

令和 5 年 6 月 26 日現在

機関番号：16101

研究種目：若手研究

研究期間：2021～2022

課題番号：21K16755

研究課題名（和文）「DDX31」遺伝子改変による尿路上皮癌自然発癌モデルによる免疫複合治療の開発

研究課題名（英文）Development of cancer immunodeficiency therapy using a spontaneous urothelial carcinoma model with DDX31 gene modification

研究代表者

大豆本 圭（DAIZUMOTO, Kei）

徳島大学・大学院医歯薬学研究部（医学域）・助教

研究者番号：10745516

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,500,000円

研究成果の概要（和文）：本研究では「Ddx31」遺伝子改変による尿路上皮癌自然発癌モデルで尿路上皮癌の多段階進展機構におけるDdx31の経時的な変化を確認するために、尿路上皮癌発癌モデルの1つであるBBN飲水による発癌モデルを用いた実験を行い、Ddx31発現が経時的に上昇することがわかった。またDdx31のノックアウトマウスをCRISPR-Cas9システムで作成した。野生型とヘテロノックアウトマウスを比較したところ雄、雌とも12週間の時点で体重変化はなく、各臓器の変化はマクロ・ミクロ共に認めなかった。48週間生存することが確認できた。さらにTrp53ミスセンス変異である遺伝子改変マウスを作製した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

CRISPR/Cas9システムによるゲノム編集技術で樹立したDdx31ノックアウトマウスを用いて、Ddx31が尿路上皮癌多段階進展機構へのメインファクターであるかどうかを理解することが可能となる。尿路樹皮がんにおいてがん免疫とのDdx31との関連性は未報告である。Ddx31による多段階発癌メカニズムとがん免疫との理解を進めることは、尿路上皮癌治療の革命となりうる。最終的に副作用が少なく高い治療効果が期待される治療法を検討し、作製した発癌マウスモデルでの免疫チェックポイント阻害薬による治療効果とDDX31を治療標的とした治療効果を検討していきたい。

研究成果の概要（英文）：In this study, to confirm the temporal changes of Ddx31 in the mechanism of multi-step progression of urothelial carcinogenesis in a spontaneous carcinogenesis model of urothelial carcinogenesis by "Ddx31" gene modification, we performed experiments using one of the models of carcinogenesis by BBN drinking water, and found that Ddx31 expression was increased with time. Ddx31 expression was found to increase over time. Ddx31 knockout mice were also generated using the CRISPR-Cas9 system. The wild-type and heterozygous knockout mice showed no weight change at 12 weeks for both males and females, and no changes in either macro or micro organs. 48-week survival was confirmed. In addition, a genetically engineered mouse with a Trp53 missense mutation was generated.

