

令和 5 年 6 月 2 日現在

機関番号：15501

研究種目：若手研究

研究期間：2018～2022

課題番号：18K16255

研究課題名（和文）GONAD法によるSIN3A変異乳がんモデルマウスの作成及び網羅的な標的分子探索

研究課題名（英文）Generation of SIN3A mutant knock-in mice using GONAD method and searching of target molecule of breast cancer

研究代表者

渡邊 健司（Watanabe, Kenji）

山口大学・大学研究推進機構・助教

研究者番号：50711264

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 2,500,000円

研究成果の概要（和文）：エストロゲン受容体（ER）は、半分以上の乳がんで高い発現が認められており、細胞増殖に關与することから治療標的の一つとなっている。ER発現を増加させる遺伝子変異を同定するため、乳がん患者由来のサンプルをERの発現ごとに高発現群、低発現群に分類し、次世代シーケンサーを用いたエクソーム解析を行った。その結果、検出したSIN3Aのナンセンス変異が、ER発現増加を介して細胞増殖を促進することを明らかにした。SIN3Aの生体における機能を詳細に確認するため、GONAD法によるSIN3A変異ノックインマウスの作成に着手した。条件検討の結果、GONAD法による遺伝子改変マウスの作成に成功した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

私たちは、SIN3A変異が乳がん細胞の増殖を促進することを明らかにした。乳がんにおけるSIN3Aの機能をさらに詳細に明らかにするためには、*in vivo*モデルを確立し、生体に近い系で解析することが一番の近道である。しかしながら現在、SIN3Aの機能を解析できるモデル動物は存在しない。本研究は、GONAD法を用いてノックインマウスを作成し、世界初のSIN3Aの機能を解析できるモデルマウスを確立するものである。GONAD法を用いて遺伝子改変マウスの作成に成功した。

研究成果の概要（英文）：The estrogen receptor (ER), which exhibits high expression in over half of breast cancers, has become one of the therapeutic targets due to its involvement in cell proliferation. To detect gene mutations that increase ER expression, we classified samples from breast cancer patients into high-expression and low-expression groups based on ER expression and performed exome analysis using next-generation sequencing. As a result, we found that the detected nonsense mutation in SIN3A promotes cell proliferation through increased ER expression. To extensively investigate the functionality of SIN3A *in vivo*, we initiated the creation of SIN3A mutant knock-in mice using the GONAD method. Through careful consideration of the conditions, we successfully generated genetically modified mice using the GONAD method.

研究分野：分子生物学

キーワード：乳がん SIN3A

様式 C-19、F-19-1、Z-19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

乳がんは、女性の罹患率第1位のがんであり、死亡者数は未だに上昇している。約60%の乳がんは Estrogen receptor α (ER α) の高発現が認められ、ER α 陽性乳がんに分類される。内分泌療法は、ER α 陽性乳がんに対する主要な治療であるがタモキシフェンなどの ER α シグナル抑制剤は、初期ステージでの投与により大幅に再発率が下がる一方、内分泌療法にも関わらず、多くの女性は再発する。このような女性への治療の選択肢は少ない。耐性の原因の一つはゲノム異常である。乳がんを含め、すべてのがんは、増幅・欠失・変異などのゲノム異常の蓄積により多様性を獲得する。蓄積されたゲノム異常はヘテロな細胞集団を形成し、恒常的なER α 発現を維持し、内分泌療法耐性に寄与する。耐性を打破するためには、ゲノム異常によって形成される細胞群の分子機構を理解し、特徴に合わせた ER α を抑制する治療戦略が必要である。しかしながら、ER α 陽性乳がんにおいてER α 発現を上昇させる変異遺伝子は明らかではない。ER α 発現上昇に関わる遺伝子変異を特定する。

