

令和 3 年 6 月 1 日現在

機関番号：12501

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2018～2020

課題番号：18K09717

研究課題名(和文) ゲノム編集KOマウスを用いたコラーゲン分子架橋因子PLOD2の癌転移における役割

研究課題名(英文) Evaluate changes in collagen cross-linking in lysyl hydroxylase 2 knockout mice and elucidate the role of PLOD2 in cancer metastasis

研究代表者

中嶋 大 (Nakashima, Dai)

千葉大学・大学院医学研究院・助教

研究者番号：50431747

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)：PLOD2(LH2)KOマウス制作を試みたが、ホモマウスは心臓形成不全により胎生致死に至ることが明らかになった。ヘテロマウスの形態学的特徴の解析を大腿骨を対象に行い、ヘテロに対して野生型の方がLH2の高発現を認め、大腿骨がより成熟し、硬くしなやかであるという構造的・機械的性質を持つことが示された。これはPLOD2が関与するコラーゲン架橋構造が変化し骨成熟がヘテロマウスで不十分になることに起因すると考えられる。低酸素下で口腔がん細胞株のPLOD2の発現を抑制すると増殖・浸潤・転移能が優位に低下した。これはPLOD2が口腔癌細胞の生存能力だけでなく浸潤転移に関与していることが示唆された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

コラーゲン分子のクロスリンクを規定しているリシン水酸化酵素PLOD遺伝子群に着目し、型コラーゲンの成熟に関与するPLOD2の欠損マウスの制作を試みたが、ホモマウスは胎生初期に心形成不全を起こし出生することができないと分かった。また、ヘテロマウスにおいてクロスリンクの構造変化による骨の構造・機械的性質の未成熟が明らかとなった。PLOD2変異動物モデルは報告がなく、今回の知見と樹立した疾患モデルは癌研究のみならず先天的硬組織疾患や心奇形の解析研究に有用であると考えられる。

研究成果の概要(英文)：We revealed that deficiency of lysyl hydroxylase 2 (LH2<sup>-/-</sup>) mice led to early embryonic lethality. Since the research of LH2 biological functions and their roles using abnormal LH2 animal models have not been reported, we assessed here significant changes for bone quality in LH2 heterozygous (LH2<sup>+/-</sup>) mice. Surprisingly, LH2<sup>+/-</sup> femurs showed discontinuity of epiphyseal growth plate and significantly reduced cancellous bone mineral density and biomechanical properties compared to wild type mice. Further, significant lower levels of telopeptidyl hydroxyllysine residues, LH2-mediated stable cross-links, and mineralization abilities were seen in LH2<sup>+/-</sup> femurs compared to wild type mice. These data contribute to our understanding that LH2 indeed regulates critical role in bone strength and quality through lysyl hydroxylation of type I collagen telopeptides.

研究分野：分子生物学

キーワード：ノックアウトマウス CRISPR/Cas9 PLOD2 LH2 胎生致死 コラーゲンクロスリンク HIF-1 口腔扁平上皮癌

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

コラーゲンは生命を物理的・生理的に維持する最も重要な構造基質であり、生体の総蛋白質の1/4を占める。特に、細胞外マトリックスの中心的分子として骨格形成に関与し、様々な分子と結合することで複雑なネットワークを構成する。癌細胞は、浸潤・転移を起こす際に細胞外マトリックスを分解することは広く知られている。また、癌組織においてコラーゲン分子間架橋結合(クロスリンク)の質的違いが癌転移を起こす要因となることが近年報告されているが、詳細なメカニズムは報告されていない。本研究は、コラーゲン分子のクロスリンクを規定しているリシン水酸化酵素 *PLOD* 遺伝子群に着目し、*in vitro* における解析だけでなく、独自にゲノム編集技術で作製したノックアウトマウスを用いて、癌細胞転移機構の解明・癌転移抑制薬の開発を目的とする。

2. 研究の目的

本研究では、先行研究で得た LH2 ヘテロマウスの交配を継続させ LH2 ノックアウトマウスの確認および LH2 ノックアウトマウス由来胎児線維芽細胞(MEF細胞)を作製し、癌細胞の足場・道を不良にした状態を作ること、癌転移実験を進めていく計画である。

