

科学研究費助成事業 研究成果報告書

令和元年6月5日現在

機関番号：33910

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2015～2018

課題番号：15K06812

研究課題名(和文) 胸腺腫・筋萎縮発症モデルラット原因遺伝子の次世代シーケンス解析と発症機構の解明

研究課題名(英文) Identification and functional analysis of causative genes for thymoma and muscle atrophy developing in BUF/Mna rats

研究代表者

市原 正智 (ICHIHARA, Masatoshi)

中部大学・生命健康科学部・教授

研究者番号：00314013

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,800,000円

研究成果の概要(和文)：BUF/Mna系ラットは胸腺腫、筋萎縮、腎系球体硬化症様病変などを全例に発症する疾病モデルラットである。しかし胸腺腫、筋萎縮の原因遺伝子は未だ明らかになっていない。そこでBUF/Mna系ラットの全ゲノム配列を明らかにした。参照配列であるBNラットのゲノム情報に加えて、公開されている40種類以上の近交系ラットのゲノム情報と比較して胸腺腫、筋萎縮の原因遺伝子と思われる変異を同定した。胸腺腫の原因遺伝子と思われる変異は野生型と比較してミトコンドリア形態に影響を与えることを確認した。筋萎縮の原因遺伝子はサルコペニア様病態を引き起こし速筋優位の筋萎縮を引き起こすと推察された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

BUF/Mna系ラットは胸腺腫、筋萎縮、腎系球体硬化症様病変と、他のモデル動物には見られない多彩な病態を呈する疾患モデル動物であるが、その原因遺伝子の詳細が明らかになっていなかった。本研究で同定した原因遺伝子の異常は、その病態(胸腺腫、筋萎縮)と関連しているという既報告例は無く、将来的に新しい切り口での治療への応用の可能性を秘めている点から学術的および社会的意義が深い研究成果である。また原因遺伝子の変異を導入した疾患モデル動物の作出、提供を通して研究成果をより広く社会に還元できる可能性がある。

研究成果の概要(英文)：The BUF/Mna rat strain is a line susceptible to the spontaneous development of thymoma, muscle atrophy, and glomerulosclerosis. However, the genes responsible for thymoma and muscle atrophy in BUF/Mna rats have not been identified. In this study, we provide the first whole genome sequence of BUF/Mna rats. We compared single nucleotide variants (SNVs) in BUF/Mna of the reference sequence to those of 40 or more inbred rat strains and identified SNVs in genes likely to be related to the development of thymoma and muscle atrophy. We observed that forced expression of the SNV-containing gene correlating with thymoma resulted in morphological alterations of mitochondria as compared to that with wild-type sequence. We also speculate that the causative gene harboring the SNV for muscle atrophy results in a preferential loss of fast-twitch muscle fibers via a sarcopenia-like pathogenic mechanism.

研究分野：実験病理

キーワード：胸腺腫 筋萎縮 次世代シーケンス

1. 研究開始当初の背景

BUF/Mna系ラットは1977年に100%の確率で胸腺腫を発症するモデルラットとして系統樹立されている。本系ラットには筋萎縮、腎系球体硬化症様病変も全例に発症する事が明らかとなり多彩な疾病病態を示すモデルラットとして病態研究に用いられてきている。

BUF/Mna系ラットの研究は松山睦司博士を中心とした研究グループで30年以上に渡り連鎖解析とコンジェニックラットの作製の過程などを通して行われた。その結果胸腺腫発症に關与する遺伝子 Tsr1 (thymoma susceptible gene of rat 1)は7番染色体に、筋萎縮の原因遺伝子 Aftm1 (atrophy of fast twitch muscle-1)は1番染色体に、腎系球体硬化症様病変は13番染色体にその原因遺伝子が存在することが示された。しかし原因遺伝子として特定されたものは腎系球体硬化症様病変の原因遺伝子とされる Actr3 のみで (Mamm Genome, 19: 41, 2008)、他は未だその実態が明らかにされていなかった。

BUF/Mna系ラットに発症する胸腺腫発症の原因遺伝子を明らかにすることで、ヒト B1 型の胸腺腫の病因を説明し、さらに知見を合わせる事で胸腺腫全体の発症の分子機構を解明できる可能性がある。筋萎縮についても新規メカニズムを提唱できる可能性がある。