2. 研究の目的

私たちは、ER α 発現を増加させる遺伝子変異を同定するため、これまでにER α 高発現群、低発現乳がん患者組織のゲノム DNA について、次世代シーケンサーを用いた全エクソーム解析を行った。検出した変異遺伝子の内、ER α の上流に位置し、ER α の発現を抑制する機能が報告されていた Switch-Independent 3 Transcription Regulator Family Member A (SIN3A) の変異に着目し、ER α 発現に対する機能を検討した結果、(i) 変異体は ER α の発現を上昇させるLoss-of-function 変異であること、(ii) 変異体は、乳がん細胞株の増殖を促進することを見出した (Watanabe et al., Sci Rep, 2018)。これらの結果は、SIN3A の変異誘導性の ER α 陽性乳がんが存在することを示唆する。本研究では、SIN3A 変異の機能をより明確にし、Loss-of-function 変異により、SIN3A の機能が低下した ER α 陽性乳がんにおける治療標的分子を in vivo、in vitro モデルを用いて同定することを目的とする。目的を達成するために、本研究では、SIN3A 変異ノックインマウスを作成し、SIN3A 変異体の機能を詳細に検討する。ノックインマウスの作成は、従来の方法では、多大な時間を要する。そこでCRISPR/Cas9ゲノム編集システム、GONAD法を利用し、短期間でノックインマウスを作成する。GONAD法は、東海大学の太塚氏らにより開発された方法で、これまで熟練の技術が必要であった採卵、核酸の顕微注入、移植操作をなくすことで、小規模研究室でも遺伝子改変マウスを作製することを可能にする画期的な手法である(Gou Takahashi et al., Scientific Reports, 2015)。本申請では、GONAD法を用いてLoss-of-function 変異を有する SIN3A のノックインマウスを作成することで、これまでに存在しなかった SIN3A 機能不全モデルマウスを作成し、SIN3Aの機能を in vivo において検証することでSIN3A変異乳がんの病態を解明する。

3. 研究の方法

SIN3A 機能不全モデルマウスを作成するため、GONAD 法を用いて SIN3A 変異をノックインする。Rosa26 プロモーター領域の下流を認識する gRNA を設計した。ノックイン配列 -LSL (LoxPDsRed-stop-LoxP) 配列-GFP-SIN3A WT cDNA 配列-を設計した。設計した gRNA およびノックイン配列の受精卵への導入は、GONAD法により実施する。まず、マウスを交配し、交配確認後、卵管にgRNA、CAS9 タンパク質、ノックイン配列または TMR-Dextran を注入し、ネッパジーン社のエレクトロポレーター NEPA21を用いてエレクトロポレーションすることにより、受精卵にベクターを導入し

た。

4. 研究成果

私たちは、乳がん患者由来のサンプルをエストロゲン受容体 (ER) の発現ごとに高発現群、低発現群に分類し、次世代シーケンサーを用いたエクソーム解析を行った。その結果、検出した SIN3A のナンセンス変異が、ER 発現増加を介して細胞増殖を促進することを明らかにしました。SIN3A の生体における機能を詳細に確認するため、SIN3A 変異を発現するマウスの作成に着手した。変異体を発現するマウスを作成するための予備検討を実施した。まず操作手技を確立するため、卵子への蛍光色素の導入を試みた。マウスを交配後、プラグを確認し、0.7 日目のマウスについて、2 μ g/ μ L TMR-dextran, 0.05% trypan blue を含む Opti-MEM 1.5 μ L を卵管に注入し、ネッパジーン社のエレクトロポレーターを用いてトランスフェクションした。トランスフェクション後、24 hr において、卵管を取り出し、500 μ L の 3%FBS/PBS を子宮側から卵管側に向けて灌流、卵管を切り刻み卵子を回収した。回収した卵子を蛍光顕微鏡で観察した。その結果、ほとんどの卵子に蛍光色素が導入されていることを確認した(図 1)。ノックイン予定のオリゴ DNA 配列の作成に時間がかかったため、さらに GONAD 法の手技を確立させるため、実際に gRNA、CAS9 をトランスフェクションし、ゲノム編集マウスを作成できるか検討した。AKR1B7 遺伝子において、gRNA を作成し、交配したマウスの卵管に CAS9 と共に注入し、トランスフェクションした。GONAD 法を用いて処置したマウスから生まれた胎児の内、13.5% が、ホモのノックアウトだった。23.1%は、AKR1B7 のヘテロのノックアウトだった。25% は、複数の箇所がノックアウトされたモザイク状態であり、短期間に両アレルノックアウトマウスを作成することができた。蛍光色素、gRNA を用いて、GONAD 法を用いて卵管においてトランスフェクションし、遺伝子改変マウスを作成することに成功し、GONAD 法を再現することができた。今後は、SIN3A コンディショナルノックインマウスの作成するための検討をおこなっていく予定である。

