

令和元年5月17日現在

機関番号：14101

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2016～2018

課題番号：16K07089

研究課題名(和文) Rasドライバー肺発癌に特化した発癌修飾遺伝子のin vivo解析系の構築と応用

研究課題名(英文) Construction and application of an animal experimental system exploring modifier genes for lung carcinogenesis driven by Ras mutation

研究代表者

鈴木 昇 (SUZUKI, NOBORU)

三重大学・地域イノベーション推進機構・准教授

研究者番号：00202135

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,700,000円

研究成果の概要(和文)：肺発癌について、ポストRas変異にフォーカス可能なモデル動物を複数系統化し、QTL解析により、Rasドライバー発癌を制御する15の遺伝子座を見出した。これらには、発癌過程に影響が予測される662遺伝子が含まれていた。さらに、データベースにより、癌細胞の基本特性や臨床的悪性度との関連付けして、72の遺伝子を責任遺伝子として候補とした。

また、独自のin vivo解析系の構築を進め、これによって、72の遺伝子を対象に、Rasシグナル強度に影響して腫瘍発生数や悪性度を変動させる遺伝子の探索と機能解析を迅速に行い、最終的に、ヒトがん治療における新規な分子標的の同定や治療法の開発に貢献する。

研究成果の学術的意義や社会的意義

発癌について、ポストRas変異にフォーカス可能なモデル動物を複数系統化し、肺発癌においては、QTL解析によって新たにRasドライバー発癌を制御する15の遺伝子座を見出し、これらに位置する発癌過程に影響が予測される662遺伝子のうち、72の遺伝子を有力な責任遺伝子として候補できたことは従来の化学発癌モデルでは不可能であったことである。今後も、独自のin vivo解析系の構築を進め、これによって他の臓器についても、Rasシグナル強度に影響して腫瘍発生数や悪性度を変動させる遺伝子の探索と機能解析を迅速に行い、最終的に、ヒトがん治療における新規な分子標的の同定や治療法の開発に貢献することができる。

研究成果の概要(英文)：In order to focus on post-Ras mutations in lung carcinogenesis, multiple animal models were established. Quantitative trait loci (QTL) analysis found 15 loci that control Ras-driver carcinogenesis. These included 662 genes that are predicted to affect carcinogenic processes. Furthermore, the database identified 72 genes as responsible genes in relation to basic characteristics and clinical grade of cancer cells.

In addition, we proceed with the construction of a unique in vivo analysis system, which enables us to quickly search for genes that affect the number of tumors or the degree of malignancy and to analyze their function by affecting Ras signal intensity for 72 genes. Finally, it contributes to the identification of novel molecular targets in human cancer treatment and to the development of therapeutics.

研究分野：実験動物学

キーワード：Rasドライバー発癌 発癌修飾遺伝子 肺癌 動物モデル 遺伝子編集 QTL解析

### 1. 研究開始当初の背景

変異 K-ras 遺伝子をドライバーとする肺腺癌の K-ras 以外を標的とする分子標的薬の開発には、K-ras 遺伝子変異後 (ポスト Ras 変異) のシグナル過程を修飾する分子群の解明が必須であった。この解明が発展途上である主たる障害理由の一つとして、化学発癌剤によって発癌誘導したマウスモデルの使用やそれに由来する細胞の使用にあった。国内外の多数の研究者が 30 年近く費やして、化学肺発癌感受性の系統差を利用した量的遺伝子座 (QTL) 解析は、約 50 の遺伝子座をマップし、その 4 分の 1 がポスト Ras 変異の発癌過程を修飾し得ることを示唆したにすぎなかった。研究代表者は、この障害を克服できる新たな癌型 K-Ras ドライバー癌モデルを系統化しつつ、他の癌種についてのモデル動物や遺伝疾患のモデル動物の作製を疾病発症と Ras 機能の関わりの観点で解析を継続しており、新たな QTL 解析によって、第 3 番と第 11 番染色体を解析したのみで、A/J 系統において腫瘍数を正に調節する新規の 2 つの座位 (D3Mit19, D3Mit45)、負に調節する 1 つの座位 (D11Mit20) の同定に成功したため、遺伝子機能をより効率よく解析する動物実験系の開発段階にあった。