3. 研究の方法

1) ヘテロマウスの作製の確認の継続、ホモマウス獲得のためヘテロマウス同士で交配させ、F0→F1→F2 とホモマウスの数を増やしていく。\**PLOD2* ノックアウトによりホモマウスの出産が困難であった場合は胎生期マウスの死産の時期、MEF(マウス胎児線維芽細胞)の培養を行い、機能解析を行う。*PLOD2* ノックアウトによりホモマウスの出産が困難であった場合は、ヘテロマウスを用いて *in vivo* の実験を行う。

2) 作出されたノックアウトマウスの形態学的特徴および行動観察を行う。米国ノースカロライナ大学(世界で唯一クロスリンク解析ができる2か所の施設のうちの一つ)との共同研究により、ノックアウトマウスにおけるコラーゲンクロスリンクの質的・量的な生化学的解析を行う。癌細胞を注射し腫瘍形成能(腫瘍剛性変化)や転移能について比較・解析(コラーゲンクロスリンク解析を含む)を行う。臨床サンプル(手術検体;癌組織と正常組織)におけるコラーゲンクロスリンクの質的・量的な生化学的解析及び *PLOD2* の発現(免疫蛍光染色)と臨床的相関の有無を確認する。

3) 培養細胞に *PLOD2* 遺伝子の発現ベクターを導入し、遺伝子強制発現した形質細胞を作製する。次に *in vitro* において、形質転換細胞における機能解析を行う。

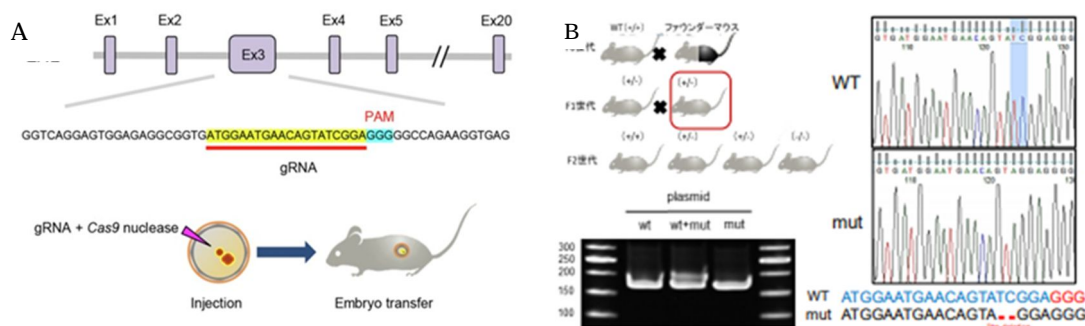
4) *in vivo* における形質転換細胞を用いたマウス移植実験により、腫瘍の形成能、転移能について比較・解析(コラーゲンクロスリンク解析を含む)を行い、*PLOD2* の役割を明らかにする。

5) *PLOD2* 発現に関与する薬剤を検索・同定する。

4. 研究成果

(1) *CRISPR/Cas9* 法を用いて得た、ヘテロマウス同士を交配させ、子マウスの DNA シークエンス解析をおこなった。

第9染色体の *PLOD2* 遺伝子のエクソン3を標的とする gDNA 配列を設計し、その gDNA と *Cas9* mRNA をマイクロインジェクション法にて受精卵に注入し母体マウスに移植した。F1 世代のマウス尾尖より抽出した gDNA のエクソン3を含む領域を増幅しシークエンス解析を行ったところ、エクソン3に 2bp の欠失を認めた。野生型と欠失変異型(mut)のプラスミドの電気泳動にて wild type(WT)のバンド(single band)と、double band の2種類を認めた。DNA シークエンス解析を行ったところ、double band はヘテロであることが判明した。ヘテロマウス同士を交配しても、2種類のバンドのみ認め、ホモマウスは確認できなかった。(図1A, 1B, 表1)



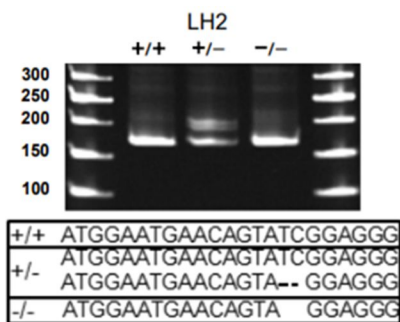
(図1 CRISPR/Cas9 法による LH2 Het マウスの制作と LH2 Het マウスのシークエンス解析)

