

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 30 年 5 月 16 日現在

機関番号：13301

研究種目：研究活動スタート支援

研究期間：2016～2017

課題番号：16H06823

研究課題名(和文)新規遺伝子編集技術を用いた子宮体癌自然発症モデルの作製と癌発症機序の解明

研究課題名(英文) Establishment and analysis of endometrial cancer models engineered by novel genetic engineering method

研究代表者

寺川 純平 (Terakawa, Jumpei)

金沢大学・学際科学実験センター・助教

研究者番号：90777731

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,300,000円

研究成果の概要(和文)：本研究は、ヒト子宮体癌で認められる遺伝子変異や増悪因子に着目し、Cre/loxPおよび新規in vivo遺伝子編集技術を用いたマウスの作製と解析から、悪性度の高い子宮体癌の発症要因を明らかにすることを目的とした。その結果、低濃度の生理的エストロゲンの長期暴露が癌細胞の子宮筋層への浸潤能を高めることを明らかにした。また新規にp53遺伝子改変マウスを作製したが子宮体癌は発症しなかったため、別の発癌ドライバーが必要であることが示唆された。今回実施したin vivo遺伝子編集技術では発癌ドライバーの同定には至らなかったが、今後改良することによって、発癌モデルの作製ができると考えている。

研究成果の概要(英文)：The purpose of this study was to investigate factors that are necessary to develop high-grade endometrial cancer (EMC). We focused PTEN and p53 gene mutations which are frequently altered in EMC and estrogen which is thought to relate to EMC progression. Using mice with endometrial deletion of Pten, we found that the invasion of tumor cells into the myometrial layer was promoted by the supplement of physiologically low level of estrogen. By generating mice carried uterine epithelial-specific loss of p53 or missense mutation of p53, we found these mutations are not enough to develop high-grade EMC. We then tried to introduce other genes directly to uterine epithelium by novel in vivo genetic engineering method; however, we could not analyze the effects further because the gene induction was temporary. We think to reveal the gene mutations and/or overexpression for developing high-grade EMC by improving in vivo genetic engineering method.

研究分野：実験動物学、生殖生物学

キーワード：子宮体癌 疾患モデル 遺伝子改変マウス

1. 研究開始当初の背景

本研究従事者は、子宮体癌を自然発症するマウスモデルの作製と解析を通して、子宮体癌の発症と進行の機構解明と治療標的の発見を目指している。

ヒト子宮体癌は大きく二つの組織型、Type1 (類内膜腺癌) と Type2 (漿液性腺癌や明細胞腺癌) に分類される。ヒト子宮体癌の発症因子および増悪因子の候補として、遺伝子変異やホルモンなどの報告がある。PTEN 遺伝子の変異は、初期 Type1 子宮体癌に高頻度に認められ、またマウスにおいて子宮選択的に Pten を欠損させると、Type1 子宮体癌が自然発症することから (Daikoku T et al. Cancer Res. 2008) この遺伝子変異が Type1 子宮体癌の発症に重要な役割を担うと考えられている。しかしながら、Type1 子宮体癌の進行を促進する増悪因子については、エストロゲンや p53 の遺伝子変異などが候補に挙がっているものの、その詳細については明らかでない。一方、Type2 は Type1 と比べて悪性度が高く予後も悪いことが知られているが、Type2 子宮体癌では Type1 とは異なり初期の段階から p53 遺伝子の変異が高頻度に認められる。したがって、p53 遺伝子変異が悪性度の高い子宮体癌の発症に重要であると考えられるが、その詳細は不明である。

そこで本研究では、子宮体癌の増悪因子といわれるエストロゲンおよび p53 遺伝子を標的として、Cre/loxP および新規 in vivo 遺伝子編集技術を用いたマウスの作製と解析から、悪性度の高い子宮体癌マウスモデルの作出に取り組んだ。

2. 研究の目的

本研究は、悪性度の高い子宮体癌の発症要因を、遺伝子改変マウスを利用して明らかにすることを目的とした。

3. 研究の方法

Type1 子宮体癌の増悪因子の一つとされているエストロゲン (卵巣ステロイドホルモン) が、癌進行にどのように影響するかを、マウスモデルを用いて検証した。Type1 子宮体癌を自然発症するマウスモデルとして、PR-Cre (プロゲステロン受容体のプロモーターにより Cre の発現が誘導される) により子宮内膜で Pten 遺伝子を欠損させた既出のマウスを使用した (Daikoku T et al. Cancer Res.

2008)。発症の初期の段階で卵巣を除去し、内在性の卵巣ステロイドホルモンを枯渇させたうえで様々な濃度のエストロゲンに暴露させ、その影響を調べた。

また、悪性度の高い Type2 子宮体癌を発症するマウスの作製を試みた。まず、p53 遺伝子変異を子宮上皮特異的に誘導するために、研究従事者らが新たに作製した性成熟後の子宮上皮特異的に発現するラクトフェリン (LTF) のプロモーターにより Cre の発現が誘導される LTF-Cre マウス (Daikoku T & Ogawa Y et al. Endocrinology 2014) を用いた。次に発癌ドライバー探索のために、子宮上皮での in vivo 遺伝子編集を試みた。リポフェクション法とエレクトロポレーション法によって、トランスポゾンベクターを子宮上皮に直接導入する新たな遺伝子改変法を用いて、さらなる解析を行った。