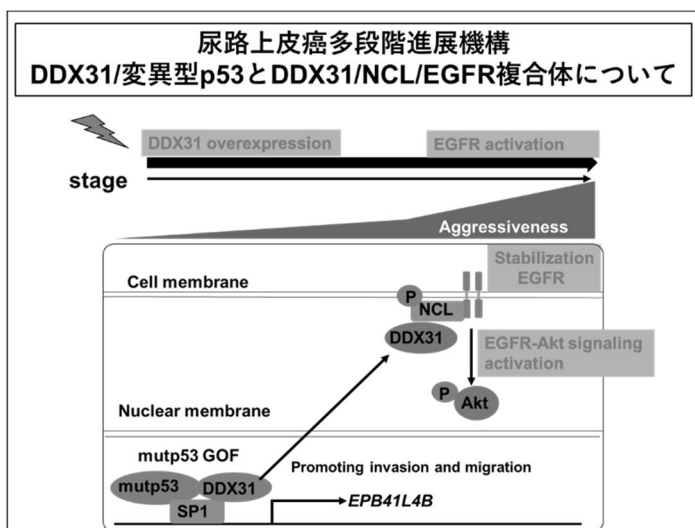
研究分野：尿路上皮癌

キーワード：尿路上皮癌 DDX31 p53 多段階発癌

1. 研究開始当初の背景

尿路上皮癌は非筋層浸潤性と筋層浸潤性に分類され再発率が高く、転移進行例では全身化学療法や免疫チェックポイント阻害薬による全身治療を行うが多くが治療抵抗性となるのが現状である。悪性度の高い尿路上皮癌の病態解明研究は2000年以降のマイクロアレイ解析、次世代シーケンス解析など網羅的なゲノム解析・遺伝子発現解析技術の進歩によりその遺伝子異常の全貌が明らかになってきている。特に筋層浸潤性膀胱癌を対象とした癌ゲノムアトラス (TCGA: The Cancer Genome Atlas) 研究ネットワーク解析では TP53 変異が約 50%で認め、EGFR 増幅・高発現、FGFR3 変異、HER2 の増幅・高発現や変異が明らかとなった。膀胱癌の進展の病態には TP53 変異、Receptor of Tyrosine Kinase(RTK)やその下流シグナルの活性化が起きていることは明らかとなった(Nature volume 507, pages 315-322 (20 March 2014))。研究代表者はこれまでに徳島大学先端酵素学研究所プロテオゲノム研究領域・ゲノム制御分野の片桐豊雅教授との共同研究で浸潤性尿路上皮癌を対象とした遺伝子発現解析にて同定された DEAD (Asp-Glu-Ala-Asp) box

polypeptide 31 (DDX31) について研究を執り行っている。浸潤性尿路上皮癌の初期段階に TP53 変異となり、DDX31 は変異型 p53 と Sp1 transcription factor (SP1) と複合体を形成し変異型 p53 Gain of function 機構により癌進展をきたす。さらに DDX31 は主に核内に存在するが、進行した浸潤性膀胱癌細胞では、核内から細胞質に移行して、DDX31-nucleolin(NCL) と EGFR との三者複合体を形成し、EGFR の安定化および Akt シグナルの活性化を誘導しさらに癌進展をきたすことがわかった。(Daizumoto K et al Cancer Res. 2018 May 1;78(9):2233-2247.)



2. 研究の目的

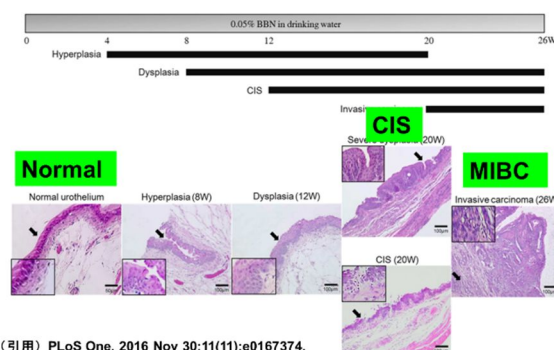
尿路上皮癌の多段階進展機構において、TP53 変異の入るタイミングや DDX31 発現上昇するタイミングが分かっていない。研究代表者は仮説として TP53 変異が先行し変異型 p53 による Gain of function 機構で DDX31 の発現上昇し、多段階進展が促進すると考えており証明したいと考えている。BBN を用いた自然発癌モデルは Basal/Sq タイプの癌を発症することから、右図のように DDX31 発現は Basal/Sq タイプであることから最適なモデルであり DDX31 と TP53 変異の関連性が明確になる可能性が高い。DDX31 ノックアウトマウス、ノックインマウスを製作し、DDX31 が尿路上皮癌多段階進展機構へのメインファクターであるかどうかを理解することが可能となる。

3. 研究の方法

(1) BBN 飲水によるマウス膀胱癌発癌モデルにおける Ddx31 発現について

0.05%の BBN を用いた膀胱癌発癌モデルではヒト膀胱癌と同様に Trp53 変異がおり、Carcinoma in situ を通じて筋層浸潤性膀胱癌となることが報告されている(Nature Cell Biology volume 16, pages 982-991 (2014))。先行文献では右図の通り正常尿路上皮(Normal)から上皮内癌(CIS)、筋層浸潤性膀胱癌(MIBC)へと多段階に進展する(PLoS One. 2016 Nov 30;11(11):e0167374)。

本研究では BBN 自然発癌モデルでの膀胱での DDX31 遺伝子発現変化と TP53 変異における関連性をタイムラインで検証する。4 週から 30 週までの間で、Ddx31 の発現が何週から上昇しているのかを検討する。



(引用) PLoS One. 2016 Nov 30;11(11):e0167374.

