

平成 30 年 5 月 2 日現在

機関番号：13901

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2014～2017

課題番号：26430088

研究課題名(和文) マウス体系的遺伝解析系を用いたウレタン誘発肺腫瘍感受性の遺伝的解析

研究課題名(英文) Systematic genetic analysis for urethane-induced lung cancer susceptibility loci in mice

研究代表者

大野 民生 (Ohno, Tamio)

名古屋大学・医学系研究科・准教授

研究者番号：90293620

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,000,000円

研究成果の概要(和文)：SMXA・RI系統群の解析でマップされた2つの肺腫瘍感受性遺伝子座Par1(Chr.11)とPar3(Chr.12)の存在は、マップ領域を導入したコンジェニック系統では確認できなかった。そのため、Chr.11コンジェニック系統群で肺腫瘍感受性遺伝子座を再解析した結果、先のマップ領域とは異なりChr.11の27.7～36.4Mb内に目的の遺伝子座の存在が示唆された。ここにはヒトの肺腫瘍発症への関与が報告されているMpg遺伝子が存在しており、A/J系統のMpg遺伝子内の5つのアミノ酸置換を伴う変異のうち特にp.Ala132Ser変異がウレタン誘発肺腫瘍感受性の有力な原因であると考えられた。

研究成果の概要(英文)：QTL analysis using SMXA・RI strains revealed plumonary adenoma resistance locus 1 (Par1) on Chr.11 and Par3 on Chr.12. However, it could not be confirmed the existence and effects of these loci by using congenic strains developed in this study. We conducted re-mapping by the Chr. 11 congenic strains, and indicated that the other Par locus was located between 27.72Mb and 36.39Mb. The Mpg gene, which encodes a ubiquitous DNA repair enzyme associated with lung cancer, is located within this region. A Sanger sequence analysis of the Mpg gene revealed five polymorphic sites in the A/J genome. One variant, p.Ala132Ser, was suggested the strong candidate mutation with regard to susceptibility to urethan-induced lung cancer.

研究分野：実験動物学

キーワード：マウス 体系的遺伝解析系 コンソミック系統 コンジェニック系統 ウレタン誘発肺腫瘍 肺腫瘍感受性遺伝子

1. 研究開始当初の背景

(1) 特定の2系統を起源とするRI系統群やコンソミック系統群等のマウスの体系的遺伝解析系は、複雑な多因子遺伝形質の遺伝解析に極めて有効である (*Nat Genet*, 37:233-242, 2005, *Science*, 304:445-448, 2004)。我々は、マウスSM/J系統とA/J系統を起源として作出されたSMXA・RI系統群を利用して、環境因子と多数の遺伝因子が複雑に絡み合って発症する多因子遺伝形質の遺伝解析を行ってきた (*Diabetes*, 52:180-186, 2003, *Diabetologia*, 49:486-495, 2006, *Biosci Biotechnol Biochem*, 70: 677-683, 2006, *J Lipid Res*, 48:2039-2046, 2007, *Immunogenetics*, 65:17-24, 2013)。RI系統群は精度の高いQTL解析が可能であるという長所を有するが、樹立した系統からの系統改変が難しいという短所を持つ。一方、コンソミック系統群ではQTL解析はできないが、コンジェニック系統の作出等の系統改変が容易であるという長所を有する。そこで、同じ系統を起源とするRI系統群とコンソミック系統群を樹立して両者を組み合わせれば、両系統群の短所をカバーして極めて効果的かつ体系的な遺伝解析が可能であると発想し、A/J系統の任意の染色体をSM/J系統の染色体に置換したコンソミック系統群を樹立した (*Mamm Genome*, 23:764-769, 2012)。実際、我々はこのコンソミック系統群とSMXA・RI系統群とを組み合わせることで糖尿病や脂質代謝異常等の解析に応用し成果を上げてきた (*Physiol Genomics*, 35:65-74, 2008, *Exp Anim*, 58: 357-361, 2009, *J Lipid Res*, 51: 3463-3469, 2010)。

