

令和 4 年 6 月 14 日現在

機関番号：12301
研究種目：若手研究
研究期間：2019～2021
課題番号：19K16021
研究課題名(和文) KMT2欠損子宮内膜がんモデル動物の開発：エピゲノム異常による発がん機序の解明

研究課題名(英文) Development of KMT2-deficient animal models for studying endometrial cancer

研究代表者
小林 良祐 (Kobayashi, Ryosuke)

群馬大学・生体調節研究所・日本学術振興会特別研究員(PD)

研究者番号：30802855
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)：本研究では子宮内膜がんで頻繁に認められるKMT2変異の意義を明らかにすることで将来的な子宮内膜がん新規治療法の開発を目指し、子宮特異的Kmt2欠損マウスを作製した。子宮特異的Kmt2欠損マウスはPtenノックアウトによる子宮内膜がん発症を加速させ、Kmt2が子宮におけるがん抑制因子であることを明確にした。さらに、Kmt2欠損によるエピゲノム変化をIn vivoで解析するため、マウス子宮上皮細胞を単離してCUT&Tagによりヒストン修飾解析を行う一連の実験系を確立した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

エピゲノムの異常は、細胞の遺伝子発現パターンを正常状態から逸脱させることにより発がんに寄与すると考えられており、エピゲノムを標的としたがん治療薬の開発が進んでいるが、これまで子宮内膜がんの病態とエピゲノム異常との関係はほとんど明らかでない。ヒストンメチル化酵素KMT2は子宮内膜がん症例の20-30%で変異が認められる。我々が確立した子宮特異的Kmt2欠損マウスモデルにおける発がん機序を精査することで、高頻度であるKMT2変異子宮内膜がん症例に対する新規治療法の開発に繋がることが期待される。

研究成果の概要(英文)：The goal of this study is to clarify the significance of KMT2 mutations that are frequently found in endometrial cancer. To achieve this, we generated uterus-specific Kmt2 knockout mice. Kmt2 deficiency accelerated the development of endometrial cancer in Pten knockout line, suggesting that Kmt2s have tumor suppressive roles in the murine endometrium. Furthermore, to analyze the epigenetic profiles of Kmt2-deficient endometrium in vivo, we established the experimental pipeline to evaluate histone modifications where murine endometrial epithelial cells were isolated and conducted to CUT&Tag analysis.

研究分野：エピジェネティクス

キーワード：マウスモデル 子宮内膜がん エピゲノム KMT2ファミリー H3K4メチル化

1. 研究開始当初の背景

子宮内膜がん(子宮体がん)は本邦における婦人科領域悪性腫瘍の第一位を占める。子宮内膜がん治療における第一選択は外科手術による子宮摘出だが、若年層患者の増加や晩婚化・高齢出産が進む昨今では、分子標的治療を中心とした新規妊孕性温存治療法の開発が重要である。

がんでは遺伝子変異に加えてエピゲノムの異常も生じており、近年は新たな治療標的として注目されている。我々は子宮内膜がんのエピゲノム標的治療の可能性を探るため、米国がんゲノムアトラス(TCGA)のデータベースより、子宮内膜がんにおけるエピゲノム調節因子の遺伝子変異を探索した。すると、ヒストンメチル化酵素 KMT2 ファミリーの遺伝子群に高頻度で変異が認められることを見出した。KMT2A と KMT2B は H3K4me3 メチル化を介してプロモーター活性を、KMT2C および KMT2D は H3K4me1 メチル化を介してエンハンサーの機能調節に関わることが知られている。以上の知見から、KMT2 の変異は H3K4 メチル化機構を破綻させ、細胞の遺伝子発現パターンをゆがめてしまうことで子宮内膜がんの発生や進行を後押ししているのではないかと考えた。

2. 研究の目的

本研究では子宮特異的な KMT2 欠損マウスを開発することによって、KMT2 が子宮内膜におけるがん抑制因子であることを生体レベルで証明し、KMT2 変異がん治療法開発に向けたモデル動物を樹立することを目指した。

