

令和 3 年 5 月 27 日現在

機関番号：12601

研究種目：若手研究

研究期間：2019～2020

課題番号：19K16734

研究課題名（和文）Parafibrominチロシンリン酸化の生理・病態生理的役割の解明

研究課題名（英文）Elucidation of physiological and pathophysiological roles of Parafibromin tyrosine phosphorylation

研究代表者

菊地 逸平（Kikuchi, Ippei）

東京大学・大学院医学系研究科（医学部）・特任研究員

研究者番号：80772376

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,200,000円

研究成果の概要（和文）：本研究では、発がん関連シグナル伝達経路の統合的制御を司る核内タンパク質 Parafibrominの生体内機能に着目し、そのチロシンリン酸化制御を担うPtk6ファミリーキナーゼの三重欠損マウスをCRISPR/Casゲノム編集によって作製した。その結果、Ptk6ファミリーキナーゼによるParafibrominのチロシンリン酸化が腸管上皮の組織恒常性維持に重要な役割を担うことが明らかとなり、さらに炎症性腸疾患や放射線誘導性消化管症候群といったヒトにおける疾患発症への関与が示された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究により、Ptk6ファミリーキナーゼによるParafibrominのチロシンリン酸化制御は腸管上皮の組織恒常性維持に働くことが示され、さらには炎症性腸疾患や放射線誘導性消化管症候群といった臨床的に重要な意義を持つ疾患の発症に役割を担うことが示された。この成果を足掛かりに、今後はParafibrominのチロシンリン酸化を制御可能な薬剤などをスクリーニングすることで、それらの難治性の疾患に対する新たな治療法の開発につながることを期待できる。

研究成果の概要（英文）：In this study, we aimed to elucidate physiological and pathophysiological roles of Parafibromin, which integrates multiple cancer-related signaling pathways. To do so, here we generated the Ptk6 family kinase multiple knockout mice by using CRISPR/Cas system-mediated genome editing. Analyses of the newly generated mice revealed that Parafibromin tyrosine phosphorylation by Ptk6 family kinases plays a critical role in regulating intestinal tissue homeostasis. Furthermore, our results indicated that it may also contribute to the development of human intestinal diseases such as inflammatory bowel disease (IBD) and radiation-induced gastrointestinal syndrome.

研究分野：腫瘍生物学

キーワード：がん シグナル伝達 リン酸化 ゲノム編集

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

チロシンキナーゼならびにチロシンホスファターゼにより担われる細胞内タンパク質の可逆的チロシンリン酸化・脱リン酸化は増殖・分化・細胞死といった細胞応答を司るシグナル伝達に中心的な役割を果たし、遺伝子変異などによるその脱制御は細胞がん化を導く主要な原因となる。実際、これまでに肺がんに対する EGFR 阻害剤や慢性骨髄性白血病に対する ABL 阻害剤などの多くのチロシンキナーゼを標的とした分子標的治療薬が開発され、その治療有効性が示されている。

こうした状況のなか、申請者は近年、新規のチロシンリン酸化タンパク質として核内タンパク質 Parafibromin (パラフィブロミン) を同定した。さらに、Parafibromin は PTK6 チロシンキナーゼならびに SHP2 ホスファターゼによってそれぞれチロシンリン酸化・脱リン酸化され、脱リン酸化状態依存的に Wnt 経路、Hedgehog 経路、Notch 経路、Hippo 経路という発がんに密接にリンクする 4 つのシグナル経路の標的遺伝子発現を統合的に制御することを明らかにした。

しかしながら、この Parafibromin のチロシンリン酸化依存的シグナル制御が生体内における恒常性の維持や疾患発症などの生物個体レベルの現象に果たす生理学的・病態生理学的役割についてはこれまで不明のまま残されていた。

2. 研究の目的

上記の背景をもとに、本研究では Parafibromin のチロシンリン酸化・脱リン酸化が生体内で担う生理的機能ならびにがんに関連する病態への役割を生物個体レベルの解析から明らかにすることを目的とした。この研究を通して、がんや先天性の形態異常といった病態形成に関わるシグナル経路群の統合的制御を担う Parafibromin の生体内機能を明らかにし、いまだ有効な治療法が確立されていないそれらの疾患に対する新規の治療法・予防法の開発へとつなげたい。

3. 研究の方法

本研究の目的を達成するため、以下の研究項目を実施した：

- (1) CRISPR/Cas ゲノム編集技術を用いた PTK6 ファミリーキナーゼ三重欠損マウスの作製
- (2) PTK6 ファミリーキナーゼ三重欠損マウスの表現型解析
- (3) 消化管疾患における役割の解析