生存数	LH2 <sup>+/+</sup>	LH2 <sup>+/-</sup>	LH2 <sup>-/-</sup>
胎生10.5日	9(9)	17(18)	11(9)
出生	60(60)	127(120)	0(60)

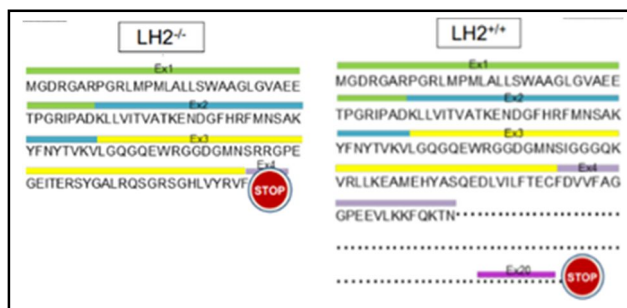
※括弧はメンデルの法則における生存数

(表1.胎生期の仔マウスの遺伝子型)

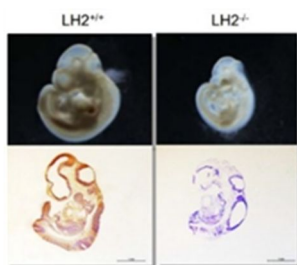
(2) *PLOD2* のホモマウスは胎生致死を起こしている可能性を考え、胎生期における解析を行った。胎生初期に Genotype 解析を行ったところ、メンデルの法則に従った分布で胚が確認され、LH2 ホモマウスは胎生 10.5 日まで生存していた。LH2 欠損型でのアミノ酸配列は、mRNA レベルでの 2bp 欠損によるフレームシフトが生じることでエクソン 4 に終始コドンが現れており、タンパクの変性が生じている可能性が示唆された。形態学的解析によって、LH2 ホモマウスの胚では発育が低下し、心破裂を含めた心室機能障害が確認された。小胞体ストレスとアポトーシスに着目したところ、LH2 ホモマウスの胚では小胞体ストレス応答性遺伝子の有意な発現亢進が認められ ( $p < 0.05$ )、これに伴って心室における Bax や Caspase 3 の発現上昇をみた。(表 1, 図 2,3,4,5)



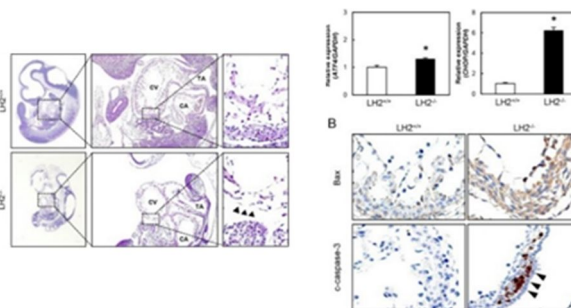
(図 2. gDNA レベルでの発現解析)



(図 3. 野生型と LH2 欠損型のアミノ酸解析)



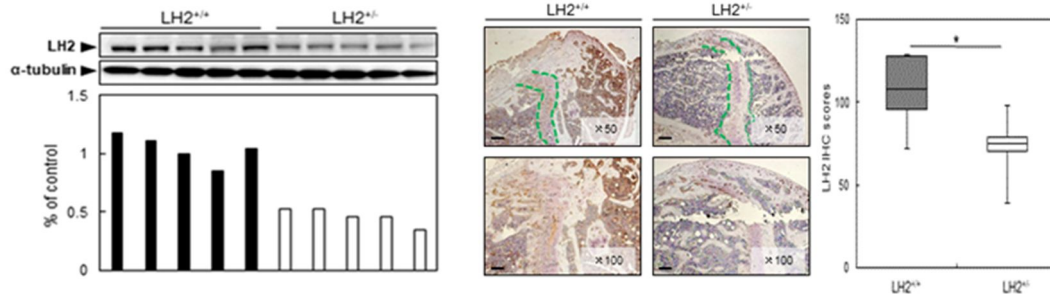
(図 4. 胎生 10.5 日の胚での LH2 発現状態)



