

令和 3 年 8 月 25 日現在

機関番号：31602

研究種目：若手研究

研究期間：2019～2020

課題番号：19K17339

研究課題名(和文) 系統差に着目した過剰肋骨の遺伝学的解析

研究課題名(英文) The origin of supernumerary ribs focused on rat strains

研究代表者

熊本 隆之 (Kumamoto, Takayuki)

奥羽大学・薬学部・講師

研究者番号：00433558

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,300,000円

研究成果の概要(和文)：過剰肋骨は発生毒性試験で胎児に観察される骨格所見であるが、その成因は不明である。以前見出した5FC投与によるホメオボックス(Hox)遺伝子発現変動を伴う過剰肋骨出現の機序を探るため培養細胞を用いた評価を行い、5FCによる骨格異常は細胞毒性に依らないHoxの直接制御であることを明らかにした。さらに自然発生の系統差に注目、高頻度のWistar系ラットと低頻度のSD系ラットをシーケンサーを用い比較検討、Hoxa9 exon1とその前方領域に差を認め、特にHox発現を制御し中軸形成に関与するmiRNAの成熟に不可欠な領域の過剰肋骨出現率と一致した変異を見出し、過剰肋骨の成因となる可能性が示唆された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

医薬品や農薬、食品添加物などは有害性に関する各種毒性試験がなされ、その一つに生殖発生毒性試験がある。そこで生殖や形態などが観察されるが、骨格異常のひとつである過剰肋骨はその成因は不明であり安全性評価の課題となっていた。

本研究はこれまでのモデル動物を用いた研究に加え、培養細胞を用いた評価および過剰肋骨の自然発生が多い系統と少ない系統の比較検討を行い、その毒性学的意義を多角的に考察した。

研究成果の概要(英文)：Oral administration of 5-Fluorocytosine (5FC) to pregnant rats on GD9 and 13 was shown to induce thoracolumbar supernumerary ribs and abnormal digits, respectively, with the changes in the expression of Homeobox(Hox) genes in fetuses. Because the abnormalities of digits were severe and the expression of cyclin genes were changed, we conducted in vitro evaluations. Cytotoxicity and the changes of expressions of cyclin genes shown with 5FU, the positive target, were not observed. Therefore, the onset of skeletal abnormalities with 5FC were not directly caused by apoptosis induced toxicity. Next, we conducted to elucidate by sequence analysis rat strains (Wistar / SD). Although no significant differences were observed in most sites of Hox genes, a significant difference was shown in a certain region, which overlaps with a miRNA that negatively regulate the expression of multiple Hox genes and control posteriorization of axial skeleton with regulating the expression of multiple Hox genes.

研究分野：毒性学

キーワード：過剰肋骨 催奇形性 骨格異常 先天異常 ホメオボックス 系統差

1. 研究開始当初の背景

医薬品および農薬、食品添加物等の化学物質群は、有害性の確認やリスク回避のために多様な毒性試験が実施され、安全性評価に用いられている。この中で生殖発生毒性試験は被験物質の繁殖と催奇形性への影響を明らかにするため、生殖機能や胎仔の成長、形態への影響が観察される。形態は外表・内臓・骨格所見について、その重篤性から異常、変異、対象外に区分されている(国際先天異常学会 Berlin Workshop, 日本先天異常学会用語委員会他)。骨格の形態異常については、椎骨、肋骨、四肢等の欠損や過剰、癒合等があり、一般に不可逆的で QOL に支障をきたすことから異常に区分される事象が多い。この中で過剰肋骨は名称の通り肋骨が過剰に生じる所見であり、被験物質投与でしばしばみられるが、その成因や発生メカニズムが不明であり、安全性評価の課題となっている。ヒト出生児に関しても 3-7%の発現率が報告されているが、その成因は不明である (Nakajima et al., , Insight Imaging, 2014)。

過剰肋骨の成因について、我々はホメオボックス遺伝子 (Homeobox: Hox) の観点からの解明を試みてきた。ホメオボックス遺伝子はヒトや齧歯類など脊椎動物に共通した 180 塩基対 60 アミノ酸のホメオボックスドメインを中心とした a-d の 4 つの集団からなる。この集団が 1 番から 13 番に割り振られ、発生期に若い番号から順に時期特異的に働き、体節の位置決定を行うことで、頭蓋から頸椎、胸椎、腰椎、仙椎、そして四肢の形成を司る (Burke et al., Development, 1995 他)。過剰肋骨、すなわち胸椎-腰椎の境界部位の決定においては Hox9 および Hox10 が関与していることが知られており (Gaunt et al, Mech. Dev., 1999)、Hoxa9 および Hoxa10 はそれを代表する遺伝子である。