この図は、膀胱癌の多段階進展機構を示しています。正常尿路上皮から上皮内癌(CIS)を経て、筋層浸潤性膀胱癌(MIBC)へと進展する過程が示されています。時間軸は0から36週間まであり、0.05%のBBNを飲水に含む条件下での経過を追っています。各段階の組織学的特徴も示されています。

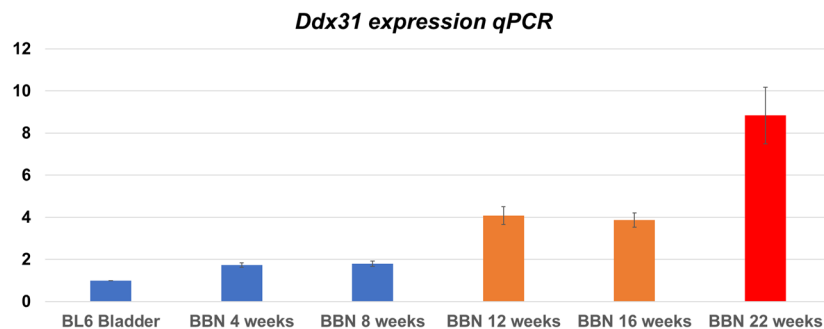
(2) Ddx31 ノックアウトマウスの作製及び Trp53 ミスセンス変異マウスの作製
マウスは C57BL/6J を準備し、CRISPR-Cas9 法で Ddx31 ノックアウトマウスを作製した。
Trp53 R172H 変異マウスを作製についてはゲノム編集技術を活用して、Trp53 遺伝子の 172 番目のアルギニン残基をヒスチジン残基へと変異させた。

4. 研究成果

(1) BBN 自然発癌モデルにおける DDX31 発現について

BBN(0.05%) 飲水を 7-8 週齢の C57BL/6J マウスに行い、12-14 週でマウス膀胱に上皮内癌、16 週には肉眼的血尿、18-22 週には筋層浸潤性膀胱癌を認めた。この結果は BBN を用いた膀胱癌発癌モデルではヒト膀胱癌と同様に TP53 変異がおり、Carcinoma in situ を通じて筋層浸潤性膀胱癌となる既報と概ね同様の結果であった。(Nature Cell Biology volume 16, pages 982-991 (2014))。

さらに BBN 飲水開始後、4 週後、8 週後、12 週後、16 週後、22 週後の膀胱の Ddx31 発現を qPCR 法で確認したところ、下記の通り経時的に上昇することが確認できた。