4. 研究成果

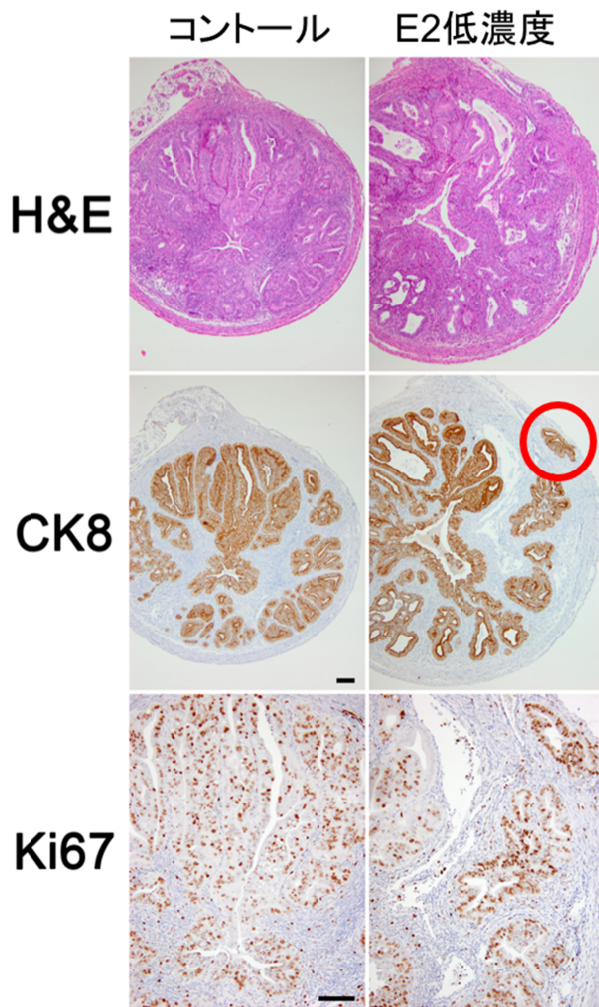
Pten 欠損マウスを用いたエストロゲンの暴露実験では、卵巣除去後に生理的エストロゲン濃度のうち特に低濃度で長期暴露することによって、癌細胞の子宮筋層への浸潤能が高まることが明らかになり、エストロゲンが確かに子宮体癌進行の増悪因子となり得ることを明らかにした (図 1)。

野生型マウスの子宮では、同じ低濃度のエストロゲン暴露による細胞の形態変化や細胞増殖の変化は認められなかったことから、低濃度エストロゲンの作用は癌細胞に対して強く働く可能性が示唆された。今後、癌細胞に対する低濃度のエストロゲンの作用機序を明らかにしていく予定である。

p53 遺伝子改変マウス子宮を経時的に解析した結果、加齢に伴う子宮上皮の嚢胞性変化しか認められなかったため、p53 遺伝子の欠損あるいは変異だけでは子宮体癌は発症せず、別の発癌ドライバーが必要であることが示唆された。そこで次に、p53 遺伝子変異に加え、発癌ドライバーと予測される活性型の PI3K とサイクリン E を子宮上皮で過剰発現させるために、トランスポゾンベクターシステムを用いて子宮上皮へ直接遺伝子を導入する系の構築を試みた。遺伝子導入は、リポフェクション法とエレクトロポレーション法の 2 つを用いた。しかしながら、遺伝子の導入はみられたものの、いずれの手法でも長期の安定的な遺伝子発現は確認できなかった。培養細胞にトランスポゾンベクターシス

テムを用いて遺伝子導入をした場合は、非常に効率的な導入と長期的な遺伝子発現がみられたことから、in vivo での遺伝子導入に関してはさらなる検証が必要である。

エストロゲン(E2)投与による子宮の組織学変化 (子宮選択的Pten欠損マウス)



CK8: Uterine epithelial marker
Ki67: Cell Proliferation marker

【図1】エストロゲンの低濃度暴露が癌細胞の筋層への浸潤を高める(赤丸部分)。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計 2件)

- Obata T, Nakamura M, Mizumoto Y, Iizuka T, Ono M, Terakawa J, Daikoku

T, Fujiwara H. “Dual expression of immunoreactive estrogen receptor β and p53 is a potential predictor of regional lymph node metastasis and postoperative recurrence in endometrial endometrioid carcinoma.” *PLoS One*, Nov 30;12(11):e0188641. 2017 (査読有)

- Kobayashi R, Terakawa J, Omatsu T, Hengjan Y, Mizutani T, Ohmori Y, Hondo E. “The window of implantation is closed by estrogen via insulin-like growth factor 1 pathway.” *Journal of Reproduction & Infertility*, Apr-Jun;18(2):231-241. 2017 (査読有)

〔学会発表〕(計 1件)

- 寺川 純平
第159回日本獣医学会学術集会・解剖分科会サテライトフォーラム(2016年9月6日)
「上皮と間葉」を制御するキーファクター
～発生・癌化の視点から～
「ミューラー管上皮細胞の運命決定機構」

〔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

寺川 純平(TERAKAWA, Jumpei)
金沢大学・学際科学実験センター・助教

研究者番号: 90777731

(2)研究分担者

()

研究者番号:

(3)連携研究者

()

研究者番号:

(4)研究協力者

大黒 多希子 (DAIKOKU, Takiko)