以前、我々は過剰肋骨の出現が低頻度である Sprague Dawley (SD) 系ラットを用いた薬剤誘発性過剰肋骨誘発モデル動物 (妊娠 9.0 日齢に抗真菌薬フルシトシンを経口投与) を作製、予定軟骨に出現する Sox9 mRNA の whole mount in situ hybridization により肋骨発生期の確認と過剰肋骨出現部位の位置決定を行い、実体顕微鏡下で切り出して遺伝子発現を解析、ホメオボックス遺伝子のうち Hoxa10 発現が減少し、出現が後方化する現象を突き止めている。Hoxa10 は将来的に肋骨が出現する胸椎と腰椎の境目を決定し、腰椎の胸椎化を防ぐ遺伝子であり、この後方化が過剰肋骨の発生要因の一機序であることを示した。さらにその立証として、より遅い投与期の妊娠 13.0 日齢投与で Hox11-13 の減少と四肢の形成異常がほぼ全例で引き起こされることを見出し、過剰肋骨は一連のホメオボックス遺伝子と中軸骨格形成の同一線上にあることを考察している (Ku wagata, Kumamoto et al., Cong. Anom., 2019 / Kumamoto et al., FTS., 2020)。

2. 研究の目的

以上、胎児期 5-FC 投与の薬剤誘発モデルにおいて、ホメオボックス遺伝子群の発現変動に関与しながら、投与時期に付随し過剰肋骨ないし四肢の形成異常を引き起こすことを見出した。しかしながら、四肢の異常はほぼ 100% 生じるが (Control 群は約 0%)、趾節骨や中足骨、足根骨 (前肢においては指節骨や中手骨、手根骨) の欠損、短小、癒合といった重篤度の高いものが多数あり、単にホメオボックス遺伝子によるものではなく、アポトーシス惹起に基づく可能性が疑われた。そこで細胞周期を司るサイクリン (Cyclin) 遺伝子群を測定した結果、肢芽細胞の細胞周期が S 期で停止し G2 期に進行しない DNA 合成阻害状態であることを認めた。すなわち、5-FC はホメオボックス遺伝子に関連して投与のタイミングに従い過剰肋骨または四肢の形成異常を引き起こすが、それがホメオボックスを介した間接的な影響か、もしくは DNA 合成阻害作用の直接的な影響かは不明であった。そこで、細胞傷害性のある 5-FU 投与を陽性対象とし、ラット線維芽細胞由来培養細胞を用い、レサズリンアッセイによる細胞生存性、リアルタイム PCR によるサイクリン遺伝子群の発現変動等を解析し、薬剤誘発性骨格異常の毒性機序を検討することとした。

加えて、自然発生性の過剰肋骨の出現は種差および系統差があることが知られており、その特徴的なものとして SD ラットが短小型として 9.0%、完全型として 3.0%である一方、Wistar hannover; BrIHan:WIST@ (GALAS) (以下、Wistar 系と記述) ではそれぞれ 49.9%、58.1%あり、大きな開きがあることが、わが国の GLP 基準安全性試験実施および受託施設 (計 24 施設) の結果を統合した報告がある (Noritake et al., J.Tox.Sci, 2013 / Ku wagata et al., Cong. Anom., 2018)。そこで本研究では、薬剤誘発性モデルを *in vitro* アッセイにより考察を深めるとともに、自然発生性モデルとしてこれらの系統間でホメオボックス遺伝子の発現に違いがあるかについて、主に DNA シーケンサーを用いた検討を行った。

3. 研究の方法

(1) *in vitro* 実験

国立研究開発法人医薬基盤・健康・栄養研究所 JCRB 細胞バンクよりラット線維芽細胞由来

培養細胞 3Y1 を購入、推奨条件で培養した。まずレサズリンアッセイによる細胞生存率の評価として 96 穴培養プレートに 1×10^4 cell/well となるよう細胞を加え、24 時間前培養した。その後、5-FU、5-FC を最終濃度 0, 0.5, 1, 5, 10, 50, 100, 500, 1000, 5000, 10000 μM となるようそれぞれ加え 37°C でインキュベーション、その 24 時間までの発現変化を測定した。測定は吸光 (570nm、600nm) と蛍光 (Ex:530nm, Em:590nm) の両方を行った。