(図 5. LH2 欠損による胎仔マウスの心臓奇形とアポトーシス調節因子の発現亢進)

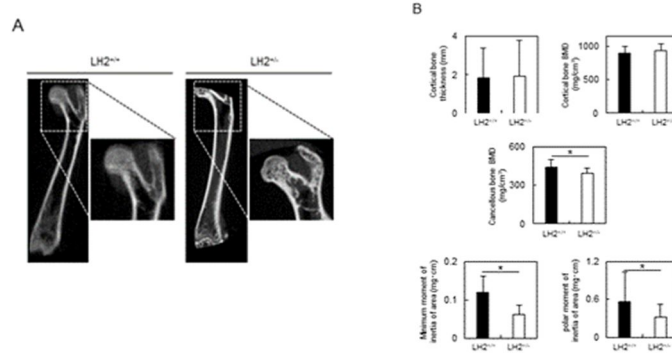
(3) WT と比較したヘテロマウスの大腿骨の形態的特徴の解析を行った。

前述のように、LH2 欠損マウスは胎生致死であることが確認されたため、成体マウスでの表現型の解析はヘテロタイプ (Het) と野生型 (WT) の生後 10.5 週の雄を用いて行った。LH2 は硬組織のコラーゲン架橋と密接に関連しているため、骨形態の表現型に焦点を当てた。LH2 タンパク発現はヘテロタイプにて減弱を認めた。一方で LH ファミリーの LH1, LH3 のタンパク発現に有意差は認めなかった。WT, Het 大腿骨の免疫組織化学染色を行ったところ、ヘテロに対して WT の方が LH2 の高発現を認めた。WT では骨頭部の成熟を認めたが、ヘテロでは骨端成長板の周囲が多孔性で構造が疎であることが示された。(図 6)

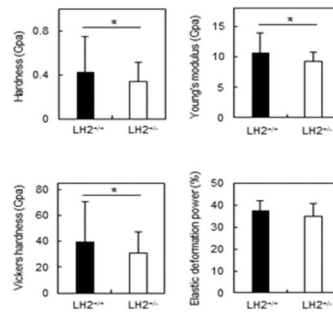


(図 6. 成体マウス大腿骨における LH2 発現)

(4) 大腿骨の構造や性質の変化を確認するために  $\mu$ CT, ナノインデンテーション試験を実施した LaTheta (LCT-200) 実験動物用  $\mu$ CT にて大腿骨を撮影したところ、骨の形態や皮質骨の厚みにおいて明らかな変化は認めなかったが、定量的分析 (pQCT) において海綿骨断面二次モーメント、面積の最小慣性モーメント、および極慣性モーメントはヘテロタイプにて優位に低下していた。ナノインデンテーション試験 (物質の力学的物性をナノメートルスケールで測定) を施行し、ヤング率と弾性変形仕事率において有意差を認めた。上記の結果より、WT の大腿骨の方がより硬くしなやかであるという機械的性質を持つことが示された。(図 7A・B, 図 8)

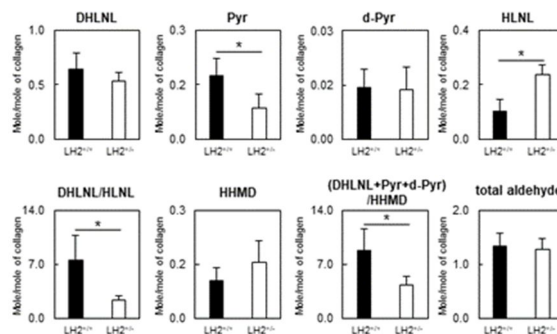


(図 7.μCT を用いた大腿骨の評価)



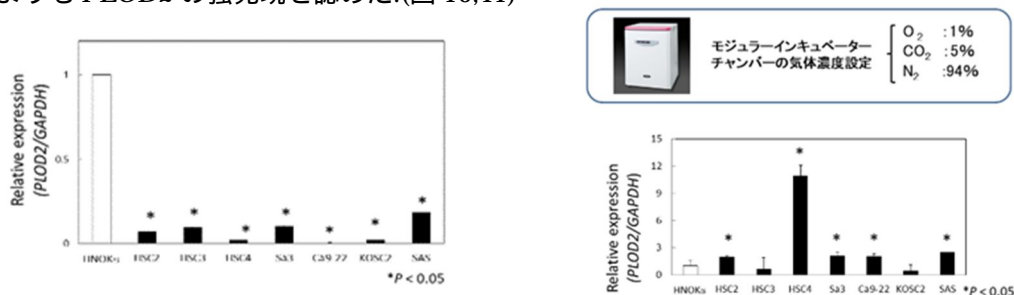
(図 8.ナノインデンテーション試験による大腿骨骨体部の機械的性質の評価)

