

令和 4 年 5 月 20 日現在

機関番号：14101

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2019～2021

課題番号：19K06456

研究課題名(和文)臓器特異的遺伝子編集によるRasドライバー発癌制御遺伝子座解析系の実証的構築

研究課題名(英文)Empirical construction of organ-specific gene editing system for analysing Ras driver carcinogenesis control locus

研究代表者

鈴木 昇 (SUZUKI, NOBORU)

三重大学・地域イノベーション推進機構・准教授

研究者番号：00202135

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,300,000円

研究成果の概要(和文)：Ras活性化変異後の発癌プロセスに特化した量的遺伝子座解析動物システムを開発し、発癌物質による肺癌モデルのようにRas変異前のプロセス(発癌物質の代謝、DNA修復、体細胞組み換えなど)ホスト因子による反応など)の影響を最小化した。これにより、これまで見出せなかった肺癌細胞で発現する遺伝子18個(Srsf6、Cdc7、Chek2、Adam8、Dusp4、Zdhc2、Naf1、Nat2、Calr、Fto、Ndgr4、Nfat5、Zfhx3、Kmt2a、Sik3、USP32、Mrp23、Trim25)が細胞増殖抑制活性を、1個(Dek)が細胞増殖促進活性を有する示した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

ポストRas変異に特化したQTL解析系では、化学発癌モデルのようにRas変異前プロセス(発癌物質の代謝、DNA修復、体細胞組み換えなど)ホスト因子など)の影響をミニマムにしてRasドライバー発癌プロセスに関与する遺伝子を探索可能にした。化学発癌モデルでもRas変異が重要イベントと推測されながらも、QTL解析を行った多数の研究者らが発癌制御遺伝子同定に未踏であった。したがって、本研究成果は次の研究の橋渡しとなりえるものである。他の候補遺伝子についても同様の手法で個体レベルの検証が可能である。一つの遺伝子の検証に、5匹程度のみ必要とするこの手法は必要動物数の減少にも大きく貢献すると考えられる。

研究成果の概要(英文)：We have developed an animal system for a quantitative gene locus analysis specialized for the carcinogenic process after Ras activating mutation and hosted the process before Ras mutation (metabolism of carcinogen, DNA repair, somatic cell recombination) like a lung cancer model by a carcinogen. As a result, 18 genes expressed in lung cancer cells that nobody has found so far (Srsf6, Cdc7, Chek2, Adam8, Dusp4, Zdhc2, Naf1, Nat2, Calr, Fto, Ndgr4, Nfat5, Zfhx3, Kmt2a, Sik3, USP32, Mrp23, Trim25) showed cell proliferation inhibitory activity, and one (Dek) showed cell proliferation promoting activity.

研究分野：実験動物学

キーワード：発癌モデル動物 Rasドライバー発癌 発癌制御遺伝子 量的形質遺伝子座解析 Quantitative Trait Loci Ras変異 ポストRas変異