3. 研究の方法

Kmt2 ファミリーの遺伝子は、いずれも全身ノックアウトは耐性致死となることが知られている。したがって、CRISPR/Cas9 システムを使った受精卵ゲノム編集により子宮特異的な KMT2 欠損マウスを作製した。具体的には、Pgr-Cre マウス、Ltf-Cre マウス、Kmt2-flox マウス、Pten-KO マウスを作製した。これら Cre マウスや flox マウスを様々な組み合わせで交配することで子宮特異的な KMT2 欠損マウスを樹立し、表現型解析を行った。

子宮内膜がんの原発組織である子宮上皮細胞の分子生物学的解析を可能にするため、酵素処理や物理的破壊による子宮上皮細胞の単離方法の検討、および単離した少数の上皮細胞に対する CUT&Tag 法によるゲノムワイドなヒストン修飾解析法の検討を行った。

4. 研究成果

遺伝子改変マウスライン作製において、Kmt2-flox および Pten-KO マウスラインは Cas9 タンパク質/gRNA 複合体および一本鎖 DNA 鋳型ドナーをエレクトロポレーション法で野生型マウス受精卵に導入することにより作製した(Horii *et al.* 2017, *Sci Rep*)。一方、Cre 発現マウスラインの作製には、長鎖の二本鎖 DNA 鋳型ドナーをマイクロインジェクション法により導入する必要があるが、ノックイン位置の指定に重要なドナー上のホモロジーアームの長さが作製効率に大きく影響することが知られていた。そこで、Pgr-Cre マウスを効率的に作製できるホモロジーアームの長さを検討した。ホモロジー長が 33 bp/33 bp では Cre ノックイン効率は 17.4% だったのに対し、800 bp/800 bp では 47.4% とより高効率だった(図1)。この結果に従い、Ltf-Cre マウス作製も 800 bp/800 bp ホモロジーアームをもつ鋳型ドナーを用いて作製した。

作製した Pgr-Cre および Ltf-Cre マウスが子宮で Cre リコンビナーゼによる組換えを起こすか確認するために、Cre-loxP レポーターマウス(R26R-H2B-mCherry)と交配し、F1 世代のマウス子宮を解析した。Pgr-Cre は子宮内膜全体で組換えが確認された(図2)。一方 Ltf 遺伝子のエクソン 1 に Cre リコンビナーゼ配列を挿入した

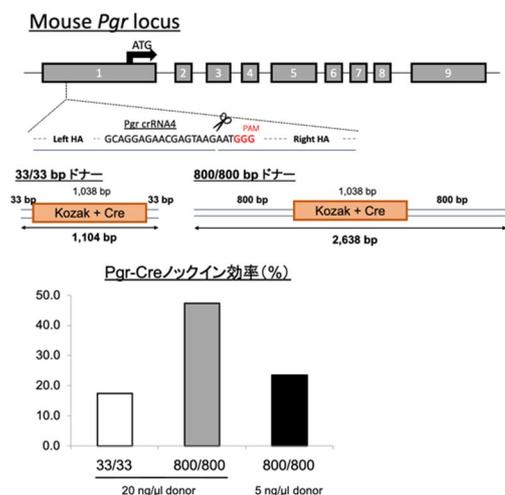


図1 二本鎖DNAドナーを使用したノックイン効率の検討

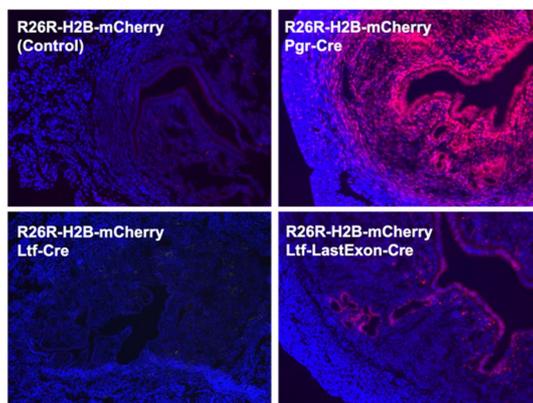


図2 子宮特異的な組換え反応の確認

Ltf-Cre マウスでは、子宮での組換えが確認

できなかった。そこで Ltf 遺伝子の最終エクソンに P2A 配列で Cre リコンビナーゼ配列を接続した Ltf-lastExon-Cre マウスを新たに作製し解析を行ったところ、子宮上皮細胞での組換えを確認することができた。