(5)大腿骨のコラーゲンクロスリンクの質的・量的な生化学的解析を行った。米国ノースカロライナ大学との共同研究により、大腿骨のアミノ酸クロスリンク解析を実施した。WTと比較して *PLOD2* が関与するクロスリンク (Pyr,DHLNL,d-PYr)の性状は変化していた。これにより、LH2ヘテロマウス的大腿骨では骨の成熟が不十分であることが示唆された。(図 9.)



(図 9.大腿骨のアミノ酸クロスリンク解析)

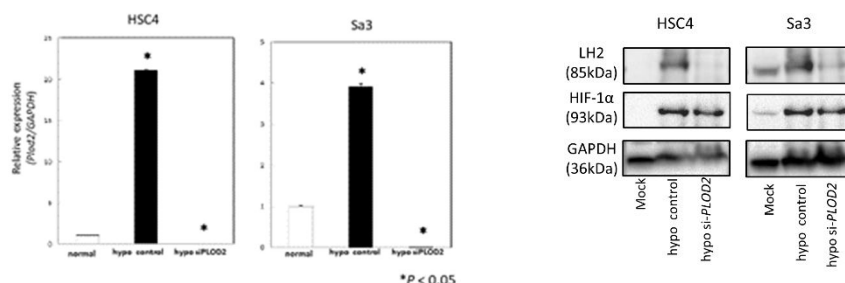
(6)ヒト正角化上皮細胞(HNOKs)と口腔扁平上皮癌(OSCC)細胞株における *PLOD2*(LH2)の発現状況を mRNA レベルで比較した。OSCC 細胞株において *PLOD2* は HNOKs と比較して発現減弱を認めた。*PLOD2* は低酸素応答に關与する *HIF-1α* の下流遺伝であり、低酸素環境で培養した OSCC 細胞株は通常条件で培養した際よりも *PLOD2* の強発現を認めた。(図 10,11)



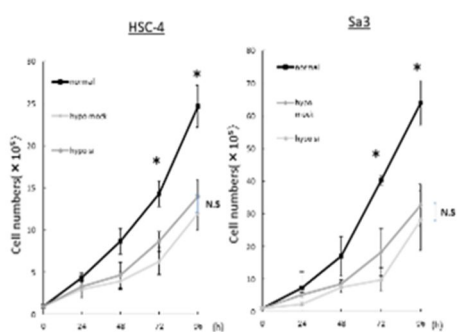
(図 10.*PLOD2* の OSCC 細胞株における発現状況)(図 11.*PLOD2* の低酸素下における発現解析)

(7)低酸素条件で OSCC 細胞株を培養し *PLOD2* 発現抑制させ、発現解析と機能解析を行った。低酸素条件で培養した OSCC 細胞株(HSC-4,Sa3)に si*PLOD2* を導入し発現抑制を mRNA,タン

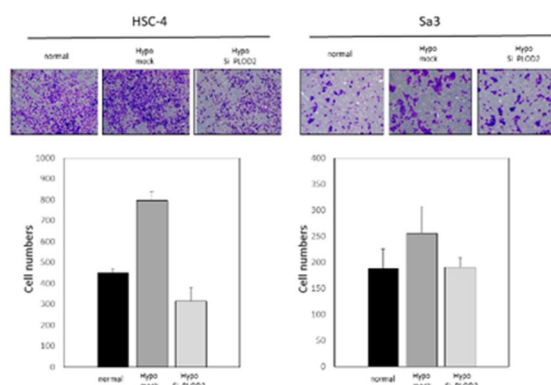
パクレベルで確認した。増殖試験、遊走能試験, 転移試験において *PLOD2* 発現抑制株の遊走能, 遊走能は通常条件で培養した OSCC 細胞株と比較して優位に増殖能, 遊走能が低下していることが示唆された。(図 12,13,14,15)