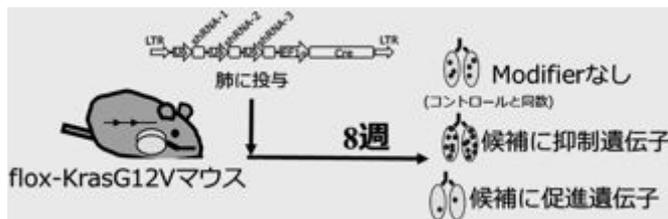
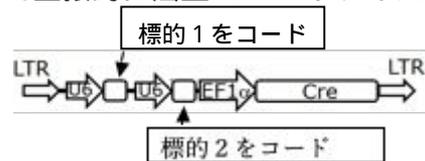
### 2. 研究の目的

低分子量 G 蛋白質 Ras 遺伝子の活性化変異は、肺癌の 10-20% で認められるドライバー変異の 1 つである。本研究では、発癌過程における Ras 遺伝子変異以降に関与する分子機能を、迅速に解析できる動物実験系の構築を目指した。また、QTL 解析をさらに進めて、新たな遺伝子座の同定、制御遺伝子の候補を行うことを目的とした。骨形成因子 1 型受容体 BMPR1A や、Ras 遺伝子変異に抵抗性の A/J 系統と高感受性の C57BL/6 系統を用いた量的遺伝子座 (QTL) 解析で得られた複数の関連遺伝子座の候補遺伝子を取り上げつつ、実証的に構築を進める。最終的に、Ras シグナル強度を調節し腫瘍発生数を変動させる修飾遺伝子の探索と機能解析を迅速化する動物実験系の応用によって、Ras 遺伝子変異をドライバーとするがん治療における分子標的の同定、治療法の開発に貢献する。

### 3. 研究の方法

図のように任意の遺伝子について、U6 RNA ポリメラーゼプロモーターの下流に候補遺伝子の機能を抑制するための shRNA や破壊するための sgRNA を転写するユニットを複数有するウィルスベクターを構築し、in vivo にて直接的に癌型 K-Ras ドライバー発癌過程を修飾する作用の有無の判定を試みた。

新たな遺伝子座については、データベースで癌細胞の特性や臨床的悪性度に関する情報を基盤的に利用し、修飾遺伝子を候補した。



### 4. 研究成果

まず、ドミナントネガティブ BMPR1A 遺伝子が、C57BL/6 系統癌型 K-Ras ドライバー肺発癌を抑制する結果を得ていることから、BMPR1A 遺伝子に対する shRNA による抑制効果を検討した。遺伝子の 2 ヶ所を標的にターゲット用 shRNA をコードする発現ノックダウンウィルスベクターを構築、レンチウィルス粒子産生、 $2 \times 10^5$  の 5 乗 pfu (20  $\mu$ l) 気管内注入して肺上皮に癌型 K-ras 遺伝子発現を誘導し、約 8 週後に肺腫瘍数を計測して、候補遺伝子の機能を評価したが、有意な結果を得ることはできなかった。十分な shRNA の発現を得るのが困難であるためと推測し、CRISPR/Cas9 システムを応用し、sgRNA 発現ウィルスによる遺伝子破壊実験に移行し、実験系を構築してきた。交配によって、新たに Cas9 たんぱくを発現するマウス実験系を構築しつつある。

新たな QTL 解析の結果、A/J 系統由来の遺伝子座が B6 系統由来の遺伝子座に対して有意に発癌を促進する 9 遺伝子座、B6 系統由来の遺伝子座が A/J 系統由来の遺伝子座に対して有意に発癌を促進する 6 遺伝子座、計 15 遺伝子座を新規に見出した。15 遺伝子座に関して、Sungar のマウスゲノムプロジェクトに Web 公開されている A/J および B6 系統の遺伝子配列を比較し、2 系統間で遺伝子発現調節、発現 RNA やタンパク質などの機能に影響が予測される遺伝子ヴァリエント、Mature miRNA variant、

Splice region variant、 Missense variant、 NMD transcript variant、 Inframe variant、 3-5-UT variant などがある 662 遺伝子を得て、さらに Pubmed 論文検索により、RAS シグナル関連遺伝子、または、癌細胞の増殖、細胞死、細胞運動、臨床データにおいて癌悪性度との関連付けして、72 遺伝子を責任遺伝子として候補とした。

## 5. 主な発表論文等

[学会発表](計 18 件)

齋藤浩充、鈴木昇 遺伝子改変肺発癌モデルマウスによる発癌 modifier 候補遺伝子の探索  
第 140 回関西実験動物研究会 2018 年 12 月 7 日 京都市 聖護院御殿荘