遺伝子発現解析として、6 穴プレートで 24 時間前培養し、その後、5-FU、5-FC を最終濃度 0.1, 1, 10, 100, 1000 μM となるよう投与し、さらに 24 時間処理した。この検体を PBS(-) で洗浄後、Total RNA を抽出、純度測定および濃度調整した後、逆転写反応により cDNA を得、リアルタイム PCR による遺伝子発現量解析を行った。プライマーは PubMed のシーケンス情報に基づき設計、セルフダイマーやヘアピン構造、繰り返し配列、クロスダイマー等のドライチェック後、NCBI BLAST による遺伝子相同性解析を行い、候補の絞り込みを行った。合成はインビトロジェンカスタムプライマーサービスを用い、カートリッジ精製グレードとして行い、リアルタイム PCR 実施前にアガロース電気泳動によるプライマーチェックを行い、単一のバンドが出現することを確認している。検討遺伝子は *Ccna2*, *Ccnb1*, *Ccnd1*, *Ccne1*, *Pcna1* とした。これらの結果は Dunnett's test による統計解析を行った。

(2) *in vivo* 実験

妊娠 SD ラットは日本チャールズ・リバー株式会社 (CrI:CD(SD))、妊娠 Wistar ラットは日本クレア株式会社 (BrlHan:WIST@Jcl (GALAS)) より購入、妊娠 13.5 日齢で解剖に供し、実体顕微鏡下で胎仔の尾部を得た。飼料及び水は自由摂取とした。切り出した尾部は液体窒素で急冷後、使用時まで -80°C で保存した。動物実験は動物愛護法および文部科学省「研究機関等における動物実験等の実施に関する基本指針」に準拠し、3Rs に従い適切に実験を行い、研究機関の動物実験許可の審査を経て行った。胎仔尾部よりスピнкаラムによる DNA 抽出を行い、純度測定および濃度調整した後、タッチダウン PCR を行った。プライマーは *Hoxa9* および *Hoxa10* のプロモータ領域および全てのエキソンの全領域がカバーされるよう設計した。プライマーは (1) と同様にドライチェックおよび相同性解析を行い絞り込み合成し、予備的に電気泳動を行い単一バンドが出ることを確認し、またシーケンスで読み取れることを予備的に確認した。PCR 産物はスピнкаラムを用いた精製後、濃度調整し凍結下でタカラバイオ・プレミックスシーケンス受託サービスを依頼、その結果を FASTA 形式に変換し CLUSTALW で相同性を解析した。解析領域の決定および興味領域の抽出は米国国立生物工学情報センター NCBI、欧州バイオインフォマティクス研究所 Ensembl、東京大学医科学研究所ヒトゲノム解析センター DBTSS 等の各種データベースおよびツールを用いた。

4. 研究成果

(1) *in vitro* 実験

5-FU 投与群を陽性対象とし、5-FC 投与群の細胞毒性をレサズリンアッセイにより評価したところ、5-FU が 5 μM 程度の低用量域から顕著に、投与濃度依存的に細胞生存率が減少した一方、5-FC では 10000 μM 程度の高用量領域のみ減少したが、陽性対照 5-FU にみられるような低用量領域からの生細胞数減少を認めなかった。すなわち 5-FU は DNA 前駆体の合成阻害の薬理機序通りに直接的に細胞毒性を示す一方、5-FC は真菌細胞内で 5-FU に代謝されはじめて DNA 合成阻害を行うが、*in vitro* では細胞毒性を示さなかったことから、*in vivo* で見出された骨格異常は 5-FC の直接的な細胞毒性に基づくものではないことが推察された。なお、本検討は MTT アッセイと比較検討しより高感度であることから選択し、また蛍光だけでなく吸光測定も行った同様の結果を得ている。

続いて、サイクリン (Cyclin) 遺伝子群および *Pcna* 遺伝子の発現変動をリアルタイム PCR を用いて解析した。サイクリンは細胞周期の進行や停止に関与するタンパク質で 11 種類の分子種からなり、サイクリン A は S 期から M 期、サイクリン B は G2 期から M 期、サイクリン D および E は G1 期から S 期にわたってのチェックポイントを示すマーカーである。また、サイクリンの量的変化が細胞周期の正常な進行に必須である (Mansilla et al., Genes, 2020)。*Pcna1* は細胞増殖に関与し、S 期の核内で発現する。5-FU 投与ではサイクリン D 以外の検討遺伝子が投与濃度依存的に有意に減少していたことから、5-FU では S \rightarrow G2, G2 \rightarrow M, M \rightarrow G1 の細胞周期の各チェックポイントを阻害しており、レサズリンアッセイでみられた生細胞数減少の結果と一致することが示唆された。*Pcna* の結果もまた、このことを支持している。一方、5-FC ではこのような変化は認められず、レサズリンアッセイの結果と同様、培養細胞では細胞毒性を示さないことが示された。

