

令和 6 年 6 月 7 日現在

機関番号：32607

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2021～2023

課題番号：21K05960

研究課題名(和文)ゾウの発癌防御機構の解明

研究課題名(英文)Elucidation of cancer resistance mechanisms in elephants

研究代表者

折野 宏一 (Orino, Koichi)

北里大学・獣医学部・教授

研究者番号：60214235

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)：癌になりにくい動物種として、ハダカデバネズミ、メクラネズミ、ゾウ、クジラなどが報告されているが、本研究では細胞の癌化防御機構が不明なゾウに注目して研究を行い、ゾウの発癌防御機構を解明し、この知識を最終的に獣医療や医療へ応用することを目的とした。すなわち、本研究計画では正常なゾウ繊維芽細胞を癌化させて、不死化細胞を作出することを試みることで、および、ゾウ独自に進化したと考えられる染色体安定性機構の中で、最も進化速度が速い遺伝子であるDNA損傷修復タンパク質FANCLとFANCLが関わるDNA損傷修復経路のFanconi/BRCA経路の機能解析を行った。

研究成果の学術的意義や社会的意義

癌研究は、培養細胞ならヒトやマウスの細胞株、実験動物ならマウスを使った研究が盛んに行われてきた。これらの研究は、癌がどのように発症するのかを解明することに多大な貢献をしてきた。近年、分子細胞学的手技の発展により、一般的なモデル生物ではない癌になりにくい動物種が発癌防御機構を解析するのに有用であることが示唆されるようになってきた。癌になりにくい動物種として、ハダカデバネズミ、メクラネズミ、ゾウ、クジラなどが報告されているが、本研究では細胞の癌化防御機構が不明なゾウに注目して研究を行い、ゾウの発癌防御機構を解明し、この知識を最終的に獣医療や医療へ応用することを目的とした。

研究成果の概要(英文)：Some animals, such as the naked mole rats, blind mole rats, elephants and the whales have been reported as cancer resistant animals. In this study, we focused on the elephants, whose cellular resistant mechanisms against tumorigenesis are unknown, with the aim of elucidating its mechanisms. This research aims to (1) attempt to generate immortalized cells by expressing the T antigen of african elephant polyomavirus in normal elephant fibroblasts, and (2) investigate the one of DNA damage repair protein FANCL, the most acerated region in the elephants' genome, and the Fanconi/BRCA DNA damage repair pathway, in which FANCL is involved.

研究分野：獣医生化学

キーワード：ゾウ 発癌防御機構 FANCL FANCB Fanconi/BRCA経路 DNA損傷修復 Fanconi anemia 繊維芽細胞

1. 研究開始当初の背景

癌研究はマウス、ラットやウサギをモデルとした動物実験により多くの事が解明されてきた。古典的には化学発癌に始まり、ノックアウトマウスやトランスジェニックマウスなど遺伝子改変マウスの研究が盛んにされている。マウスは既に遺伝子改変の技術が確立されており、ライフサイクルが短い動物種であるので、癌研究の実施に利点が多く、癌の発生機序の解明に大きな貢献をしている。マウスはヒトと比較すると少ない遺伝子の変異で癌を発症しやすく、癌の発生機序の解明にはメリットが多い。しかしながら、逆にマウスは癌を発症しすぎるので、どのように生物が癌になることを防御しているかを真に明らかにすることはマウスをモデルとすると難しい。そこで近年、異なるアプローチによる癌研究への挑戦が報告され始めている。それは、癌を発症しにくい動物種がどのように発癌を防いでいるのか解明することで、それぞれの動物種でユニークな発癌防御機構を明らかにしようというアプローチである。癌を発症しにくい哺乳動物として、ハダカデバネズミ、メクラネズミ、ゾウ、クジラなどが報告されている。これらの哺乳動物の発癌防御機構の一部は報告されているが、一般的な実験動物ではないので研究の数も少なく、どのように癌発症を防いでいるのかの全貌は未だ解明されていない。本研究では、上記の癌になりにくい哺乳動物の中で、ヒトと同程度の寿命を持つにもかかわらず癌を発症しにくいゾウに注目して研究することにした。

現在までのところ、ゾウはヒト等では 1 組しかコピーが存在しない癌抑制遺伝子 *TP53* のコピー数を増加させ、18 組もコピーを持つことが報告されている。このことはゾウ細胞において癌化の原因となる DNA 二本鎖切断が生じた後の速やかなアポトーシスに貢献していると考えられている (JAMA, Cell reports)。さらに近年の次世代シーケンサーの技術革新により、進化の過程で進化速度が加速している領域、すなわち個々の動物種に特有な進化をもちに必要とする遺伝子領域として、ゾウでは染色体の安定性に関わる遺伝子領域の進化速度が速まっていることが報告された (Cell reports)。このことは p53 によるアポトーシスとは別にゾウにおいて DNA 損傷修復経路や DNA 複製機構に進化的な特徴が存在する事を示唆している。ゾウにおける最も進化速度が速い領域は、FANCL という DNA 損傷修復に関わるユビキチンリガーゼをコードする領域であることも報告され、アポトーシス以外の発癌防御機構として FANCL が関わる DNA 損傷修復経路が関与している可能性が示唆された。しかしながら、ゾウの FANCL の機能が実際に異なるのか、それともゾウ FANCL の発現パターンが異なるかなど詳しい機構は不明である。