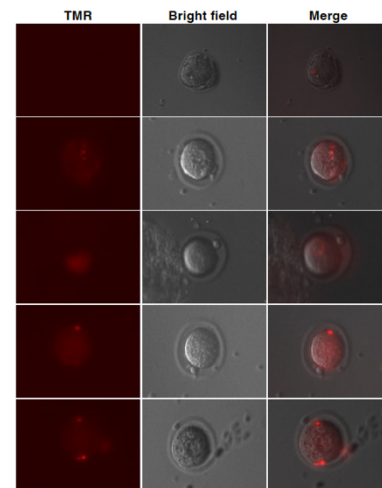


図1: GONAD 法による卵子への蛍光色素の導入

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計9件（うち査読付論文 5件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 3件）

1. 著者名 Matsumura Takuro, Ohta Yasuharu, Taguchi Akihiko, Hiroshige Syunsuke, Kajimura Yasuko, Fukuda Naofumi, Yamamoto Kaoru, Nakabayashi Hiroko, Fujimoto Ruriko, Yanai Akie, Shinoda Koh, Watanabe Kenji, Mizukami Yoichi, Kanki Keita, Shiota Goshi, Tanizawa Yukio	4. 巻 534
2. 論文標題 Liver-specific dysregulation of clock-controlled output signal impairs energy metabolism in liver and muscle	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Biochemical and Biophysical Research Communications	6. 最初と最後の頁 415 ~ 421
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.bbrc.2020.11.066	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Shimizu Fumitaka, Ogawa Ryo, Mizukami Yoichi, Watanabe Kenji, Hara Kanako, Kadono Chihiro, Takahashi Toshiyuki, Misu Tatsuro, Takeshita Yukio, Sano Yasuteru, Fujisawa Miwako, Maeda Toshihiko, Nakashima Ichiro, Fujihara Kazuo, Kanda Takashi	4. 巻 9
2. 論文標題 GRP78 Antibodies Are Associated With Blood-Brain Barrier Breakdown in Anti-Myelin Oligodendrocyte Glycoprotein Antibody-Associated Disorder	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Neurology - Neuroimmunology Neuroinflammation	6. 最初と最後の頁 e1038 ~ e1038
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1212/NXI.0000000000001038	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Xu Wenxi, Watanabe Kenji, Mizukami Yoichi, Yamamoto Yoshinari, Suzuki Takuya	4. 巻 712
2. 論文標題 Hydrogen sulfide suppresses the proliferation of intestinal epithelial cells through cell cycle arrest	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Archives of Biochemistry and Biophysics	6. 最初と最後の頁 109044 ~ 109044
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.abb.2021.109044	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -

1. 著者名 Harada Koji, Ferdous Tarannum, Fujiwara Rieko, Watanabe Kenji, Mizukami Yoichi, Mishima Katsuaki	4. 巻 23
2. 論文標題 An elemental diet protects mouse salivary glands from 5-fluorouracil-induced atrophy	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Oncology Letters	6. 最初と最後の頁 178-178
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3892/ol.2022.13298	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -

1. 著者名 Takuro Matsumura, Yasuharu Ohta, Akihiko Taguchi, Syunsuke Hiroshige, Yasuko Kajimura, Naofumi Fukuda, Kaoru Yamamoto, Hiroko Nakabayashi, Ruriko Fujimoto, Akie Yanai, Koh Shinoda, Kenji Watanabe, Yoichi Mizukami, Keita Kanki, Goshi Shiota, Yukio Tanizawa	4. 巻 534
2. 論文標題 Liver-specific dysregulation of clock-controlled output signal impairs energy metabolism in liver and muscle.	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Biochem Biophys Res Commun.	6. 最初と最後の頁 415-421
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.bbrc.2020.11.066.	査読の有無 無
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Koji Harada, Tarannum Ferdous, Kenji Watanabe, Yoichi Mizukami, Katsuaki Mishima	4. 巻 -
2. 論文標題 Effects of an elemental diet, Elental(R), may differ between healthy oral cells and oral cancer cells	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Oncol. Rep.	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3892/or.2020.7896.	査読の有無 無
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Keishiro Isayama, Kenji Watanabe, Mariko Okamoto, Tomoaki Murata, Yoichi Mizukami	4. 巻 20
2. 論文標題 Standardization of an LNA-based TaqMan assay qPCR analysis for Aspiculuris tetraptera DNA in mouse faeces	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 BMC Microbiology	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1186/s12866-020-02053-6.	査読の有無 無
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Michiaki Kohno, Shigeki Kobayashi, Takeshi Yamamoto, Ryosuke Yoshitomi, Toshiro Kajii, Shohei Fujii, Yoshihide Nakamura, Takayoshi Kato, Hitoshi Uchinoumi, Tetsuro Oda, Shinichi Okuda, Kenji Watanabe, Yoichi Mizukami, Masafumi Yano	4. 巻 3
2. 論文標題 Enhancing calmodulin binding to cardiac ryanodine receptor completely inhibits pressure-overload induced hypertrophic signaling	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Communications Biology	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1038/s42003-020-01443-w.	査読の有無 無
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Watanabe K, Yamamoto S, Sakaguti S, Isayama K, Oka M, Nagano H, Mizukami Y.	4. 巻 8
2. 論文標題 A novel somatic mutation of SIN3A detected in breast cancer by whole-exome sequencing enhances cell proliferation through ER expression.	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Scientific Reports	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1038/s41598-018-34290-1	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている(また、その予定である)	国際共著 -