科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属します。

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

変異 K-ras 遺伝子をドライバーとする肺腺癌の K-ras 以外を標的とする分子標的薬の開発には、K-ras 遺伝子変異後 (ポスト Ras 変異) のシグナル過程を修飾する分子群の解明が必須である。この解明の主たる障害理由の一つは、動物モデルとして、ウレタンや MNU などの化学発癌剤によって発癌誘導したマウスモデルの使用やそれに由来する細胞の使用にある。現状では、国内外の多数の研究者が 30 年近く費やし、A/J 系統と C57BL/6 系統等の化学肺発癌感受性の差を利用した量的遺伝子座 (QTL) 解析の結果、約 50 の遺伝子座を感受性遺伝子座としてマップし、その 4 分の 1 がポスト Ras 変異の発癌過程を修飾し得ることを示唆したにすぎない。本研究開始当初、未だに具体的な治療ターゲットとしての遺伝子の報告はなかった。申請者は、これまでの多数の遺伝子改変動物を主とするモデル動物を作製・解析した経緯を生かし、Cre/LoxP システム応用による条件的に誘導可能な癌型 K-Ras ドライバー癌モデル動物を開発していた。これにより、プレ Ras 変異イベントの影響を可能な限り排除する動物実験系を構築し、ポスト Ras 変異の発癌過程を修飾する治療ターゲット遺伝子の探索システムを立ち上げた。次に、癌型 Ras を条件的に発現する 2 系統を樹立し、化学発癌高感受性とされていた A/J 系統が Ras 遺伝子変異には抵抗性であり、逆に、化学発癌抵抗性 C57BL/6 系統 (B6 系統) は Ras 遺伝子変異には高感受性であるという系統差を見出していた。さらに、これらの交配による QTL 解析によって、第 3 番と第 11 番染色体上に、A/J 系統において腫瘍数を正に調節する新規の 2 つの座位 (D3Mit19, D3Mit45)、負に調節する 1 つの座位 (D11Mit20) の同定に成功していた。

2. 研究の目的

QTL 解析をさらに進め Ras ドライバー発癌制御遺伝子座を見出すこと、QTL 解析によって候補された遺伝子座に含まれる多数の遺伝子について、癌型 K-Ras ドライバー発癌における作用の有無の迅速な判定や、個体レベルでの作用メカニズムの効率的な解析を実現する実験システムを構築し、機能解析することを目指す。データベースの活用、培養細胞を用いた機能解析、動物モデルでの機能解析等を総合的に駆使する。最終的に Ras 遺伝子変異をドライバーとする癌治療における分子標的の同定、発癌分子基盤の解明、治療法の開発に貢献する。

3. 研究の方法

任意の遺伝子について、癌型 K-Ras ドライバー発癌過程を修飾する作用の有無を判定する実験システムの構築を目指した。解析する遺伝子の候補は、QTL 解析によって絞られた遺伝子座に含まれる多数の遺伝子を塩基配列データベースと照合し、UT 領域バリエーション、スプライス領域バリエーション、ミスセンスバリエーション、およびインフレームバリエーションに分類し

た。次に、これらの遺伝子について、Pub Med データベースによって、発癌、Ras シグナル伝達との関係性によって重み付けを行った。絞り込まれた遺伝子について、正常肺、K-ras 変異肺癌細胞株等で mRNA 発現を解析した。さらに、RNA 干渉実験で K-ras 変異肺癌細胞株の増殖への影響を調べた。

確認実験としての動物使用による in vivo 実験は以下のように行った。まず、それぞれの候補遺伝子の shRNA または sgRNA と Cre 遺伝子を同時に発現するウイルスベクターを作製した。次に、条件的に癌型 Ras を発現するマウスの気道に感染することにより、肺上皮細胞特異的に活性化 Ras 発現すると同時に、目的遺伝子をノックダウンまたはノックアウトして、候補遺伝子の Ras ドライバー発癌への影響（促進または抑制）を調べることを試みた。

4 . 研究成果

Ryr2^{tm1Nobs} allele に C57BL/6J と A/J 系統の遺伝子背景を導入し、C57BL/6J-*Ryr2*^{tm1Nobs} と the A/J-*Ryr2*^{tm1Nobs} の 2 系統のマウスを作製した。Ad-Cre 感染 8 週において、C57BL/6J-*Ryr2*^{tm1Nobs/+} マウスは A/J-*Ryr2*^{tm1Nobs/+} マウスの約 12.5 倍の肺癌腫瘍数を示した。この 2 系統に対して常染色体上に 5-10 センチモルガン (cM) の間隔のマイクロサテライトマッピングと腫瘍数のパネルを作製し、QTL 解析であることを示し実証した。In vitro 解析のために、C57BL/6J-*Ryr2*^{tm1Nobs/+} マウスに Ad-Cre ウィルスを感染し肺癌を誘導し、腫瘍塊より、K-ras 活性化肺癌細胞株 (LAC#1174 と命名) を樹立した。CRISPR/Cas9 システムを応用し、肺上皮細胞特異的に遺伝子ノックアウト可能なマウス系統 (構成的に CAS9 発現する *ROSA-CAS9*^{K1/+}; C57BL/6J-*Ryr2*^{tm1Nobs/+} マウス) を樹立した。