(2) Ddx31 ノックアウトマウスの作製及び TP53 ミスセンス変異マウスの作製

Ddx31 ノックアウトマウスについての詳細な機能解析はこれまで報告がない。マウスは C57BL/6J を使用し、Ddx31 遺伝子の機能喪失のために、exon4 を欠損させたゲノム編集マウスを作成した。受精卵にエレクトロポレーションにより、Cas9 タンパク質、Ddx31 crRNA1、Ddx31 crRNA2、tracrRNA を導入した。翌日 2 細胞へと発生した胚を、偽妊娠マウスの卵管に移植した。妊娠 19 日目に出産させ、離乳時に耳片からゲノム DNA を抽出し、PCR 法により exon4 の欠失の有無を確認した。欠失が確認されたマウスを交配させ、次世代にてヘテロマウスを獲得した。Ddx31 ノックアウトマウスはヘテロで系統維持することが可能であり、野生型とノックアウトマウスを比較したところ雄、雌とも 12 週間の時点で体重変化はなく、各臓器の変化はマクロ・ミクロ共に認めなかった。48 週間生存することが確認できた。次に Trp53 R172H 変異マウスを作製した。ゲノム編集技術を活用して、Trp53 遺伝子の 172 番目のアルギニン残基をヒスチジン残基へと変異させたマウスを作成した。受精卵にエレクトロポレーションにより、Cas9 タンパク質、Trp53 crRNA1、tracrRNA、Trp53 R172H オリゴ DNA を導入した。翌日 2 細胞へと発生した胚を、偽妊娠マウスの卵管に移植した。妊娠 19 日目に出産させ、離乳時に耳片からゲノム DNA を抽出し、PCR により標的配列を増幅させ、サンガーシーケンスにより配列情報を取得した。172 番目のアルギニン残基をコードする配列 (cgc) がヒスチジン残基 (cac) をコードする配列へ欠失されているかを解析した。点変異が確認されたマウスを交配させ、次世代にてヘテロマウスを得た。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計5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 5件）

1. 著者名 Sasaki Yutaro, Takahashi Masayuki, Fukuta Kyotaro, Shiozaki Keito, Daizumoto Kei, Ozaki Keisuke, Ueno Yoshiteru, Tsuda Megumi, Kusuhara Yoshito, Fukawa Tomoya, Yamamoto Yasuyo, Yamaguchi Kunihisa, Izaki Hirofumi, Kanda Kazuya, Kanayama Hiroomi	4. 巻 16
2. 論文標題 The patient-side surgeon plays a key role in facilitating robot-assisted intracorporeal ileal conduit urinary diversion in men	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Journal of Robotic Surgery	6. 最初と最後の頁 437 ~ 444
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1007/s11701-021-01256-x	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 Sasaki Yutaro, Takahashi Masayuki, Ozaki Keisuke, Daizumoto Kei, Ueno Yoshiteru, Tsuda Megumi, Kusuhara Yoshito, Fukawa Tomoya, Yamamoto Yasuyo, Yamaguchi Kunihisa, Kanayama Hiroomi	4. 巻 68
2. 論文標題 Efficacy of the direct grasping technique using pean forceps under fluoroscopy to replace ureteral stents in women	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 The Journal of Medical Investigation	6. 最初と最後の頁 326 ~ 329
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.2152/jmi.68.326	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 Yoshioka Takuya, Daizumoto Kei, Tada Kouki, Mima Masato, Kagawa Kozo, Fukawa Tomoya, Yamaguchi Kunihisa, Takahashi Masayuki, Nishioka Yasuhiko, Kanayama Hiroomi	4. 巻 69
2. 論文標題 Retroperitoneal hemorrhage in a patient with coronavirus disease 2019 (COVID-19):A case report	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 The Journal of Medical Investigation	6. 最初と最後の頁 148 ~ 151
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.2152/jmi.69.148	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 佐々木雄太郎、角陸文哉、深谷友祐、山本拓、大豆本圭、尾崎啓介、上野恵輝、津田恵、楠原義人、布川朋也、山本恭代、山口邦久、高橋正幸、金山博臣	4. 巻 67
2. 論文標題 膀胱浸潤を来たした局所進行性前立腺癌に対してロボット支援腹腔鏡下膀胱前立腺全摘除術を施行した1例	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 泌尿器科紀要	6. 最初と最後の頁 163 ~ 166
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) なし	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 角陸文哉、佐々木雄太郎、大豆本圭、尾崎啓介、上野恵輝、津田恵、楠原義人、布川朋也、山本恭代、山口邦久、高橋正幸、金山博臣	4. 巻 83
2. 論文標題 直腸癌に対するペバシズマブ療法中に発症したフルニエ壊疽の1例	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 西日本泌尿器科	6. 最初と最後の頁 111～115
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) なし	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12件(うち招待講演 0件/うち国際学会 0件)