(2) 肺癌は毎年100万人以上の死者を出し全癌死亡数の18%を占める致死性の高い癌である。その発症には環境要因と遺伝要因が複雑に絡み合っており、発症機構の解明にはマウスを用いた解析は大変有効である。マウスA/J系統は肺腫瘍を高頻度に自然発症するうえ、ウレタンや煙草煙等の化学物質により早期に肺腫瘍を発症することから、肺腫瘍のモデル動物として汎用され続けている (*Toxicology*, 305:49-64, 2013.)。これまでに、A/J系統を用いた解析で複数のウレタン誘発肺腫瘍感受性遺伝子座 (*Pas1-3*, *Par1-3*) がマップされ、そのうち最も表現型への寄与率が高いとされる *Pas1* については *Kras* 遺伝子が極めて有力な候補とされている (*Nat Genet*, 38:888-895, 2006, *PLoS Genet*, 10:e1004307, 2014) が、その他の遺伝子座については解析が進んでいない。上述のSMXA・RI系統群は、肺腫瘍感受性遺伝子の解析を目的として肺腫瘍抵抗性のSM/J系統と感受性のA/J系統を起源として作出された経緯があるが、抵抗性のSM/J系統由来の2遺伝子座 (*Par1*, *Par3*) がA/J系統の肺腫瘍発生を抑制するとの報告 (*Cancer Res*, 57:2904-2908, 1997)以降、全く解析されていない。

2. 研究の目的

A/J系統は肺腫瘍のモデル動物として汎用されているが、その原因遺伝子は未だ明らかにされていない。その原因として、肺腫瘍は個々の作用がそれ程大きくない複数の遺伝子座が組み合わさり発症するため、従来から実施されてきた交配群を用いた単純な連鎖解析では原因遺伝子の同定が困難であるためと考えられる。そこで本研究では、肺腫瘍抵抗性のSM/J系統と感受性のA/J系統を起源とし我々が独自に開発してきた体系的遺伝解析系を駆使して、A/J系統の肺腫瘍感受性の原因となる遺伝的変異の同定とその作用の検証を行い、肺腫瘍の発症機構を規定する分子機構の一端を解明する事を目的とした。

3. 研究の方法

(1) 本研究に使用したマウスは名古屋大学大学院医学系研究科実験動物部門のSPF飼育室(温度:23℃, 湿度:55%, 照明:12L12D)で飼育した。A/J系統については日本SLC社から購入して使用した。それ以外のコンソミック系統等は我々が独自に樹立し維持している系統を使用した。本研究は名古屋大学医学系研究科動物実験委員会の承認下で実施した。

(2) SMXA・RI系統群を用いたQTL解析は、我々が作製・整備した遺伝情報(SDP:strain Distribution Pattern)と各RI系統のウレタン誘発肺腫瘍数との連鎖関係を解析ソフト(MapManager QTX)により実施した。ゲノム変異の特定は、以前に実施したエキソーム解析のデータから候補変異を抽出した後に、重要と思われる変異箇所についてサンガー法により再解析し、マウスのゲノムデータベース(GRCm38)で比較・確認した。

(3) 解析に使用したコンジェニック系統は、我々が樹立したコンソミック系統をA/J系統に戻し交配してSM/J系統由来の染色体領域を断片化させた個体のうち目的の遺伝子座 (*Par1*, *Par3*, *Pas1*) 領域をもつ個体を起源として樹立した。樹立したコンジェニック系統を更に交配する事で、複数の遺伝子座を導入したコンジェニック系統等を樹立した。

(4) ウレタンによる肺腫瘍の誘発方法と肺腫瘍数の測定は既報 (*Cancer Res*, 75:2904-2908, 1997)に従って実施した。ウレタンは生理食塩水で溶解し0.45g/kgBWの割合で4週齢の雄マウスの腹腔内に投与した。ウレタン投与から5ヶ月後に、マウスを安楽殺してから肺を摘出し、プアン液で1晩固定した肺を実体顕微鏡下で観察して肺表面の肺腫瘍数を測定した。