[学会発表] 計11件(うち招待講演 0件/うち国際学会 1件)

1. 発表者名 渡邊 健司、山本 滋、前田 訓子、西村 愛代、諫山 慧士朗、岡 正朗、永野浩昭、水上 洋一
2. 発表標題 乳癌組織で検出された転写抑制因子SIN3A変異体は核外移行しエストロゲン受容体を増加させ増殖を促進する
3. 学会等名 第44回分子生物学会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 伊賀瀬 雅也、岩谷 直、酒井 和紀、渡邊 健司、水上 洋一、水野 拓也
2. 発表標題 犬のリンパ球における5-アミノレブリン酸のIL-17産生増強作用
3. 学会等名 第164回日本獣医学会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 A. Nakatsuka, T. Esumi, Y. Mizukami, K. Watanabe and H. Itamura
2. 発表標題 Transcriptome analysis in the pulp of 'Saijo' persimmon during storage at low temperature
3. 学会等名 7th International Symposium on Persimmon (国際学会)
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 武藤 潤、福田信治、渡邊健司、水上洋一、佐山浩二
2. 発表標題 高濃度トレハロースを用いた自家細胞由来3次元皮膚シート作製法開発
3. 学会等名 第5回エラスチン/関連分子研究会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 諫山 慧士朗、渡邊 健司、坂口 修一、村田 智昭、水上 洋一
2. 発表標題 加齢に伴って変化する子宮遺伝子群のトランスクリプトーム解析
3. 学会等名 第44回分子生物学会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 水上 洋一、畑中千春、中川真喜子、西村愛美、渡邊 健司
2. 発表標題 ロボット分注装置を用いた新型コロナウイルスPCR検査の迅速解析方法の開発
3. 学会等名 第32回日本医学看護学教育学会学術学会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 渡邊 健司、山本 滋、前田 訓子、坂口 修一、岡 正朗、永野浩昭、水上 洋一
2. 発表標題 乳癌患者から検出したミトコンドリアDNAの体細胞変異は自然免疫受容体パスウェイを活性化する
3. 学会等名 第61回日本生化学会中国・四国支部例会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 渡邊 健司、山本 滋、前田 訓子、坂口 修一、八木 美佳子、康 東天、岡 正朗、永野浩昭、水上 洋一
2. 発表標題 乳癌患者から検出したミトコンドリアDNA体細胞変異発現細胞の全転写産物解析
3. 学会等名 第43回分子生物学会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 諫山 慧士朗、渡邊 健司、坂口 修一、大塚 正人、水上 洋一
2. 発表標題 次世代シーケンスとGONAD法を用いた卵巣老化における排卵機能低下の原因遺伝子の解明
3. 学会等名 第60回日本生化学会中国・四国支部例会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 渡邊 健司、山本 滋、坂口 修一、岡 正朗、永野浩昭、水上 洋一
2. 発表標題 乳癌患者から検出した転写抑制因子SIN3Aの体細胞変異は核外移行によってエストロゲン受容体の発現を誘導する
3. 学会等名 第59回 日本生化学会 中国四国支部例会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 渡邊 健司、山本 滋、坂口 修一、岡 正朗、永野浩昭、水上 洋一
2. 発表標題 乳癌組織で検出された転写抑制因子SIN3A変異体は核外移行することでエストロゲン受容体を介して増殖を促進する
3. 学会等名 第41回 日本分子生物学会
4. 発表年 2018年

〔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
研究協力者	水上 洋一 (Mizukami Yoichi)		
研究協力者	諫山 慧士朗 (Isayama Keishi ro)		

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
---------	---------