

## 研究題目 尿路上皮癌・多段階進展機構における DDX31 の機能解析

## 研究組織

氏名	所属機関・部局等	職名	役割分担
金山博臣	徳島大学大学院医歯薬学研究部 泌尿器科学分野	教授	研究総括
高橋正幸	徳島大学大学院医歯薬学研究部 泌尿器科学分野	准教授	統計解析
布川朋也	徳島大学大学院医歯薬学研究部 泌尿器科学分野	講師	遺伝子変異解析
大豆本圭	徳島大学病院 泌尿器科	助教	動物実験
福原弥生	徳島大学大学院医歯薬学研究部 泌尿器科学分野	学術研究員	生化学の実験

## 【1】研究の概要

## [1-1]本研究の目的・概要

尿路上皮癌多段階進展機構で DDX31/p53 変異シグナルが重要であることが先行研究で示唆されている。本研究では DDX31 が尿路上皮癌の多段階進展の関与においてどのように関与するかを遺伝子改変マウスで解析することが目的である。

## [1-2]研究の方法・経過

Ddx31 ノックアウトマウスによる DDX31 機能解析を進めた。尿路上皮癌では DDX31 の発現亢進が重要であるが、まずは Ddx31 のノックアウトマウスにおけるフェノタイプ解析及び各臓器の病理評価を行う方針として研究を進めた。さらに Trp53 R172H 変異マウスを作製した。Ddx31 のノックインマウスを作製中である。

## 【2】研究成果

## [2-1]本共同研究で明らかになった研究成果

Ddx31 ノックアウトマウスについての詳細な機能解析はこれまで報告がない。マウスは C57BL/6J を使用し、Ddx31 遺伝子の機能喪失のために、exon4 を欠損させたゲノム編集マウスを作成した。受精卵にエレクトロポレーションにより、Cas9 タンパク質、Ddx31 crRNA1、Ddx31

crRNA2、tracrRNA を導入した。翌日 2 細胞へと発生した胚を、偽妊娠マウスの卵管に移植した。妊娠 19 日目に出産させ、離乳時に耳片からゲノム DNA を抽出し、PCR 法により exon4 の欠失の有無を確認した。欠失が確認されたマウスを交配させ、次世代にてヘテロマウスを獲得した。Ddx31 ノックアウトマウスはヘテロで系統維持することが可能であり、野生型とノックアウトマウスを比較したところ雄、雌とも 12 週間の時点で体重変化はなく、各臓器の変化はマクロ・ミクロ共に認めなかった。48 週間生存することが確認できた。次に Trp53 R172H 変異マウスを作製した。ゲノム編集技術を活用して、Trp53 遺伝子の 172 番目のアルギニン残基をヒスチジン残基へと変異させたマウスを作成した。受精卵にエレクトロポレーションにより、Cas9 タンパク質、Trp53 crRNA1、tracrRNA、Trp53 R172H オリゴ DNA を導入した。翌日 2 細胞へと発生した胚を、偽妊娠マウスの卵管に移植した。妊娠 19 日目に出産させ、離乳時に耳片からゲノム DNA を抽出し、PCR により標的配列を増幅させ、サンガーシーケンスにより配列情報を取得した。172 番目のアルギニン残基をコードする配列 (cgc) がヒスチジン残基 (cac) をコードする配列へ欠失されているかを解析した。点変異が確認されたマウスを交配させ、次世代にてヘテロマウスを得た。さらに現在、Ddx31 のノックインマウスを作製中である。

今後の計画として野生型、Trp53 R172H 変異マウス、Trp53 R172H 変異マウス/ Ddx31 ノックアウトマウス、Trp53 R172H 変異マウス/ Ddx31 ノックインマウスに対して N-butyl-N-(4-hydroxybutyl)-nitrosamine (BBN)による発がん実験を行い、腫瘍発生のタイミングを比較する予定である。

[2-2]本共同研究による波及効果及び今後の発展性

腫瘍の発生・進展には複数の遺伝子における異常が複雑に関連していることが示唆されている。しかしながら、癌における個々の遺伝子異常についての理解は深まっているものの、複雑な分子機構の解明には至っていない。癌の発症および進展に対する理解を深めるためには、このような少数の遺伝子でなく、ゲノムワイドな遺伝子および分子の働きの変化を捉える必要がある。本研究では、遺伝子改変マウスを用いることにより、この複雑に絡み合った複数の分子の働きを時間的変化で把握し、新たな治療ターゲットやバイオマーカーの発見を目指しており、共同利用が必須であり、有益な解析結果から早期の臨床応用が期待できる。

### 【3】主な発表論文等

遺伝子改変マウスの作成に及び評価に時間を要しており、現状では報告を行っていない。

[3-1]論文発表

なし

[3-2]学会発表

なし

[3-3]成果資料等

なし

### 【4】今後の課題等

現在、Ddx31 のノックインマウスを作製中である。今後の計画として野生型、Trp53 R172H 変異マウス、Trp53 R172H 変異マウス/ Ddx31 ノックアウトマウス、Trp53 R172H 変異マウス/ Ddx31 ノックインマウスに対して N-butyl-N-(4-hydroxybutyl)-nitrosamine (BBN)による発がん実験を行い、腫瘍発生のタイミングを比較する予定である。

①DDX31 ノックアウトマウスにおける癌進展抑制についての検討

DDX31 の機能は rRNA 生合成に関わっていることや腎細胞癌、グリオブラストーマに関与していることが報告されているが不明な点が多い。BBN 飲水を施行し、*TP53* の変異が起きるかどうかに癌進展が抑制されるかどうかを調べる。さらに

*TP53* ミスセンス変異+DDX31 ノックアウトマウスを作製し、発癌進展がおこるかどうかを検討する。

②DDX31 ノックインマウスにおける癌進展促進についての検討

DDX31 ノックインマウスで BBN 飲水を同様に施行し、*TP53* の変異が起きるかどうかに癌進展が抑制されるかどうかを調べる。さらに *TP53* ミスセンス変異+DDX31 ノックインマウスを作製し、発癌進展が早期から急激に悪化するかどうかを証明する。