4. 研究成果

(1) 上述のように A/J 系統のウレタン誘発肺腫瘍感受性遺伝子座として Chr.6 に *Pas1* がマップされており、その原因遺伝子として *Kras* 遺伝子が示唆されている。一方で、A/J 系統と SM/J 系統を起源として樹立された肺腫瘍抵抗性の SMXA24 系統と A/J 系統との交配群を用いた連鎖解析から Chr.11 に *Par1* 遺伝子座が Chr.12 には *Par3* 遺伝子座がマップされている (*Cancer Res*, 75:2904-2908, 1997) が、何れもマップ領域が広く原因遺伝子同定には存在領域を更に限局する必要がある。そこで、SMXA・RI 系統群の詳細な遺伝情報 (SDP) と既に報告されている各 SMXA・RI 系統のウレタン誘発肺腫瘍感受性のデータ (*Cancer Res*, 75:2904-2908, 1997) を利用して、SMXA・RI 系統群を用いたウレタン誘発肺腫瘍感受性遺伝子座の再マッピングを実施した。その結果、いずれも Suggestive Level であったが 4 つの遺伝子座が検出でき、それらのうち 3 つ (*Pas1*, *Par1*, *Par2*(Chr.18)) は既に報告されている遺伝子座と一致していた。ただし、*Par3* 遺伝子座については既報より 10~20Mb テロメア側にマップされた。既報のデータを詳細に確認したところ、そこで使用された一部の遺伝マーカー (*D12Mit7*) の位置情報が間違っていた事が判明し、*Par3* については本解析で正確な位置が特定できたと考えられた。これら 4 力所の遺伝子座のうち 3 力所 (*Pas1*, *Par1*, *Par3*) は今回の解析を含め A/J 系統と SM/J 系統に関連する別の解析でも検出された事から、肺腫瘍感受性に直接的に寄与する有力な遺伝子座であると考えられた。ただし、*Pas1* については以前から他のグループが解析を進めているため、本研究では特に *Par1* と *Par3* に着目し、本解析で明らかになった位置情報に基づいてコンジェニック系統を作製し、各遺伝子座の効果や遺伝子座間の相互作用を検証した。

(2) (1) の解析で判明した *Par1* と *Par3* 遺伝子座における肺腫瘍感受性に関与する候補遺伝子変異を見出すことを目的として、以前に実施した A/J 系統と SM/J 系統のエキソーム解析のデータから、両遺伝子座周辺の変異のうち肺腫瘍感受性への関与が示唆される遺伝子を抽出し解析を行った。その結果、*Par1* 遺伝子座については、肺で発現が高く肺腫瘍への関与が報告されている (*J Clin Pathol*, 60:608-614, 2007) *Itga3* (integrin alpha 3) 遺伝子において、A/J 系統に複数のアミノ酸置換が検出された。一方、*Par3* 遺伝子座については、気道上皮細胞での発現が高い *Golga5* (golgi autoantigen, golgin subfamily a, 5) 遺伝子において A/J 系統に複数のアミノ酸置換を伴う変異が検出された。以降のコンジェニック系統を用いた解析で各遺伝子座の肺腫瘍感受性への関与が確認できれば、これらの変異箇所は肺腫瘍感受性に関与する有力な候補遺伝子変異になると考えられた。

(3) *Par1* と *Par3* の両遺伝子座については、(1) で実施した SMXA・RI 系統群を用いたウレタン誘発肺腫瘍感受性遺伝子座の再マッピングにおいても、既報での解析においても何れも単独で肺腫瘍感受性に寄与する事が示唆されている。そこで、肺腫瘍感受性の A/J 系統に肺腫瘍抵抗性の SM/J 系統由来の *Par1* 領域と *Par3* 領域が導入された系統 (A.SM-*Par1*, A.SM-*Par3*) を樹立し、ウレタン誘発肺腫瘍感受性を調査した。しかし、両系統とも対照群の A/J 系統と比較して明確な肺腫瘍感受性の違いは全く認められず (表 1)、両遺伝子座は共に単独では肺腫瘍感受性に関与しないと考えられた。そのため、両遺伝子座が組み合わさると相互作用により効果が発揮されると推定し、両遺伝子座を同時に有するダブルコンジェニック系統 (A.SM-*Par1*, *Par3*) を樹立しウレタン誘発肺腫瘍感受性を調査したが、A/J 系統と比較して肺腫瘍感受性の違いは認められなかった (表 1)。そこで更に、両遺伝子座は抵抗性の *Pas1* 遺伝子座の存在下で効果を発揮する遺伝子座であると考え、3 つの遺伝子座を全て有するトリプルコンジェニック系統 (A.SM-*Pas1*, *Par1*, *Par3*) を樹立しウレタン誘発肺腫瘍感受性を調査した。このトリプルコンジェニック系統は A/J 系統に対しては顕著に肺腫瘍数が減少したが、対照系統として使用した A/J 系統の遺伝背景に SM/J 系統由来の *Pas1* 遺伝子座を有する A/J-6SM 系統との間には肺腫瘍数に違いが認められなかった (表 1)。したがって、トリプルコンジェニック系統での肺腫瘍数の減少は *Pas1* 遺伝子座の作用によるものと考えられた。以上のようにコンジェニック系統を用いた詳細な解析を実施したにもかかわらず、*Par1* と *Par3* の両遺伝子座については単独での肺腫瘍感受性への効果のみならず、複数の遺伝子座を組み合わせても肺腫瘍感受性への効果を確認することができなかった。即ち、*Par1* と *Par3* 遺伝子座は A/J 系統と SM/J 系統に関連する別の解析でも検出されたにもかかわらず、その存在自体が疑われる (寧ろ否定的である) という全く想定しない結果となった。ただし、*Pas1* 遺伝子座は肺腫瘍感受性に対して単独で顕著な効果を発揮する事が判明した。