2. 研究の目的

研究開始当初の背景で述べたようにゾウの発癌防御機構の一部は解明されつつあるが、ほとんどのことが不明である。すなわち、“ゾウはどのように癌を防いでいるのか?”は未だよくわかっていない。そこで、本研究では、“ゾウはどのように癌を防いでいるのか?”という疑問に答え、そこから得られたユニークな発癌防御機構に関わる知識を最終的に獣医療や医療への応用を目指すことを目的とした。この目的を達成するために以下に示す二つのテーマを解明する。一つ目に正常なゾウ繊維芽細胞を癌化させて、元の正常な線維芽細胞と比較することで、ゾウの癌化に必要な遺伝子、タンパク質を特定する。二つ目に進化的に発癌防御機構として独自に進化してきていると考えられる DNA 損傷修復機構の中で、最も進化速度が速い遺伝子である DNA 損傷修復タンパク質 FANCL と FANCL が関わる DNA 損傷修復経路の Fanconi/BRCA 経路の機能解析を行う。ゾウにおいて Fanconi/BRCA 経路がヒトよりも効率的に損傷修復を行うことで癌になることを防御している事が考えられるので、ヒト細胞との比較も行う。

3. 研究の方法

1) ゾウ線維芽細胞の不死化

ゾウ線維芽細胞の不死は、当初 SV40 の Large T 抗原を用いて、挑戦していたが、不死化しなかったため、ゾウポリオーマウイルスの T 抗原の発現ベクターを分与いただき、これを用いて不死化細胞の樹立を目指した。

2) 鎖間架橋剤に対する感受性解析

ゾウとヒト線維芽細胞における鎖間架橋剤に対する感受性をコロニー形成法や Cell counting kit-8 により解析した。

3) ゾウ FANCL の解析

ゾウ FANCL の機能解析の一環として、相互作用する事が知られている FANCB との相互作用を mammalian two-hybrid assay により解析した。

ゾウとヒト線維芽細胞を用いて、鎖間架橋剤処理後の FANCD2 のモノユビキチン化等の応答反応をウエスタンブロットングにより解析した。

4. 研究成果

1) ゾウ線維芽細胞の不死化

ゾウ線維芽細胞は20継代程度で細胞老化を起し、増殖しなくなる。SV40 の Large T 抗原からゾウポリオーマウイルスの T 抗原に切り替え、さらに共同研究者のアドバイスをもらうことで40継代以上、培養する事ができた。また、完全に不死化できたとはいえないので、今後継代数をより重ねていく予定である。

2) 鎖間架橋剤に対する感受性解析

ゾウ FANCL の解析を行う前にゾウとヒト線維芽細胞との間で鎖間架橋剤に対する感受性を調べた。その結果、DNA 二本鎖切断を誘発する試薬に対する感受性はゾウとヒト線維芽細胞間で有意な差は見られなかったが、鎖間架橋を誘導する試薬に対しては、ゾウ線維芽細胞の方が感受性が高いことが分かった。

3) ゾウ FANCL の解析

FANCL と FANCB との相互作用をヒトとゾウとの間で調べた。その結果、ゾウ FANCL はヒト FANCB よりゾウ FANCB との相互作用が強く、ゾウ FANCB はヒト FANCL よりゾウ FANCL との相互作用が強くなった。さらにゾウ FANCL-ゾウ FANCB の相互作用の強さは、ヒト FANCL-ヒト FANCB より強いことが分かった。すなわち、この相互作用はゾウ FANCL とゾウ FANCB のそれぞれが貢献していることが示唆された。FANCL-FANCB の結合サイトのアミノ酸配列をゾウとヒトとで比較すると異なるアミノ酸配列が存在し、これが相互作用に関係している事が推察された。

ゾウとヒト線維芽細胞において鎖間架橋剤処理後の応答反応を解析した。面白いことにゾウ線維芽細胞の方が応答が遅いことが示唆された。どのようなメカニズムで応答が遅くなるかを今後解析する予定であるが、FANCL と FANCB の相互作用の強さも関係していると考えている。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔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 日置七海, 北野泰佑, 朱子達, 武田一貴, 折野宏一, 吉川泰永
2. 発表標題 ゾウFANCL-FANCB間の相互作用はヒトホモログより強い
3. 学会等名 第166回日本獣医学会学術集会
4. 発表年 2023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	吉川 泰永 (Yoshikawa Yasunaga) (00552043)	北里大学・獣医学部・准教授 (32607)	

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