以前の *in vivo* 実験では 5-FC 胎仔期投与が早期 (G9) では *Hox10* 変動とともに過剰肋骨を呈していたが、より後期 (G13) では *Hox11-13* 変動とともに四肢の形成異常を呈するがその影響は重篤であり、また同時にサイクリン遺伝子群の変動も引き起こしていたことから、5-FC の毒性機序はホメオボックスを介したものであるのかアポトーシス誘導によるものであるのか課題が残っていた。今回の *in vitro* 実験では、陽性対照 5-FU 投与では細胞数減少とサイクリン異常を示す一方、5-FC 投与では 5-FU にみられるような顕著な影響を認めなかったことから、*in vivo* 実

験でみられた 5-FC の毒性機序はおそらく直接的なアポトーシス誘導によるものではないと考えられ、5-FC 誘発性の過剰肋骨に関しては、ホメオボックスによる一連の体軸骨格異常の一表現型であり、その投与のタイミングが重要であること、過剰肋骨は臨床的有害性は低いものの一連の体軸骨格異常には重篤な四肢形成異常が含まれ注意を要することが考察された。

(2) *in vivo* 実験

続いて、自然発生性の過剰肋骨の系統差に着目した *in vivo* 実験を行った。まず *Hoxa10* は 2 箇所、*Hoxa9* は 3 箇所のエクソンがあり、その全領域およびプロモーター部位をカバーするプレミックスシーケンス用プライマーを作成した。各系統より得られたデータを欧州バイオインフォマティクス研究所が提供しているアライメントツール CLUSTALW による相同性解析を行い、対象領域の塩基の変異率(%)を SD 系と Wistar 系それぞれで求め比較検討した。その結果、*Hoxa10* のプロモーター領域およびエクソン 1, 2、*Hoxa9* のエクソン 2, 3 に大きな系統差は認められなかった一方、*Hoxa9* のエクソン 1 の一部に差を認め、最も顕著なものに 5'末端後方 117 位置に存在する T<C(本来はチミンがシトシンに変異している)が SD 系の 5%に対して Wistar 系で 27.3% (5.5 倍増) が挙げられる。さらに、変異はエクソン前方においても見出され、特に注目すべき点として、*Hoxa9* エクソン 1 開始点前方 47-48-49 位置の GTT<TGA の変異が SD 系 10%に対し Wistar 系 45%の顕著な発現比変動を示していた。この領域は、マイクロ RNA(miRNA)の一種である miRNA196b である。

miRNA196b は肋骨形成に直接関与する *Hox9* を含め、*Hox7-9* の複数の *Hox* 遺伝子の発現を抑制させることで、本来あるべき中軸骨格形成における各 *Hox* 遺伝子の濃度勾配を形成し、予定領域外での骨格形成を抑制する miRNA として知られている (Wong et al, PNAS, 2015)。このマイクロ RNA はマウスやラットだけでなくヒトを含む脊椎動物で高く保存されているが、例外的にショウジョウバエで確認されている mir-iab-4 のような類似遺伝子はあるものの、脊椎動物以外には miRNA196b に相同する遺伝子は発見されておらず、脊椎動物の体節構造を特徴付ける遺伝子であるとされている (Garaulet et al, Mech Dev, 2015)。実際、ゼブラフィッシュの実験では miRNA196 のノックアウトでは椎骨数の増加とともに過剰肋骨を呈し、過剰発現では椎骨数を減少させること (He et al., Dev Biol, 2011)、miRNA196 のノックアウトはまたニワトリでは頸肋を生じさせること (McGlenn et al., PNAS, 2009)、マウスでは *Hoxb8* や *Shh* の発現変動を介し四肢の発達に影響することが報告されている (Hornstein et al, Nature, 2005)。*Hoxb7* もまたその変異により高率で肋骨欠損が出現することがマウスで報告されている (Chen et al, Mech Dev, 1998)。

また変異を認めた位置は、miRNA196b のオーバーハングと呼ばれる miRNA の成熟に直接的に関わる領域であった。すなわち、成熟 miRNA はおおよそ 22~25 塩基で構成され、そのうちの seed 配列を中心にターゲットとする mRNA を認識し、切断もしくは翻訳を停止することで抑制的に作用するが、配列中の miRNA が直接作用するのではなく、その前駆体として Pri-miRNA、Pre-miRNA などの中間生成物を経由し、Pri-miRNA から Pre-miRNA には Droscha、Pre-miRNA から成熟 miRNA には Dicer といった RNase III タイプの酵素を要する。これらはターゲット部のヌクレオチドを認識し切断するが、その位置決定に関しては 3'側のヘアピン構造からはみ出した 2ヌクレオチド (2nt) を必要であり、それをオーバーハングと呼ぶ (Han et al., Cell, 2006 / Fransia et al., Nature, 2012)。なお、転写因子結合部位を予測する JASPAR による解析では、この領域は HLH(Helix-Loop-Helix)に関連するものであり、miRNA のステムループ部位であることが示されている。