2. 研究の目的

本研究の目的は胸腺腫・筋萎縮発症モデルラット(BUF/Mna)の疾患発症原因遺伝子を、次世代シーケンス解析手法などを用いて明らかにすることにある。参考配列と比較して得られた変異配列について、パイオインフォマティクス解析および近交系ラット DNA を用いたサンガーシーケンスによる検討で候補遺伝子を絞り込み、さらに細胞分子生物学的手法で真の原因遺伝子を同定する。最終的には変異を導入した遺伝子改変動物および細胞株を作製し実際に当該の遺伝子の変異により病態が発症する事を証明する。その結果 BUF/Mna 系ラットの病態発症の分子機構を完全に明らかにするとともに、ヒトで対応する疾患の B1 型胸腺腫、筋萎縮性疾患などの発症病態に迫る事を本研究の目的とした。

3. 研究の方法

- (1) BUF/Mna ラット全ゲノムの参照配列と比較した DNA 変異情報を、既報告情報である 42 系統の近交系ラット系統間の DNA 変異の比較情報と VCFtools と SnpEff などを用いて統合し、BUF/Mna に固有のアミノ酸変異をもたらす変異を抽出した。
- (2) BUF/Mna 系ラットを ACI 系統へ退交配したコンジェニックラット由来の DNA および京都大学・ナショナルバイオリソースプロジェクト「ラット」より異なる近交系 19 系統の DNA より、候補遺伝子の DNA 変異部位を PCR で増幅し、サンガーシーケンスで配列を決定し胸腺腫および筋萎縮などの表現型との関連を検討した。
- (3) 胸腺腫および筋萎縮発症関連候補遺伝子の野生型および変異導入型をクローニングし、細胞株で強制発現させて、細胞機能への影響を検討した。胸腺腫および筋萎縮発症関連候補遺伝子由来タンパク質の発現分布等を BUF/Mna 系ラット由来胸腺腫、ラット正常胸腺およびマウス組織を用いて免疫染色により確認した。
- (4) CRISPR/Cas9 法による細胞株およびマウス受精卵を対象としたゲノム編集技術の確立を目指した。さらに、これを用いて胸腺腫および筋萎縮発症関連候補遺伝子の DNA 変異のノックイン導入を行い、細胞株および個体レベルでの DNA 変異による病態の再現を検討する予定である。

4. 研究成果

(1) 胸腺腫発症の原因遺伝子の同定 受託により BUF/Mna ラットの全ゲノム解析を行い、PolyPhen-2 および SIFT による予備的解析から、胸腺腫に関連した遺伝子変異として数個の遺伝子の変異まで候補を絞ったが単一の遺伝子への確定は極めて困難であった。NCBI には BUF/N, ACI/N など他のラット系統の全ゲノム配列が公開されていたため、当初これらと BUF/Mna との遺伝研のスーパーコンピュータを利用した比較を予定していた。しかしその後の文献検索で 42 系統の近交系ラット系統間の遺伝子変異の比較情報が発表されていることを見いだした。そこで VCFtools と SnpEff などを用いてこれらの変異情報を統合してさらに BUF/Mna に固有のアミノ酸変異をもたらす変異を抽出した。この解析により胸腺腫関連遺伝子として 7 番染色体の 3 種類 (A, B, X 遺伝子) を最終候補として絞ることが出来た。

次に BUF/Mna 系ラットを ACI 系統へ退交配したコンジェニックラットより入手した胸腺腫および正常胸腺の組織を用いて、胸腺腫形成と遺伝子変異の関連を検討した結果、X 遺伝子は胸腺腫を発症しない系統においても変異が観察され、胸腺腫の形成と関連しないことを確認した。

胸腺の発生に関連したシグナル伝達機構を修飾するとされる遺伝子 A がより可能性が高いとして遺伝子 A および変異型遺伝子 A の cDNA をクローニングし、遺伝子変異が細胞機能に与える影響の解析、BUF/Mna 系ラットの胸腺腫および正常胸腺での発現分布に差を生じているかなど各種検討を行った。しかし両者の差は軽度に留まり遺伝子変異が細胞機能に与える明瞭な差を見いだすことが出来なかった。一方京都大学・ナショナルバイオリソースプロジェクト「ラッ

