

令和 3 年 6 月 18 日現在

機関番号：82612

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2018～2020

課題番号：18K07057

研究課題名(和文)BCOR-ITD変異腫瘍モデルの作出と特性解析

研究課題名(英文)Generation and characterization of BCOR-ITD tumor models

研究代表者

上野 瞳 (Ueno, Hitomi)

国立研究開発法人国立成育医療研究センター・小児血液・腫瘍研究部・研究員

研究者番号：30435630

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,400,000円

研究成果の概要(和文)：BCOR遺伝子の縦列重複変異(BCOR-ITD)によりどのように腫瘍形成が生じるのかを解明するために、Bcor-ITD変異を有するモデルマウスやモデル細胞の作出を行った。本研究では、受精卵に対してゲノム編集を行ったため、一部の細胞に意図しない変異が生じ、Bcor-ITDマウスの系統を作ることは困難であった。しかしながら、ヘテロ接合性マウスより、Bcor-ITDを発現するES細胞および線維芽細胞の樹立に成功した。また、一部の細胞において、腎明細胞肉腫と同様にBcorの高発現が確認され、Bcorの変異獲得による発現調節変化を確認した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

変異モデルは、様々な遺伝子変異の機能解析や治療薬開発に必須である。

本研究では小児固形腫瘍で発見したBCOR変異(BCOR-ITD)を有するマウスモデル細胞を作出し、その分子生物学的解析から腫瘍で認める特徴の一部が、変異獲得により生じていると推測できる結果を得た。また変異を有するES細胞を樹立したことにより、今後、BCOR-ITDによる異常な細胞分化や腫瘍化の観察について可能性が広がった。本研究の成果は、BCOR-ITD陽性腫瘍の解明に向けた足掛かりになったと考える。

研究成果の概要(英文)：To elucidate how BCOR internal tandem duplication (BCOR-ITD) causes tumorigenesis, we attempted to generate model mice and model cells with Bcor-ITD. In this study, we applied genome editing in fertilized eggs, which resulted in unintended mutations in some cells, making it difficult to create a line of Bcor-ITD mice. However, we succeeded in establishing Bcor-ITD positive ES cells and fibroblasts from heterozygote mice. The Bcor-ITD-expressing fibroblast cell line showed an upward trend in the expression of Bcor compared to the wild-type expressing line. In fibroblasts, when the activated X chromosome was Bcor-ITD, the gene expression of Bcor tended to increase than that of the wild type. This result is consistent with the over expression of BCOR-ITD in clear cell sarcoma of the kidney, suggests that mutation acquisition may result in regulated BCOR gene expression.

研究分野：小児腫瘍

キーワード：小児腫瘍 BCOR 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

BCOR の縦列重複変異 (BCOR-ITD) は、我々が小児の腎腫瘍である腎明細胞肉腫 (CCSK) において発見した変異である。CCSK の約 90% が BCOR-ITD を有し、common feature であるという見解に至っている。この変異は、ポリコム複合体の形成に重要な C 末端に位置する PUF 領域内に生じており、何らかのエピゲノム修飾異常が腫瘍形成に関与しているものと予想された。それは、CCSK の DNA メチル化がゲノム全体にわたり非常に特徴的な高メチル化であることから、推測可能であった。

この遺伝子変異をもつ腫瘍は、他の遺伝子変異が非常に少ないことが特徴的であり、BCOR-ITD が腫瘍形成におけるドライバー遺伝子である可能性を強く示唆しており、この変異のモデル生物や細胞の作出とその解析は、腎腫瘍のみならず BCOR-ITD 変異腫瘍の発症機序解明や治療法の開発に貢献出来るものと考えた。

2. 研究の目的

本研究は、小児腫瘍で認められる BCOR internal tandem duplication (BCOR-ITD) 変異のモデル細胞や生物を作出・解析することにより、腫瘍形成機序の解明や治療薬探索の足掛かりとすることを目的とする。

3. 研究の方法

(1) *Bcor*-ITD マウスの作出

BDF1 受精卵におけるゲノム編集によるモザイクマウスの作出

CRISPR/Cas9 を用いて、*Bcor* の標的領域を相同組み換えにより *Bcor*-ITD へ編集。

C57BL/6 との交配による繁殖・系統維持

腫瘍組織の解析

Bcor-ITD 変異マウスに腫瘍が発生したため、*Bcor* 遺伝子の発現を確認した。

(2) BCOR-ITD マウスからの細胞樹立

ES 細胞の樹立

不死化細胞の樹立

(3) *Bcor*-ITD 変異細胞の解析

Bcor-ITD ES 細胞の解析

定量 PCR による幹細胞および *Bcor* 関連遺伝子の発現解析およびバイサルファイトシークエンスによる DNA メチル化解析を行った。奇形腫作製による多能性の確認を行った。

Bcor-ITD fibroblast の解析

定量 PCR により、*Bcor* 関連遺伝子の発現解析及びバイサルファイトシークエンスによる DNA メチル化解析を行った。

4. 研究成果

(1) *Bcor*-ITD マウスの作出

BDF1 受精卵におけるゲノム編集によるモザイクマウスの作出

本研究では、CRISPR/Cas9 を利用し相同組み換えにより *Bcor* の標的領域を *Bcor*-ITD へ編集する方法で行った。また、本研究ではヒト腎腫瘍で認める BCOR-ITD 配列にマウスの配列で模倣した。受精卵の injection により、6 匹のモザイクマウスの作出に成功した。作出したマウスは全てメスであった。*Bcor* 機能喪失変異マウスにおいて、尾曲りが生じる報告があり、本研究のモザイクマウスにも一部のマウスで尾曲りが生じていた。