そこで、miR196b が制御し、かつ過剰肋骨との関連が考えられる *Hoxa7, b7, b8, c8, d8* の発現量をリアルタイム PCR で測定、Wistar 系の当該領域が未変化であった群 (Normal) と変異のあった群 (Variant) に分けて解析したところ、全ての検討遺伝子群で増加する結果が得られた。

これらより考察されることとして、オーバーハング構造の変化により Droscha や Dicer が Pre-miRNA あるいは Pri-miRNA の構造を認識することが困難となり、*Hox* 遺伝子群に対し抑制的に働き正常な骨格形成に寄与している miRNA196b の成熟が不十分となり、正常な椎骨形成もしくは本来形成されるであろう正常な椎骨数のカウントができず、結果として肋骨が過剰に生じる結果になった可能性が考えられる。そのことから、今後の検討課題として成熟 miRNA およびその発現機構の系統差が挙げられる。

以上をまとめ総括すると、まず薬剤誘発性過剰肋骨は **Hoxa10** 発現の後方化により既定の位置で椎骨の胸椎化を抑制できず、またその作用は薬剤の直接的な傷害の結果としての **Hox** 発現変動というより **Hox** 変動の結果としての構造変化であることが予見され、また自然発生性の過剰肋骨は **Hoxa10** に対し明確な要因を見出すことはできなかったものの、**Hoxa9** のエキソンの一部、あるいは **Hoxa9** と **Hoxa10** の間に存在する **miRNA196b** の塩基配列に大きな系統差を確認することができた。特に **miRNA196b** の変異そのものが、あるいは関連する **Hox** 遺伝子群の増加を介し、連続的に進行する中軸骨格形成の後方化の阻害すなわち過剰肋骨を呈する方向となり系統差が生じる一機序と推察された。いずれのケースもホメオボックス遺伝子群の変化を起点とし、頸肋や体節数増加の結果としての過剰肋骨、あるいは四肢形成など多様な構造変化の一表現型として過剰肋骨は位置づけられると想定される。

以上、本研究で過剰肋骨発生の機序の一端を明らかにすることができ、より精密な医薬品・化学物質のリスク評価に有用な結果を得ることができた。ホメオボックス遺伝子および **miRNA196b** は催奇形性のバイオマーカーとしても有用であると推察される。今後、**miRNA196b** を中心とした過剰肋骨の発生機序解析を行うことで、薬害の防止を含め、医薬品・化学物質の安全性評価の向上に貢献することを目指したい。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計1件（うち査読付論文 1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 Takayuki Kumamoto, Mika Senuma, Mai Todoroki, Fumiaki Kumagai, Hajime Imai, Reiko Suzuki, Tetsuo Ogawa, Makiko Kuwagata | 4. 巻 7(2) |
| 2. 論文標題 5-Fluorocytosine induces fetal skeletal malformations in rats by altering expression of Homeobox genes | 5. 発行年 2020年 |
| 3. 雑誌名 Fundam. Tox. Sci. | 6. 最初と最後の頁 97-103 |
| 掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.2131/fts.7.97 | 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3件（うち招待講演 0件/うち国際学会 0件）

| |
|--|
| 1. 発表者名 熊本隆之、米山紗央梨、橋本和樹、小川哲郎、桑形麻樹子 |
| 2. 発表標題 フルシトシンによる骨格異常の機序検討：培養細胞を用いた評価 |
| 3. 学会等名 第60回日本先天異常学会学術集会 |
| 4. 発表年 2020年 |

| |
|---------------------------------|
| 1. 発表者名 熊本隆之、橋本和樹、小川哲郎、桑形麻樹子 |
| 2. 発表標題 系統差に着目した過剰肋骨の遺伝学的解析 |
| 3. 学会等名 第48回 日本毒性学会学術年会 |
| 4. 発表年 2021年 |

| |
|--|
| 1. 発表者名 熊本隆之、橋本和樹、小川哲郎、桑形麻樹子 |
| 2. 発表標題 系統差に着目した過剰肋骨のホメオボックス遺伝子を中心とした遺伝学的解析 |
| 3. 学会等名 第61回 日本先天異常学会学術集会 |
| 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 |
|--|---------------------------|-----------------------|----|
|--|---------------------------|-----------------------|----|

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 |
|---------|---------|
|---------|---------|