ト」から新たに異なる近交系 19 系統の DNA を入手して当該変異の有無についての確認したところ、胸腺腫を発症しないとされる近交系ラットの一部にも遺伝子 A と同様の変異が確認され、遺伝子 A は胸腺腫発症の原因遺伝子ではないと判断せざるを得なくなった。

一方遺伝子 B はこれまでに、癌および細胞増殖と関連した報告を認めず、また機能解析に関する報告も比較的限られていた。遺伝子 B 由来タンパク質は細胞内小器官に局在し、ミトコンドリア形態に関連する機能を有している。さらに遺伝子 B に観察される BUF/Mna 系ラットにおける遺伝子変異は 7 種類の異なった種間でアミノ酸が保存された部位に認められた変異であった。そこで HEK293 細胞に遺伝子 B の野生型と BUF/Mna 変異型タンパク質を強制発現させて検討したところ、野生型の遺伝子 B タンパク質の強制発現ではミトコンドリアの異常凝集が観察されたが、BUF/Mna 変異型タンパク質の強制発現ではこうしたミトコンドリアの形態異常は観察されなかった。よって BUF/Mna 系ラットに観察された遺伝子 B の変異は遺伝子 B 由来タンパク質の機能に影響を与える変異であることが確認出来た。次に BUF/Mna 系ラット胸腺腫由来細胞株 MTHC-1 を入手し、これに CRISPR/Cas9 法を用いて遺伝子変異を野生型に修正したノックイン細胞の作成を目指してゲノム編集を試みた。しかし Cas9 RNP complex の導入効率が低いことが判明したため、導入効率を上げる工夫を行うと共に、マウス受精卵で遺伝子ノックインにより遺伝子変異を導入し、作成された変異マウスの個体を用いた実験系で証明することを立案し現在検討を継続している。

(2) 筋萎縮発症の原因遺伝子の同定 筋萎縮の原因遺伝子は染色体 1 番上に存在することが示されている。近交系 42 種類との比較より、BUF/Mna 系ラットに唯一存在し、アミノ酸変異を引き起こす変異を有して筋肉と関連した生理機能が報告されている遺伝子を 2 種類同定した (Btbd1, Ighmbp2)。しかしこれらの遺伝子は連鎖解析により存在部位として示した近傍のマーカーからはやや遠位に外れていた。これらの結果をさらに入手した、異なる近交系 19 系統の DNA の配列と比較した。その結果 Ighmbp2、Btbd1 とともに、その変異が筋萎縮を必発させることと矛盾した結果が得られたため原因遺伝子の可能性は否定された。

そこで BUF/Mna 系以外にも 1 系統まで変異を有することを許容し探索したところ、遺伝子 C を新たな候補遺伝子として抽出した。遺伝子 C の変異は全ての BUF/Mna 系由来筋萎縮発症ラットの系統に観察されたが、筋萎縮を示さない他の系統では認めなかった。その後の文献的検討から、遺伝子 C の変異によりサルコペニア様病態を引き起こすことで、同様の速筋優位の筋萎縮を引き起こすと推測し現在解析を続けている。さらに胸腺腫の原因遺伝子の場合と同様に CRISPR/Cas9 法を用いた遺伝子ノックインにより、細胞株およびマウス個体を対象に最終的証明を行うための検討を継続している。

5 . 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計 15 件)