作製した Cre マウスおよび flox マウスを交配し、子宮特異的 Kmt2 ノックアウトマウス(Kmt2-uKO) を作製した。Kmt2-uKO マウスは、子宮における過形成やがん化を引き起こさなかった。しかし、Kmt2-uKO マウスを Pten-KO マウスと交配させたところ、生後 4 ヶ月で子宮の肉眼病理的な異常を認めた(図3)。組織学的解析の結果、筋層浸潤を有する子宮内膜がんを発症していることが明らかとなった。生後 4 ヶ月の Pten-KO マウス子宮ではがん化は認められず、Kmt2-uKO は Pten-KO マウスの子宮がん発症を加速させたことが明らかとなった。このように、遺伝子改変マウスを用いた生体レベルでの解析より、KMT2 は子宮内膜におけるがん抑制因子であることを証明した。

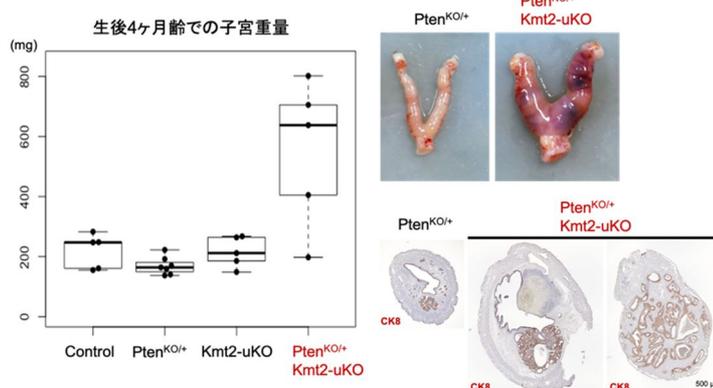


図3 Kmt2-uKOはPten-KOマウスの子宮がん発症を促進する

Kmt2 欠損ががんを促進するメカニズムを解明するためには、子宮内膜がんの原発組織である子宮上皮細胞における遺伝子発現やヒストン修飾のプロファイルを比較する必要がある。子宮内膜は、上皮細胞だけでなく間質細胞や血管内皮細胞などさまざまな種類の細胞によって構成されるため、分子生物学的特徴づけを行うためには上皮細胞だけを単離する方法を確立する必要がある。過去に報告のあった方法 (Wilson *et al.* 2019, Nat commun) を一部改変し、子宮上皮細胞の単離を試みた。子宮組織を物理的に破碎した後に酵素処理によって細胞を分離、その後磁気ビーズ付き EpCAM 抗体で標識した上皮細胞をマグネットで単離した。この方法でマウス 1 匹の子宮から個程度の細胞を単離することができ、遺伝子発現解析した結果、上皮細胞が濃縮されていることがわかった(図4)。また、単離した上皮細胞から CUT&Tag によるヒストン修飾解析を試みたところ、少ない細胞数(100,000 個)から H3K4me1 および H3K27ac の全ゲノムプロファイリングデータを得ることができた。上記の技術を使って Kmt2-uKO 子宮における分子生物学的特徴づけを行い、子宮内膜がんにおける KMT2 変異の意義を明らかにしたい。