表1 A/J系統を遺伝背景とした系統のウレタン誘発肺腫瘍感受性の比較

系統名	n	平均肺腫瘍数(範囲)
A/J	12	23.7 (15 - 33)
A.SM- <i>Par1</i>	12	24.3 (16 - 28)
A.SM- <i>Par3</i>	14	22.8 (15 - 30)
A.SM- <i>Par1</i> , <i>Par3</i>	24	24.6 (17 - 31)
A.SM- <i>Pas1</i> , <i>Par1</i> , <i>Par3</i>	15	6.4* (2 - 20)
A/J-6 SM	16	7.1* (1 - 16)

(4)(3)での予想外の結果を受けて、*Par1*と*Par3* 遺伝子座の存在については再検証が必要と考えられた。両遺伝子座が存在する染色体全体を導入した2種のコンソミック系統(A/J-11SM, A/J-12SM)のウレタン誘発肺腫瘍感受性を調査した結果、A/J-12SM 系統の肺腫瘍感受性はA/J系統と同様でありChr.12には単独で効果を発揮する肺腫瘍感受性遺伝子座が存在する可能性は極めて低いと考えられた。一方、解析個体数が少ないがA/J-11SM 系統についてはA/J系統より肺腫瘍数が低下する傾向があることから、Chr.11には当初の解析結果とは異なる領域に肺腫瘍感受性遺伝子座が存在する可能性が示唆された。また、肺腫瘍抵抗性のB6J系統に感受性のA/J系統の染色体を導入したコンソミック系統群を用いた解析でも、Chr.11を導入したコンソミック系統では肺腫瘍数、肺腫瘍のサイズが増加することが報告されており(*Int J Cancer*, 126:125-132, 2010)、A/J系統のChr.11には有力な肺腫瘍感受性遺伝子座が存在する可能性が高いと考えられた。そのため、以降はChr.11に存在するウレタン誘発肺腫瘍感受性遺伝子座の原因遺伝子の同定に絞り解析を実施する事にした。我々はA/J-11SMを起源としてそこに導入されているSM/J由来の染色体領域を断片化させたChr.11コンジェニック系統群を樹立している(*Mamm Genome*, 29:273-280, 2018)ことから、この系統群を用いて肺腫瘍感受性遺伝子座の存在領域を再解析したところ、A.SM-Chr11K系統の肺腫瘍数はA/J系統に対して有意に低下したがA.SM-Chr11B系統の肺腫瘍数はA/J系統と同程度であった。したがって、両系統に導入されているSM/J系統由来の染色体領域と両系統の肺腫瘍感受性の比較から、Chr.11のD11Mit163~D11Mit51の8.67Mbの領域内にウレタン誘発肺腫瘍感受性遺伝子座が存在する事が明らかになった(図1)。