- Matsuoka H, Miyata S, Okumura N, Watanabe T, Hashimoto K, Nagahara M, Kato K, Sobue S, Takeda K, Ichihara M, Iwamoto T, Noda A. Hydrogen gas improves left ventricular hypertrophy in Dahl rat of salt-sensitive hypertension. *Clin Exp Hypertens*. 2019;41(4):307-311. DOI 10.1080/10641963.2018.1481419. 査読有り
- Nishiwaki H, Ito M, Negishi S, Sobue S, Ichihara M, Ohno K. Molecular hydrogen upregulates heat shock response and collagen biosynthesis, and downregulates cell cycles: meta-analyses of gene expression profiles. *Free Radic Res*. 2018;52(4):434-445. DOI 10.1080/10715762.2018.1439166. 査読有り
- Mii S, Hoshino A, Enomoto A, Murakumo Y, Ito M, Yamaguchi A, Takahashi M. CD109 deficiency induces osteopenia with an osteoporosis-like phenotype in vivo. *Genes Cells*. 2018;23(7):590-598. DOI 10.1111/gtc.12593. 査読有り
- Inoue C, Sobue S, Aoyama Y, Mizutani N, Kawamoto Y, Nishizawa Y, Ichihara M, Abe A, Hayakawa F, Suzuki M, Nozawa Y, Murate T. BCL2 inhibitor ABT-199 and JNK inhibitor SP600125 exhibit synergistic cytotoxicity against imatinib-resistant Ph+ ALL cells. *Biochem Biophys Res Commun*. 2018;515:69-75. DOI 10.1016/j.bbrc.2018.07.001. 査読有り
- Yokoyama M, Ichinoe M, Okina S, Sakurai Y, Nakada N, Yanagisawa N, Jiang SX, Numata Y, Umezawa A, Miyazaki K, Higashihara M, Murakumo Y. CD109, a negative regulator of TGF-beta signaling, is a putative risk marker in diffuse large B-cell lymphoma. *Int J Hematol*. 2017;105(5):614-622. DOI 10.1007/s12185-016-2173-1. 査読有り
- Sobue S, Inoue C, Hori F, Qiao S, Murate T, Ichihara M. Molecular hydrogen modulates gene expression via histone modification and induces the mitochondrial unfolded protein response. *Biochem Biophys Res Commun*. 2017;493(1):318-324. DOI 10.1016/j.bbrc.2017.09.024. 査読有り
- Shiraki Y, Mii S, Enomoto A, Momota H, Han YP, Kato T, Ushida K, Kato A, Asai N, Murakumo Y, Aoki K, Suzuki H, Ohka F, Wakabayashi T, Todo T, Ogawa S, Natsume A, Takahashi M. Significance of perivascular tumour cells defined by CD109 expression in progression of glioma. *J Pathol*. 2017;243(4):468-480. DOI 10.1002/path.4981.

査読有り

Imoto N, Harunori N, Furukawa K, Tange N, Murase A, Hayakawa M, Ichihara M, Iwata Y, Kosugi H. GM-CSF Autoantibody-positive Pulmonary Alveolar Proteinosis with Simultaneous Myeloproliferative Neoplasm. *Intern Med*. 2017;56(4):435-439. DOI 10.2169/internalmedicine.56.6920. 査読有り

Aoyama Y, Sobue S, Mizutani N, Inoue C, Kawamoto Y, Nishizawa Y, Ichihara M, Kyogashima M, Suzuki M, Nozawa Y, Murate T. Modulation of the sphingolipid rheostat is involved in paclitaxel resistance of the human prostate cancer cell line PC3-PR. *Biochem Biophys Res Commun*. 2017;486(2):551-557. DOI 10.1016/j.bbrc.2017.03.084. 査読有り

Sunagawa M, Mii S, Enomoto A, Kato T, Murakumo Y, Shiraki Y, Asai N, Asai M, Nagino M, Takahashi M. Suppression of skin tumorigenesis in CD109-deficient mice. *Oncotarget*. 2016;7(50):82836-82850. DOI 10.18632/oncotarget.12653. 査読有り

Sobue S, Sakata K, Sekijima Y, Qiao S, Murate T, Ichihara M. Characterization of gene expression profiling of mouse tissues obtained during the postmortem interval. *Exp Mol Pathol*. 2016;100(3):482-492. DOI 10.1016/j.yexmp.2016.05.007. 査読有り

Sobue S, Mizutani N, Aoyama Y, Kawamoto Y, Suzuki M, Nozawa Y, Ichihara M, Murate T. Mechanism of paclitaxel resistance in a human prostate cancer cell line, PC3-PR, and its sensitization by cabazitaxel. *Biochem Biophys Res Commun*. 2016;479(4):808-813. DOI 10.1016/j.bbrc.2016.09.128. 査読有り