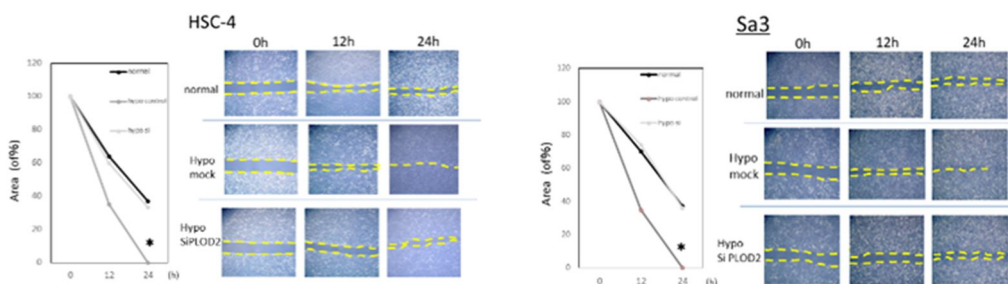
(図 12.OSCC 細胞株への si*PLOD2* 導入と mRNA・タンパクレベルでの *PLOD2* 抑制の確認)



(図 13.低酸素条件下での増殖能試験)



(図 14.低酸素条件下での浸潤能試験)



(図 15.低酸素条件下での遊走能試験)

以下に研究成果の考察を示す。

本研究は、コラーゲン分子のクロスリンクを規定しているリシン水酸化酵素 LH2 に着目し, *in vitro* における解析だけでなく, 独自にゲノム編集技術で作製したノックアウトマウスを用いて、癌細胞転移機構の解明・癌転移抑制薬の開発を目的とした。*PLOD2* ホモマウスは胎生初期の心臓の欠陥により胎生致死となることが分かった。*PLOD2* ヘテロマウスにおいて LH2 の発現は低下し, コラーゲンクロスリンクの成熟不足による骨の構造変化や機械的強度の低下が生じている可能性が示唆された。*in vitro* の実験では OSCC 細胞株において *PLOD2* は HNOKs と比較して低発現だが, 低酸素状態で高発現し, 細胞増殖能, 遊走能, 浸潤能を増強させる。また, *PLOD2* の発現抑制株では *HIF-1α* を起点とした低酸素応答は起こるものの, 細胞増殖能, 浸潤能, 遊走能は低酸素状態における口腔癌細胞株のコントロール群と比較して有意に低下していることから口腔癌細胞の悪条件下での生存効率の向上については, 癌の進展, 転移, 浸潤における重要な標的遺伝子となりうることを示唆された。コンディショナルノックアウトマウスを作成しさらなる研究が必要と考えられる。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計1件（うち査読付論文 0件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 1件）

1. 著者名 笠松厚志	4. 巻 512
2. 論文標題 Deficiency of lysyl hydroxylase 2 in mice causes systemic endoplasmic reticulum stress leading to early embryonic lethality	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Biochemical and Biophysical Research Communications	6. 最初と最後の頁 486-491
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.bbrc.2019.03.091. Epub 2019 Mar 21.	査読の有無 無
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1件（うち招待講演 0件/うち国際学会 0件）

1. 発表者名 野崎 龍之介
2. 発表標題 骨代謝関連因子Lysyl hydroxylase 2の機能喪失がもたらす心臓形成 異常 ゲノム編集によるKOマウスの作製
3. 学会等名 第75回 NPO法人日本口腔科学会学術集会
4. 発表年 2021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
研究分担者	椎葉 正史 (Shiiba Masashi) (20301096)	千葉大学・大学院医学研究院・准教授  (12501)	
研究分担者	鶴澤 一弘 (Uzawa Katsuhiko) (30302558)	千葉大学・大学院医学研究院・教授  (12501)	
研究分担者	笠松 厚志 (Kasamatsu Atsushi) (60375730)	千葉大学・医学部附属病院・講師  (12501)	

6. 研究組織（つづき）

	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
研究協力者	岩田 敏一  (Iwata Toshikazu)	東洋テクニカ・ナノイメージング&アナリシスセンター・ Application Engineer	

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			
米国	ノースカロライナ大学			