C57BL/6J との交配による繁殖・系統維持

Bcor-ITD モザイクマウスと C57BL/6 の交配により繁殖および系統作成を試みたが F1 マウスは 1 匹のみの出生であり、5 回の妊娠・出産の結果から、*Bcor*-ITD マウスの維持は困難であると判断し、細胞の樹立を優先することにした。

腫瘍組織の解析

モザイクマウスは、早期に脾腫が見られた個体や妊娠中に死亡した個体があった。脾腫を認めた個体は安楽死とし、その原因を明らかにするため可能な限り組織の保存を行った。摘出した組織の組織像から、血液腫瘍が発生していたことが確認された。また、腫瘍細胞を含む組織の RNA

を抽出し *Bcor* の発現を確認したところ、フレームシフト変異が発現していることを確認し、*Bcor*-ITD 変異に起因するものではないことを明らかにした。血液腫瘍の発生は、他の *Bcor* 機能喪失変異マウスの報告と一致していた。

妊娠中に死亡したマウスについては、胎子を摘出し確認した。胎子はおおよそ 12 日前後の発育状況であり、ジェノタイピングを行ったところ半数は *Bcor*-ITD ヘテロマウスであった。野生型の胎子と *Bcor*-ITD の胎子は外見上の差を認めず、親マウスにおいても、特に腫瘍等の異常を認めなかった。

(2) *Bcor*-ITD マウスからの細胞樹立

Bcor-ITD マウスの系統維持が困難であると判断し、細胞樹立を優先した。F1 マウスであるヘテロマウスに過排卵処置を行い、体外受精 (IVF) および体外受精-胚移植 (IVF-ET) により F2 世代の受精卵と胎子を得た。

ES 細胞の樹立

IVF による F2 世代の受精卵 (胚盤胞) より ES 細胞の樹立を試み、*Bcor*-ITD 陽性の XX および XY 細胞の樹立に成功した。同時にコントロールとなる野生型の ES 細胞も樹立した。*Bcor*-ITD 陽性 XX 細胞は、一般的な ES 細胞と同様に 2 本の X 染色体が活性化状態であることが確認された。また、樹立した ES 細胞の核型が正常であることを染色体検査により確認した。

不死化細胞の樹立

IVF-ET による妊娠マウスから胎子を摘出し、羊膜のジェノタイピングにより、*Bcor*-ITD マウスを選別し MEF および腎由来の細胞を培養した。不死化細胞は、長期培養法と温度感受性 SV40 large T 抗原導入法による樹立を試みた。長期培養による不死化細胞の樹立は出来なかったが、温度感受性 SV40 large T 抗原導入による MEF の不死化に成功し、複数のクローンを得ることに成功した。それぞれのクローンの X 染色体活性化状態を確認した。

(3) *Bcor*-ITD 変異細胞の解析

Bcor-ITD ES 細胞の解析

定量 PCR による幹細胞および *Bcor* 関連遺伝子の発現解析を行ったが、野生型と *Bcor*-ITD 陽性細胞との間に明らかな差を認めなかった。バイサルファイトシークエンスによる DNA メチル化解析の結果も差を確認することは出来なかった。

また、免疫不全マウスの皮下に ES 細胞を接種し、奇形腫を作成することで、樹立した ES 細胞の多能性について検討した。

Bcor-ITD fibroblast の解析

定量 PCR により、*Bcor* および関連遺伝子の遺伝子発現解析を行った。その結果、野生型発現クローンに比べ *Bcor*-ITD 発現クローンにおいて *Bcor* 遺伝子の発現量が高い傾向があることが明らかとなった。この傾向は腎明細胞肉腫での *Bcor* の高発現と一致した。しかしながら、その他の *Bcor* 関連遺伝子の発現については、腎明細胞肉腫で認めるような明らかな差を認めなかった。

Bcor の発現量と DNA メチル化修飾の関係について、バイサルファイトシークエンスによる DNA メチル化解析よりに検討した。*Bcor* の転写開始点付近の CpG アイランドの DNA メチル率は、野生型に比べ、*Bcor*-ITD 発現クローンにおいて低メチル化傾向であり、これも腎明細胞肉腫で認める結果と一致していた。

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
研究分担者	高田 修治 (Takada Shuji) (20382856)	国立研究開発法人国立成育医療研究センター・システム発生・再生医学研究部・部長 (82612)	

	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
連携研究者	寺尾 美穂 (Terao Miho) (10792880)	国立研究開発法人国立成育医療研究センター・システム発生・再生医学研究部・研究員 (82612)	
連携研究者	大喜多 肇 (Okita Hajime) (50317260)	慶応義塾大学・医学部・准教授 (32612)	
連携研究者	阿久津 英憲 (Akutsu Hidenori) (50347225)	国立研究開発法人国立成育医療研究センター・生殖医療研究部・部長 (82612)	
連携研究者	清河 信敬 (Kiyokawa Nobutaka) (60195401)	国立研究開発法人国立成育医療研究センター・小児血液・腫瘍研究部・部長 (82612)	

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