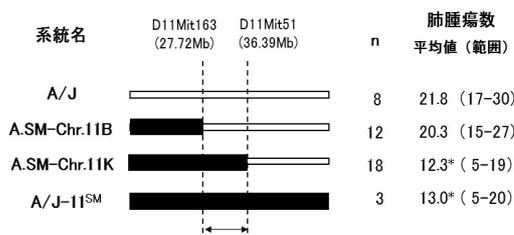


図1 Chr.11の肺腫瘍に関する遺伝子座の存在領域 *:P<0.05 vs A/J
 ■ :SM/J由来の領域 ○ :A/J由来の領域

(5)(4)の解析で判明したウレタン誘発肺腫瘍感受性遺伝子座の存在領域にはDNA修復酵素の一種である*Mpg*(N-methylpurine DNA glycosylase)遺伝子座が存在している。この遺伝子についてはヒトで肺腫瘍感受性に関与している事が報告されており(*Mutat Res*, 732:43-46, 2012, *J Natl Cancer Inst*, 104:1765-1769, 2012, *Carcinogenesis*, 35:2763-2770, 2014)、有力な候補遺伝子で

表2 A/JとSM/J系統間での*Mpg*遺伝子とMPG蛋白の違い

塩基番号 (bp)	エクソン番号	アミノ酸番号	アミノ酸残基	
			SM/J	A/J
32,226,580	1	14	Ser	Ala
32,226,679	1	47	Val	Leu
32,227,831	2	86	Ser	Leu
32,229,867 - 32,229,868	3	132	Ala	Ser
32,231,819 - 32,231,821	4	276	Val	-

あると考えられた。一方、我々は本研究とは別に膵β細胞を破壊して糖尿病を誘発させる薬剤であるストレプトゾトシンの感受性に関与する遺伝子としても、この*Mpg*遺伝子に着目している。そこで、A/J系統の*Mpg*遺伝子の塩基配列を詳細に解析したところアミノ酸置換を含む5カ所の変異を見出した(表2)(*Mamm Genome*, 29:273-280, 2018)。MPGの酵素活性は101~315番目のアミノ酸残基が必須である事(*Biochemistry*, 37:580-589, 1998)、種間でのアミノ酸配列が高度に保存されているのは118~194番目のアミノ酸残基であることから、*Mpg*遺伝子変異のうちp.Ala132SerがMPGの機能に大きな影響を与える可能性があると考えられた。更に、*Mpg*遺伝子の予備的な発現解析では、ウレタン誘発肺腫瘍感受性のA/J系統と抵抗性のA.SM-Chr11K系統間で明確な発現量の違いは認められなかった。したがって、*Mpg*遺伝子のアミノ酸置換(p.Ala132Ser)がウレタン誘発肺腫瘍の有力な候補遺伝子変異であると考えられた。現在、A/J系統のこの部位を正常型に置換したノックインマウスを作製中であり、このマウスのウレタン誘発肺腫瘍数がA/J系統より明確に減少すれば、この変異がChr.11に存在するウレタン誘発肺腫瘍感受性の原因遺伝子変異であると証明できると考えられる。

5. 主な発表論文等 (研究代表者は下線)

〔雑誌論文〕(計 1件)

Maegawa T, Miyasaka Y, Kobayashi M, Babaya N, Ikegami H, Horio F, Takahashi M, Ohno T: Congenic Mapping and Candidate Gene Analysis for Streptozotocin-Induced Diabetes Susceptibility Locus on Mouse Chromosome 11. *Mamm Genome*, 29(3):273-280, 2018. 査読有。

DOI: 10.1007/s00335-018-9742-y

〔学会発表〕(計 0件)

〔図書〕(計 0件)

〔産業財産権〕

出願状況（計 0 件）

取得状況（計 0 件）

6．研究組織

(1)研究代表者

大野 民生（OHNO Tamio）

名古屋大学・大学院医学系研究科・准教授

研究者番号：90293620

(2)連携研究者

豊國 伸哉（TOYOKUNI Shinya）

名古屋大学・大学院医学系研究科・教授

研究者番号：90252460

(2)連携研究者（平成 26 年度）

海野 明広（UNNO Akihiro）

名古屋大学・大学院医学系研究科・助教

研究者番号：50628592

(3)研究協力者（平成 28 年度）

宮坂 勇輝（MIYASAKA Yuki）

名古屋大学・大学院医学系研究科・助教

研究者番号：30778098

研究協力者

前川 智樹（MAEGAWA Tomoki）