濾胞の萎縮と消失が見られた。

死亡しなかった $mPBRM1^{wt/-}$ と $mPBRM1^{wt/wt}$ の尾静脈から採血を行い、末梢血液像を検証した。



生後4から11週にかけて、 $mPBRM1^{wt/wt}$ と比較して $mPBRM1^{wt/-}$ において、好中球数が低く、相対的に好中球/リンパ球比が低値であった。生後11週以降はこの差は改善していた。



死亡しなかった $mPBRM1^{wt/-}$ と $mPBRM1^{wt/wt}$ の体重変化に差はなかった。

(6)

$mVHL^{wt/Tyr64His}/mPBRM1^{wt/-}$ ダブルヘテロマウスにおいて、定期的な腹部超音波を中心とした画像診断を行ったが、大きな表現型の変化はなかった。

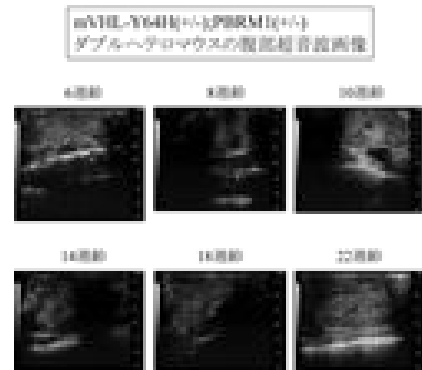
考察とまとめ

$mVHL^{Tyr64His/Tyr64His}$ は胎児形成がない。もしくは、これまでの文献より早くに胎児死亡が起こる可能性が示唆された。

$mPBRM1^{wt/-}$ の死亡は軽度の免疫不全を潜在的に有し、WT では問題にならない程度の軽微な感染症により、免疫的に不安定な離乳時期に重なりマウスが死亡したと考えられた。

$mVHL^{wt/Tyr64His}/mPBRM1^{wt/-}$ ダブルヘテロマウスは、主だった表現型の変化は認めなかったが、 $mPBRM1^{wt/-}$ と比較して死亡例もなく、むしろ元気な印象をもった。

VHL 変異において、負の影響として PBRM1 変異が引き続き誘発されると考えていたが、VHL 変異を補うために、正の意味で PBRM1 変異が起こり、生体のバランスをとっている可能性を考えた。



5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計0件

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
研究分担者	執印 太郎 (Shuin Taro) (70128601)	高知大学・医学部附属病院・特任教授 (16401)	
研究分担者	津田 雅之 (Tsuda Masayuki) (90406182)	高知大学・教育研究部医療学系基礎医学部門・准教授 (16401)	

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関