Mizutani N, Omori Y, Kawamoto Y, Sobue S, Ichihara M, Suzuki M, Kyogashima M, Nakamura M, Tamiya-Koizumi K, Nozawa Y, Murate T. Resveratrol-induced transcriptional up-regulation of ASase (SMPD1) of human leukemia and cancer cells. *Biochem Biophys Res Commun*. 2016;470(4):851-856. DOI 10.1016/j.bbrc.2016.01.134. 査読有り

祖父江沙矢加, 市原正智. 分子状水素によるマウス肝臓における遺伝子発現変化の解析. *中部大学生命健康科学研究所紀要*. 2016;12:38-41.

https://elib.bliss.chubu.ac.jp/webopac/bdyview.do?bodyid=XC16000012&elmid=Body&fname=L01_012_038.pdf&loginflg=on&lnkflg=true&block_id=296&once=true 査読無し

Ichihara M, Sobue S, Ito M, Ito M, Hirayama M, Ohno K. Beneficial biological effects and the underlying mechanisms of molecular hydrogen - comprehensive review of 321 original articles. *Med Gas Res*. 2015;5:12. DOI 10.1186/s13618-015-0035-1. 査読有り

[学会発表](計 9件)

祖父江沙矢加, 井上千聖, 堀文子, 岡本陽, 市原正智, 水素はミトコンドリアに作用して mtUPR を誘導しストレスから生体を保護する, 第 41 回日本分子生物学会年会, 2018 年
井上千聖, 祖父江沙矢加, 堀文子, 西沢祐治, 村手隆, 市原正智, 分子状水素は mtUPR の誘導を介して紫外線障害から線虫を保護する, 第 8 回日本分子状水素医学生物学会大会, 2018 年

祖父江沙矢加, 井上千聖, 堀文子, 村手隆, 市原正智, 分子状水素は H3K27 のメチル化状態を変化させ遺伝子発現を修飾し mtUPR を誘導する, 第 40 回日本分子生物学会年会, 2017 年

祖父江沙矢加, 井上千聖, 堀文子, 西沢祐治, 村手隆, 市原正智, 分子状水素はエピジェネティックに遺伝子発現を修飾するとともに mtUPR を誘導し生体を保護する, 第 7 回日本分子状水素医学生物学会大会, 2017 年

Sayaka Sobue, Chisato Inoue, Fumiko Hori, Takashi Murate, Masatoshi Ichihara. Molecular hydrogen activates the mitochondrial unfolded protein response via epigenetic histone modification and ameliorates ultraviolet light-induced damage in *Caenorhabditis elegans*. 8th World Congress on Targeting Mitochondria 2017. 2017
井上千聖, 祖父江沙矢加, 長谷川浩一, 堀文子, 市原正智, 水素による紫外線障害軽減効果の線虫を用いた分子機構の解明, 第 39 回日本分子生物学会年会, 2016 年

祖父江沙矢加, 岡本陽, 安形則雄, 市原正智, 分子状水素による肝障害軽減作用の背景にあるミトコンドリア保護効果に関する分子機構の解析, 第 89 回日本生化学会大会, 2016 年

Sayaka Sobue, Masatoshi Ichihara. Development of effective method for preventing life environment factor-induced diseases using molecular hydrogen. ICITE for SD-2015. 2015

Sayaka Sobue, Chisato Inoue, Fumiko Hori, Masafumi Ito, Kinji Ohno, Masatoshi Ichihara. Molecular hydrogen is a novel antioxidant to reduce oxidative stress and attenuate disease progression through modification of cell signaling and gene expressions. 15th International Conference on Oxidative Stress Reduction, Redox Homeostasis & Antioxidants. 2015

6 . 研究組織

(1)研究分担者

研究分担者氏名：村雲 芳樹

ローマ字氏名：(MURAKUMO, yoshiki)

所属研究機関名：北里大学

部局名：医学部

職名：教授

研究者番号(8桁): 40324438

研究分担者氏名：祖父江 沙矢加

ローマ字氏名：(SOBUE, sayaka)

所属研究機関名：中部大学

部局名：臨床検査技術教育・実習センター

職名：講師

研究者番号(8桁): 50513347

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、研究者個人に帰属されます。