(1) CRISPR/Cas ゲノム編集技術を用いた PTK6 ファミリーキナーゼ三重欠損マウスの作製

Parafibromin のチロシンリン酸化・脱リン酸化が個体レベルで担う生理的・病態生理的役割を明らかにするため、本研究では Parafibromin のチロシンリン酸化を担う PTK6 ファミリーチロシンキナーゼの 3 つの遺伝子 (Ptk6, Srms, Frk) を全て欠損させた PTK6 ファミリーキナーゼ三重欠損マウスの作製を CRISPR/Cas システムによるゲノム編集技術を用いて行った。具体的には、先行研究で申請者らが作製した PTK6 単独欠損マウスを用いて体外受精により受精卵を作出し、この受精卵にさらに Srms および Frk を標的とする small guide RNA (sgRNA) と Cas9 タンパク質を電気穿孔法により共導入することで、3 つの Ptk6 ファミリーチロシンキナーゼ遺伝子の全てに不活性化変異が同時導入されたファウンダー (F0) マウスを作出した。ここで得られるファウンダーマウスは遺伝学的モザイク (変異導入細胞とそうでない細胞が体内で混在している) であるため、複数のファウンダーマウス同士の交配により、目的の変異遺伝子が生殖系に伝播した次世代 (F1) マウスを作出した。

(2) PTK6 ファミリーキナーゼ三重欠損マウスの表現型解析

作製したマウスの DNA 配列解析 (DNA シークエンシング) を行い、期待する遺伝子変異の有無を調べた。

ジェノタイピング PCR 解析により、三重欠損の遺伝子型を持つマウスの個体数がメンデル遺伝学の法則に従うかを調べた。

ウェスタンブロットング解析により、目的遺伝子産物のノックアウトの有無を調べた。

PTK6 ファミリーキナーゼ三重欠損マウスの全身臓器の組織学的解析を行った。

(3) 消化管疾患における役割の解析

消化管における病態形成への関与を調べるために、作製した PTK6 ファミリーキナーゼ三重欠損マウスを用いて炎症性腸疾患 (IBD) のマウスモデル実験系であるデキストラン硫酸ナトリウム (DSS) 誘導性腸炎モデル実験ならびに放射線誘導性消化管症候群のマウスモデル実験系である放射線照射実験を行った。

4. 研究成果

(1) CRISPR/Cas ゲノム編集技術を用いた Ptk6 ファミリーキナーゼ三重欠損マウスの作製

CRISPR/Cas ゲノム編集技術を用いた遺伝子改変マウス作製法により、3つの Ptk6 ファミリーキナーゼ (Ptk6、Srms、Frk) を同時に欠損させた Ptk6 ファミリーキナーゼ三重欠損マウスの作製に成功した。これにより Parafibromin のチロシンリン酸化-脱リン酸化が個体レベルで担う生理的・病態生理的役割の解明に向けて世界に先駆けていち早くアプローチできるようになったものと考えられる。

(2) PTK6 ファミリーキナーゼ三重欠損マウスの表現型解析

作製したマウスの DNA 配列解析 (DNA シークエンシング) を行ったところ、標的とする3つの遺伝子全てにおいて期待する遺伝子変異の導入が確認できた。加えてヘテロ接合型マウス同士の交配により生まれた仔マウスのジェノタイプ解析を行った結果、三重欠損の遺伝子型を持つマウスは胎生致死ならびに新生児致死を示さず、成体まで成長可能であることがわかった。また、ウェスタンブロット解析により全ての目的遺伝子産物タンパク質のノックアウトが確認できた。さらに、マウス全身臓器の組織学的解析を行った結果、腸上皮組織において腸管上皮細胞の分化異常ならびに細胞増殖の減退が観察された。このことから、Ptk6 ファミリーキナーゼによる Parafibromin のチロシンリン酸化制御は腸管上皮の組織恒常性維持に重要な役割を担うことが示唆された。

(3) 消化管疾患における役割の解析

消化管における病態形成に Parafibromin のチロシンリン酸化が果たす役割を調べるためにデキストラン硫酸ナトリウム (DSS) 誘導性腸炎モデル実験を行ったところ、Ptk6 ファミリーキナーゼ三重欠損マウスではコントロールマウスと比較してより重篤な腸炎症状が誘導される傾向が観察された。さらに、放射線誘導性消化管症候群のモデル実験として 10Gy のマウス全身放射線照射実験を行ったところ、三重欠損マウスでは放射線照射後の腸管上皮組織の再生が阻害されることを示す予備的データを得た。これらのことから、Parafibromin のチロシンリン酸化制御は炎症性腸疾患や放射線誘導性消化管症候群の発症機構に重要な役割を担う可能性が強く示唆された。

(4) 今後の展望

本研究により、これまで生体内機能が全く明らかになっていなかった Ptk6 ファミリーキナーゼならびに Parafibromin のチロシンリン酸化が生物個体レベルで果たす役割を明らかにすることができた。今後はさらに、消化管疾患をはじめとした各種のヒトの疾患に関連した解析を推進し、新たな治療戦略の創出を目指す。

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

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