研究開始時点で明らかにしていた 3 つの遺伝子座 (*D3Mit19*, *D3Mit45*, *D11Mit20*) にある 5 つの遺伝子は in vitro 解析でドロップアウトしたため、QTL 解析をさらに進め、新たに 18 の遺伝子座をマップした。このうち 16 の遺伝子座は、従来報告されていた化学発癌マウスモデルを使用した QTL 解析から報告された肺腫瘍感受性遺伝子座とは異なるものであった。これらの遺伝子座から、データベース検索によって、系統間で U T 領域バリエント、スプライス領域バリエント、ミスセンスバリエント、およびインフレームバリエントが認められる遺伝子 365 個を抽出した。次に、文献検索により、発癌、Ras シグナル伝達との関係を調べ、81 の推定候補遺伝子を選択した。さらに、in vitro 解析から、遺伝子を候補した。LAC#1174 細胞で発現する遺伝子に限定して、RNAi によって細胞増殖に与える影響を検討した。その結果、18 個の遺伝子 (*Srsf6*, *Cdc7*, *Chek2*, *Adam8*, *Dusp4*, *Zdhc2*, *Naf1*, *Nat2*, *Calr*, *Fto*, *Ndgr4*, *Nfat5*, *Zfhx3*, *Kmt2a*, *Sik3*, *USP32*, *Mrp23*, *Trim25*) が細胞増殖抑制活性を示し、1 個の遺伝子 (*Dek*) が細胞増殖促進活性を示した。

このようにポスト Ras 変異に特化した QTL 解析系では、発癌物質による肺癌モデルのように Ras 変異前のステップ (発癌物質の代謝、DNA 修復、体細胞組み換えなどホスト因子による反応ステップ) の影響をミニマムにして Ras ドライバー発癌プロセスに関わりえる遺伝子を探索可能にした。化学発癌モデルでも Ras 変異が重要イベントと推測されながら

も、QTL 解析を行った多数の研究者らが発癌制御遺伝子同定に未踏であった。したがって、本研究成果は次の研究の橋渡しとなりえるものである。

とりわけ、Cdc7 遺伝子については、U6-Cdc7-gRNA-EF1a2-Cre レンチウイルスを作成した。これを、CAS9KI/+; C57BL/6J-Ryr2tm1Nobs/+ マウスに Cdc7 遺伝子を標的とする gRNA と Cre 遺伝子を発現する。Cdc7 遺伝子をノックアウトした正常肺細胞で Ras ドライバー発癌を再現できる。結果、発癌腫瘍数は、Cre 遺伝子のみを発現するウイルスを感染させたコントロールに比較し有意に減少の傾向にあった。よって、Cdc7 は、癌型 K-Ras 遺伝子による肺発癌 modifier 遺伝子である可能性が高いことが個体レベルで証明された。今後、他の候補遺伝子についても同様の手法で個体レベルの検証が可能である。一つの遺伝子の検証に、5 匹程度のみ必要とするこの手法は必要動物数の減少にも大きく貢献すると考えられる。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計12件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 9件）

| |
|---|
| 1. 発表者名 齊藤浩充、鈴木昇 |
| 2. 発表標題 肺発癌モデルマウスによる新規発癌感受性遺伝子の探索と解析 |
| 3. 学会等名 第85回日本生化学会中部支部例会（国際学会） |
| 4. 発表年 2020年 |

| |
|---|
| 1. 発表者名 齊藤浩充、鈴木昇 |
| 2. 発表標題 癌型K-Ras依存的な肺発癌modifier候補遺伝子の解析 |
| 3. 学会等名 第67回日本実験動物学会総会（国際学会） |
| 4. 発表年 2020年 |