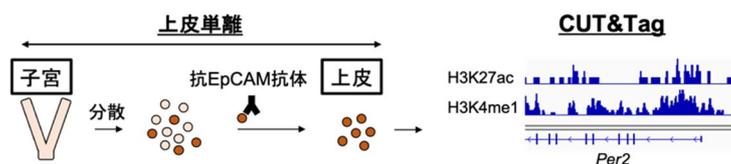


図4 マウス子宮上皮細胞のヒストン修飾解析

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計4件（うち査読付論文 4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 Horii Takuro, Kobayashi Ryosuke, Kimura Mika, Morita Sumiyo, Hatada Izuho	4. 巻 9
2. 論文標題 Calcium-Free and Cytochalasin B Treatment Inhibits Blastomere Fusion in 2-Cell Stage Embryos for the Generation of Floxed Mice via Sequential Electroporation	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Cells	6. 最初と最後の頁 1088 ~ 1088
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3390/cells9051088	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 Kohro Y, Matsuda T, Yoshihara K, Kohno K, Koga K, Katsuragi R, Oka Ti, Tashima R, Muneta S, Yamane T, Okada S, Momokino K, Furusho A, Hamase K, Oti T, Sakamoto H, Hayashida K, Kobayashi R, Horii T, Hatada I, Tozaki-Saitoh H, Mikoshiba K, Taylor V, Inoue K, Tsuda M	4. 巻 23
2. 論文標題 Spinal astrocytes in superficial laminae gate brainstem descending control of mechanosensory hypersensitivity	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Nature Neuroscience	6. 最初と最後の頁 1376 ~ 1387
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1038/s41593-020-00713-4	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -
1. 著者名 Sugiyama Makoto, Yasunaga Arata, Kobayashi Ryosuke, Fukasawa Hanae, Hashimoto Osamu, Kurusu Shiro, Sasada Hiroshi, Yoshioka Kazuki	4. 巻 383
2. 論文標題 Improvement in identification of pro-estrous mice by using a novel method of detecting vaginal mucous cells	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Cell and Tissue Research	6. 最初と最後の頁 1183 ~ 1190
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1007/s00441-020-03310-w	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -
1. 著者名 Kimprasit T, Nunome M, Iida K, Murakami Y, Wong ML, Wu CH, Kobayashi R, Hengjan Y, Takemae H, Yonemitsu K, Kuwata R, Shimoda H, Si L, Sohn JH, Asakawa S, Ichianagi K, Maeda K, Oh HK, Mizutani T, Kimura J, Iida A, Hondo E	4. 巻 16
2. 論文標題 Dispersal history of <i>Miniopterus fuliginosus</i> bats and their associated viruses in east Asia	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 PLOS ONE	6. 最初と最後の頁 e0244006
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1371/journal.pone.0244006	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

〔学会発表〕 計6件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 小林良祐
2. 発表標題 次世代型疾患モデル動物作出 遺伝子改変マウスを効率よく作製・供給するための試み
3. 学会等名 第163回日本獣医学会学術集会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 小林良祐 , 堀居拓郎 , 末友恵理子 , 木村美香 , 森田純代 , 畑田出穂
2. 発表標題 交配を必要としない条件付きノックアウトマウス作製に向けた試み：3段階式ゲノム編集
3. 学会等名 第43回日本分子生物学会総会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 小林良祐、堀居拓郎、川田結花、末友恵理子、木村美香、森田純代、畑田出穂
2. 発表標題 ゲノム編集を用いて作製したfloxedマウスの迅速なスクリーニング法
3. 学会等名 第66回日本実験動物学会総会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 小林良祐、堀居拓郎、川田結花、末友恵理子、木村美香、森田純代、畑田出穂
2. 発表標題 Creリコンビナーゼを利用したfloxedマウスの効率的なジェノタイピング法
3. 学会等名 日本ゲノム編集学会第4回大会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 小林良祐、堀居拓郎、川田結花、末友恵理子、木村美香、森田純代、畑田出穂
2. 発表標題 条件付きノックアウトマウスの迅速な作製および選抜法の開発
3. 学会等名 日本獣医学会第162回大会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 小林良祐、堀居拓郎、川田結花、末友恵理子、木村美香、森田純代、畑田出穂
2. 発表標題 In vitro Creリコンビネーション法によるfloxマウスの迅速な選抜
3. 学会等名 第42回日本分子生物学会年会
4. 発表年 2019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
---------	---------