

標的分子分解における高時空間分解能マウスを使った 病態メカニズムの解明

東京大学新領域創成科学研究科メディカル情報生命専攻 修士課程2年(助成時)

東京都医学総合研究所 研究協力者(現在)

山崎 航輔

<研究の目的>

本研究の目的は、生体内でより高い時間分解能を持つ新しいコンディショナル変異体モデルマウスを使って、今までの技術ではなしえなかった疾患モデルマウスを作製し、このマウスを用いてファンコーニ貧血の疾患発症メカニズムの解明と新たな治療法開発に向けた基礎的な知見を得ることである。

<研究の背景>

ゲノム DNA は常に損傷を受けている。細胞は、DNA 損傷の種類に応じた修復経路を持っている。相同組換え経路は、放射線曝露により発生する DNA 二重鎖切断を修復する経路である。相同組換え修復は、脊椎動物においては必須であり、相同組換え修復因子である BRCA1/2 欠損は細胞レベルで致死である。致死である理由は、細胞増殖に伴う内因性 DNA 損傷の修復に、相同組換えが重要な役割を果たしているからと言われている。もしこの説が正しいとすれば、生殖系列 BRCA1/2 遺伝子変異による臓器選択的発がん(乳房、卵巣、前立腺、膵臓)は説明できない。

相同組換え修復に関わる遺伝子の異常に起因する疾患として、ファンコーニ貧血が知られている。ファンコーニ貧血(Fanconi Anemia, FA)は、生後10年以内に汎血球減少症を発症し、骨髄不全との合併症によって死亡に至ることが多い小児遺伝性疾患である。現在までにFA患者から樹立した細胞株の表現型を抑制する遺伝子として23遺伝子が単離されている。FA発症の分子メカニズムを明らかにする目的で、FA病態を模倣するモデルマウスの樹立が進められてきた。しかしながら、FA患者でみつかった相同組換え修復に関わる遺伝子の機能減弱変異をマウスに導入してもヒト病態を模倣しないことなどから、現在までにFA発症のメカニズムは不明なままである。FA責任遺伝子の一つである *BRCA1/2* は、CRISPR/Cas9 や Cre-loxP システムを用いて二十種類以上のノックイン/アウトマウスが作製されたが、そのほとんどのマウスは胎生致死でありFAの発症機序の解明に至っていない。

私は、FAの原因遺伝子の一つである *Brcal/2* 遺伝子に着目し、オーキシシアナログである5Ph-IAA投与により標的分子を特異的に分解することができるAID-degronマウスを樹立した。この5Ph-IAA依存的な標的分子分解は、既存のCre-LoxPシステムよりも時間分解能が高く、細胞株を用いた研究においては5Ph-IAA投与により1時間以内に検出限界以下になる。そのため標的分子分解による直接的な影響を時間分解能よく解析することができる。

BRCA2は、今までに生化学的・細胞生物学的解析により詳細な分子機能が明らかとなっている。しかし、BRCA1/2の機能減弱変異がなぜFA疾患を発症するのかについては未だ不明な点が多い。本研究は、BRCA1/2の造血における役割を探ることを目的に行った。

<結果>

C57BL/6 マウスの受精卵に *Brca2* 遺伝子の終結コドンから上流・下流それぞれ約 300 塩基とその間に mAID 配列を連結させた DNA を作製し(図 1)注入した。注入した受精卵を疑似妊娠マウスに移植し、仔マウス 40 匹を得た。その中で、正しく標的組換えを起こしたマウスを 5 匹得た。*Rosa26^{CAG-TIR/WT}* マウス(理研・谷内先生より分与)と *Brca2^{AID/WT}* マウスと交配し、*Brca2^{AID/AID} Rosa26^{CAG-TIR/WT}* マウスを得た。

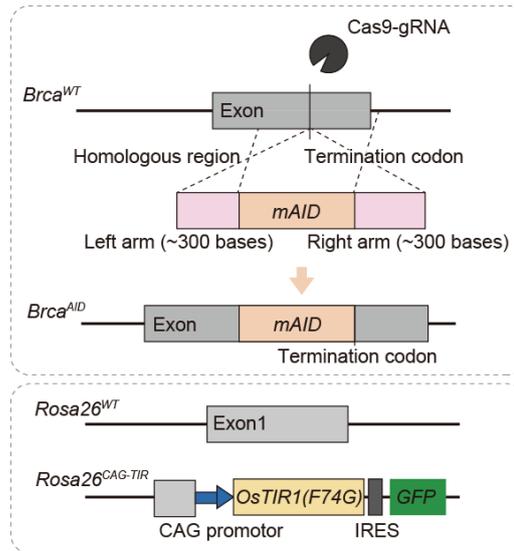


図 1: *Brca2^{AID}* マウスの作製
終結コドン前後の約 300 塩基の相同配列とその間に mAID 配列を持つ鑄型 DNA を作成した(図上)。TIR 遺伝子は *Rosa26* セーフハーバー遺伝子座に導入した(図下)。