1. 発表者名 福原弥生、大豆本圭、上原久典、布川朋也、高橋正幸、金山博臣
2. 発表標題 微小乳頭尿路上皮癌におけるドラッグリポジショニングを使った治療候補薬の探索
3. 学会等名 日本癌学会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 大豆本圭、宇都義浩、福原弥生、上原久典、布川朋也、高橋正幸、金山博臣
2. 発表標題 発育鶏卵を用いた次世代患者由来がんモデルの開発
3. 学会等名 日本癌学会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 大豆本圭、福田喬太郎、佐々木雄太郎、塩崎啓登、楠原義人、布川朋也、中西良一、山本恭代、山口邦久、井崎博文、高橋正幸、神田和哉、金山博臣
2. 発表標題 筋層浸潤性膀胱癌に対するNAC+RARCの短期治療成績
3. 学会等名 日本癌治療学会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 大豆本圭、深谷友祐、多田航生、佐々木雄太郎、楠原義人、布川朋也、山本恭代、山口邦久、高橋正幸、金山博臣
2. 発表標題 転移性尿路上皮癌に対する全身化学療法 of 検討
3. 学会等名 日本泌尿器腫瘍学会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 安宅真利花、大豆本圭、尾崎啓介、佐々木雄太郎、上野恵輝、津田恵、楠原義人、布川朋也、山本恭代、山口邦久、高橋正幸、金山博臣、上原久典
2. 発表標題 ロボット支援前立腺全摘除術・リンパ節郭清におけるLNIの検討
3. 学会等名 西日本泌尿器科学会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 多田航生、大豆本圭、吉岡拓哉、佐々木雄太郎、尾崎啓介、上野恵輝、津田恵、楠原義人、布川朋也、山本恭代、山口邦久、高橋正幸、金山博臣
2. 発表標題 当院における進行性尿路上皮癌に対するペムプロリズマブの臨床検討
3. 学会等名 西日本泌尿器科学会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 佐々木雄太郎、大豆本圭、布川朋也、山本恭代、山口邦久、高橋正幸、金山博臣、塩崎啓登、井崎博文、神田和哉
2. 発表標題 「アシテントガイド」の開発～体腔回腸導管造設時の尿管ステント留置を円滑に～
3. 学会等名 日本泌尿器内視鏡学会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 大豆本圭
2. 発表標題 Micropapillary urothelial carcinomaの分子病態解明とドラッグリポジショニング
3. 学会等名 日本泌尿器科学会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 大豆本圭、宇都義浩
2. 発表標題 個別化医療を目指した鶏卵PDXモデルの確立
3. 学会等名 患者由来がんモデル研究会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 福田喬太郎、森山貴弘、須藤泰史、大豆本圭、高橋正幸、金山博臣、上原久典
2. 発表標題 G-CSF 産生後腹膜平滑筋肉腫の1例
3. 学会等名 日本泌尿器科学会 四国地方会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 大豆本圭、多田航生、安宅真利花、中西亮太、橋本啓佑、吉岡拓哉、佐々木雄太郎、尾崎啓介、上野恵輝、津田恵、楠原義人、布川朋也、山本恭代、山口邦久、高橋正幸、金山博臣、福島功士
2. 発表標題 進行性腎細胞癌に対するイピリムマブ+ニボルマブ加療中に脳炎を発症した1例
3. 学会等名 日本泌尿器科学会 四国地方会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 角陸文哉、大豆本圭、上野恵輝、佐々木雄太郎、尾崎啓介、津田恵、楠原義人、布川朋也、山本恭代、山口邦久、高橋正幸、金山博臣
2. 発表標題 イビリムマブ+ニボルマブ併用療法を施行した右腎・脱分化型脂肪肉腫の1例
3. 学会等名 日本泌尿器科学会 四国地方会
4. 発表年 2022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
---------------------------	-----------------------	----

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