齋藤浩充、鈴木昇 QTL 解析を用いた癌型 K-Ras 依存的な肺癌形成感受性遺伝子の探索  
第 41 回日本分子生物学会年会 2018 年 11 月 28 日 横浜市 パシフィコ横浜

齋藤浩充、鈴木昇 P53 欠失癌型 KRas 発現横紋筋肉腫モデルマウスからの新規 Cell line  
樹立と解析 第 77 回日本癌学会学術総会 2018 年 9 月 27 日大阪市大阪国際会議場

齋藤浩充、鈴木昇 遺伝子改変型多型型横紋筋肉腫モデルマウスから樹立した新規腫瘍細胞株の解析  
第 91 回日本生化学会大会 2018 年 9 月 24 日京都府京都市 国立京都国際会館

齋藤浩充、鈴木昇 癌型 K-ras・p53-/-多形型横紋筋肉腫マウスモデルからの癌細胞株の樹立  
第 89 回東海実験動物研究会 2018 年 7 月 14 日 名古屋市立大学

齋藤浩充、鈴木昇 癌型 K-ras・p53-/-多形型横紋筋肉腫 (pRMS) 細胞株の樹立と解析  
第 82 回日本生化学会中部支部例会 2018 年 5 月 19 日 岐阜大学

齋藤浩充、鈴木昇 癌型 KRas 遺伝子発現・p53-/-多形型横紋筋肉腫モデルマウスからの腫瘍細胞株の樹立  
第 65 回日本実験動物学会総会 2018 年 5 月 16 日 富山県富山市

齋藤浩充、鈴木昇 癌型 K - R a s により誘導される非小細胞肺癌発症関連遺伝子座の検出と解析  
生命科学系学会合同年次大会 (ConBio2017) 2017 年 12 月 7 日神戸ポートアイランド

齋藤浩充、鈴木昇 癌型 K-ras・p53-/-多形型横紋筋肉腫 (pRMS) 細胞株の樹立  
第 136 回関西実験動物研究会 2017 年 12 月 1 日 京都大学楽友会館

齋藤浩充、鈴木昇 遺伝子改変発癌モデルによる K - R a s 変異非小細胞肺癌の新規治療標的候補の探索  
第 76 回日本癌学会学術総会 2017 年 9 月 28 日 パシフィコ横浜

齋藤浩充、鈴木昇 K-rasG12V-mediated lung tumor models identified new quantitative trait loci modifying events post-K-ras mutation  
第 64 回実験動物学会総会 2017 年 5 月 26 日 ビックパレットふくしま

齋藤浩充、鈴木昇 遺伝子改変マウスを用いた癌型 K-Ras 依存的な肺発癌感受性遺伝子の探索  
第 81 回日本生化学会中部支部例会 2017 年 5 月 20 日 名古屋市立大学薬学部

齋藤浩充、鈴木昇 癌型 K-Ras 依存的な肺発癌感受性遺伝子座の探索  
第 132 回 関西実験動物研究会 2016 年 12 月 9 日 京都府立医科大学図書館ホール

齋藤浩充、鈴木昇 癌型 K-Ras 依存的な肺発癌感受性遺伝子座の探索と解析  
第 39 回 分子生物学会総会 2016 年 11 月 30 日 パシフィコ横浜

齋藤浩充、鈴木昇 遺伝子改変肺発癌モデルマウスによる癌型 K - r a s 変異依存的な発癌感受性遺伝子の探索  
第 75 回 日本癌学会総会 2016 年 10 月 6 日 パシフィコ横浜

齋藤浩充、鈴木昇 遺伝子改変マウスによる癌型 K-Ras 依存的な肺発癌感受性遺伝子の探索  
第 89 回日本生化学会総会 2016 年 9 月 25 日 仙台国際センター

齋藤浩充、鈴木昇 癌型 Ras 変異非小細胞肺癌モデルマウスを用いた発癌感受性 QTL の探索  
第 63 回日本実験動物学会総会 2016 年 5 月 18 日 ミューザ川崎シンフォニーホール

齋藤浩充、鈴木昇 遺伝子改変マウスを用いた癌型 K-Ras 依存的な肺発癌感受性遺伝子の探索  
第 80 回 日本生化学会 中部支部例会 2016 年 5 月 20 日 三重大学

[その他]

ホームページ等

<http://www.medic.mie-u.ac.jp/animalcenter/animalgenomics2.html>

<http://www.medic.mie-u.ac.jp/organization/course/animal/>

## 6 . 研究組織

### 研究分担者の該当なし、研究協力者の該当なし

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、研究者個人に帰属されます。