シスプラチンは、最も良く使用される DNA 損傷型抗がん剤である。シスプラチンによる DNA 損傷は、S 期や G2 期において BRCA1/2 が重要な役割を果たす相同組換えによって修復される。BRCA1/2 蛋白質分解によってシスプラチン感受性が高まるかどうかを調べるために、*Brca1/2^{AID/AID} Rosa26^{CAG-TIR/WT}* (BRCA 分解誘導) マウスと *Brca1/2^{AID/AID} Rosa26^{WT/WT}* (コントロール) マウスに 5Ph-IAA とシスプラチンを投与した(図 2a, b)。*Brca1/2^{AID/AID} Rosa26^{WT/WT}* マウスは、シスプラチン投与による生存率低下が観察されなかった。一方でシスプラチン投与により、*Brca1^{AID/AID} Rosa26^{CAG-TIR/WT}* マウスは投与から 12 日目、*Brca2^{AID/AID} Rosa26^{CAG-TIR/WT}* マウスは 6 日目に全てのマウスが死亡した(図 2c, d)。

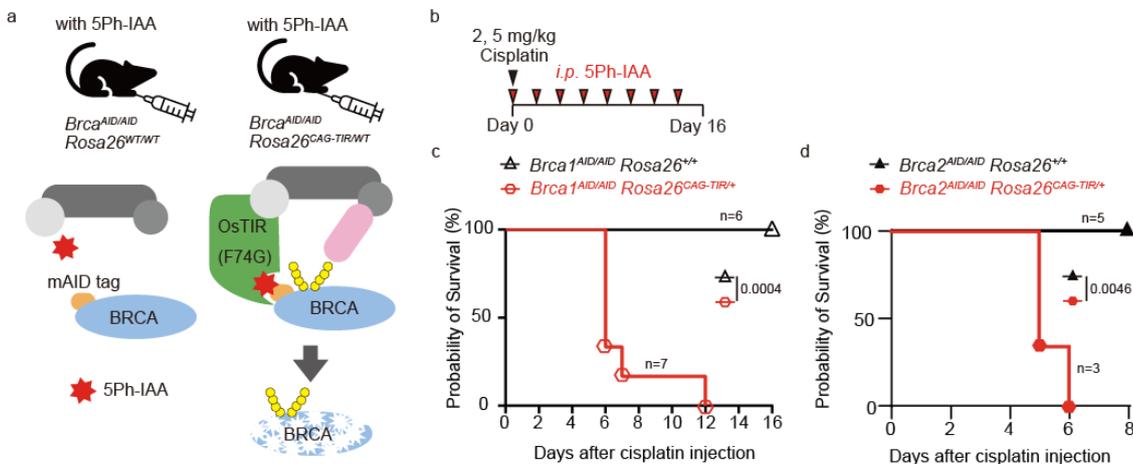


図 2: BRCA 蛋白質分解によってシスプラチン感受性が上昇した

(a) OsTIR と 5Ph-IAA 依存的な BRCA 分解の概略図。(b) 実験デザインの概略図。シスプラチンをマウスに腹腔内注射し(0 日目)、その後 5Ph-IAA を毎日注射した。(c, d) シスプラチン投与による生存率。(c) *Brca1^{AID/AID} Rosa26^{CAG-TIR/WT}* および *Brca1^{AID/AID} Rosa26^{WT/WT}* マウス。(d) *Brca2^{AID/AID} Rosa26^{CAG-TIR/WT}* および *Brca2^{AID/AID} Rosa26^{WT/WT}* マウス。

<結論・考察>

Brca2^{AID/AID} Rosa26^{CAG-TIR/WT} マウスはメンデル遺伝比通りに生まれており、AID 配列導入や TIR 発現がマウス発生に影響を与えないことが示唆された。シスプラチン感受性実験の結果より、シスプラチンによる DNA 損傷の修復に BRCA1/2 が重要な役割を果たすことを踏まえると、5Ph-IAA 投与により BRCA1/2 蛋白質が分解されたため、DNA 損傷が修復されず、マウスが死亡したと考えられる。