| |
|---|
| 1. 発表者名 齊藤浩充、鈴木昇 |
| 2. 発表標題 Kras変異を原因とする発癌感受性関連遺伝子の探索と候補遺伝子の解析 |
| 3. 学会等名 第93回 日本生化学会大会（国際学会） |
| 4. 発表年 2020年 |

| |
|--|
| 1. 発表者名 齊藤浩充、鈴木昇 |
| 2. 発表標題 肺発癌モデルマウスを用いた発癌感受性候補遺伝子の探索と解析 |
| 3. 学会等名 第79回日本癌学会学術総会（国際学会） |
| 4. 発表年 2020年 |

| |
|---|
| 1. 発表者名 齊藤浩充、鈴木昇 |
| 2. 発表標題 癌型 K r a s 誘導型肺発癌モデルマウスによる新規発癌感受性遺伝子の探索と解析 |
| 3. 学会等名 第43回日本分子生物学会年会（国際学会） |
| 4. 発表年 2020年 |

| |
|--|
| 1. 発表者名 齊藤浩充、鈴木昇 |
| 2. 発表標題 QTL解析による肺発癌感受性遺伝子の探索と候補遺伝子の解析 |
| 3. 学会等名 第66回実験動物学会総会（国際学会） |
| 4. 発表年 2019年 |

| |
|--|
| 1. 発表者名 齊藤浩充、鈴木昇 |
| 2. 発表標題 癌型K-Ras依存的な肺発癌感受性QTLの探索と発癌感受性候補遺伝子の発現解析 |
| 3. 学会等名 第83回日本生化学会中部支部会 |
| 4. 発表年 2019年 |

| |
|-----------------------------------|
| 1. 発表者名 齊藤浩充、鈴木昇 |
| 2. 発表標題 肺発癌感受性遺伝子座の探索と候補遺伝子の解析 |
| 3. 学会等名 第91回東海実験動物研究会 |
| 4. 発表年 2019年 |

| |
|---|
| 1. 発表者名 齊藤浩充、鈴木昇 |
| 2. 発表標題 マウスモデルによる癌型K-Rsa変異依存的な肺発癌感受性QTLの解析 |
| 3. 学会等名 第92回日本生化学会総会（国際学会） |
| 4. 発表年 2019年 |

| |
|---|
| 1. 発表者名 齊藤浩充、鈴木昇 |
| 2. 発表標題 癌型K-Ras依存肺発癌モデルマウスを用いた発癌感受性候補遺伝子の探索と解析 |
| 3. 学会等名 第78回日本癌学会学術総会（国際学会） |
| 4. 発表年 2019年 |

| |
|---------------------------------------|
| 1. 発表者名 齊藤浩充、鈴木昇 |
| 2. 発表標題 癌型K-Ras肺発癌modifier候補遺伝子の解析 |
| 3. 学会等名 第144回関西実験動物研究会 |
| 4. 発表年 2019年 |

| |
|--|
| 1. 発表者名 齊藤浩充、鈴木昇 |
| 2. 発表標題 肺がんモデルマウスのQTL解析による肺発癌感受性遺伝子の探索と候補遺伝子の解析 |
| 3. 学会等名 第42回日本分子生物学会年会（国際学会） |
| 4. 発表年 2019年 |

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

ANIMAL FUNCTIONAL GENOMICS
<https://www.medic.mie-u.ac.jp/animalcenter/animalgenomics2.html>
Animal Genomics
<http://www.medic.mie-u.ac.jp/animalcenter/animalgenomics2.html>
基礎医学系講座 動物機能ゲノミクス
<http://www.medic.mie-u.ac.jp/organization/course/animal/index.php?class=grad>

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 |
|--|---------------------------|-----------------------|----|
|--|---------------------------|-----------------------|----|

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 |
|---------|---------|
|---------|---------|