

令和 2 年 6 月 19 日現在

機関番号：11301

研究種目：基盤研究(C)（一般）

研究期間：2017～2019

課題番号：17K07129

研究課題名（和文）卵管上皮由来卵巢癌モデルマウスによるがん化初期過程の分子機構解明

研究課題名（英文）The elucidation of molecular mechanism of Epithelial ovarian cancer (EOC) model mouse

研究代表者

三好 一郎 (MIYOSHI, ICHIRO)

東北大学・医学系研究科・教授

研究者番号：10183972

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,800,000円

研究成果の概要（和文）：上皮性卵巢癌は最も死亡率の高い婦人科悪性腫瘍であるが、その発生母地が不明なこと、病態の解析に相応しい動物モデルがないことが診断・治療法の開発の障害であった。近年、上皮性卵巢癌の発生母地が卵巣上皮から卵管上皮（内癌）へパラダイムシフトしつつあり、申請者が樹立した雌性生殖器で腫瘍を形成するトランスジェニックマウスが有用なモデルとして評価されている。しかし、同マウスは、子宮・膣も腫瘍化してしまう問題があった。本研究では、卵管上皮細胞特異的に発癌・可視化する新規遺伝子組換えマウスを作製し、卵巢癌のがん化初期の分子機構を明らかにすると共に、診断・治療の標的分子やマーカーの探索研究に応用する。

研究成果の学術的意義や社会的意義

上皮性卵巢癌は最も死亡率の高い婦人科悪性腫瘍であるが、その発生母地が不明なこと、病態の解析に相応しい動物モデルがないことが診断・治療法の開発の障害であった。近年、上皮性卵巢癌の発生母地が卵巣上皮から卵管上皮（内癌）へパラダイムシフトしつつあり、申請者が樹立したトランスジェニックモデルマウスが有用なモデルとして評価されている。しかし、同マウスは、子宮・膣も腫瘍化してしまう問題があった。本研究では、卵管上皮細胞特異的に発癌・可視化する新規遺伝子組換えマウスを作製し、卵巢癌のがん化初期の分子機構を明らかにすると共に、診断・治療の標的分子やマーカーの探索研究に応用することが可能となる。

研究成果の概要（英文）：epithelial ovarian cancer (EOC) is a gynecological disease that has a high mortality rate and difficult to detect early stage and treat efficiently.. There is no appropriate mouse models, since the origin of EOC have not been identified. Recently, many reports suggested that most EOCs may not originate from the ovarian surface epithelium, but from the female genital tract. The EOC mouse model generated by Miyoshi et al. exhibits a progression from female genital tract, in spite of the tumor of the other most mouse models develop from the ovarian surface epithelium. In the present study, we generated a knock-in mouse carrying the simian virus 40 (SV40) large T-antigen (Tag) gene and the enhanced green fluorescent protein (EGFP) gene in the site of mouse oviduct-specific glycoprotein (OGP) gene to better understand the biology of the tumor and develop new approaches for EOC prevention, detection, and treatment.

研究分野：実験動物学

キーワード：実験動物学

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19、CK - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

上皮性卵巣癌は最も死亡率の高い婦人科悪性腫瘍であるが、その発生母地が不明なこと、病態の解析に相応しい動物モデルがないことが診断・治療法の開発の障害であった。近年、上皮性卵巣癌の発生母地が卵巣上皮から卵管上皮(内癌)へパラダイムシフトしつつあり、申請者が樹立した雌性生殖器官で腫瘍を形成するトランスジェニックマウスが有用なモデルとして評価されている。

(1) 上皮性卵巣癌の大部分は卵管遠位端(卵管采)上皮由来の可能性が高い。

上皮性卵巣癌は早期から腹膜転移を起こし婦人科悪性腫瘍の中でも最も予後不良である。上皮性卵巣癌の70%は漿液性腺癌で、その由来は卵巣を被覆する表層上皮であると考えられていた。しかし、近年、卵巣癌発症の予防目的で摘出されたヒトの標本の病理組織学的解析により、遺伝性卵巣癌の前癌病変が卵管采にみられたことから、卵巣漿液性腺癌の大部分は卵巣漿膜よりもむしろ卵管上皮内癌を起源とする新説が提唱、パラダイムシフトとして支持されつつある。

(2) 卵巣癌の発症は遅く、検査・診断も限界がある。

卵巣は骨盤内にあるため症状として顕在化するのが遅く、進行してはじめて診断されることが多い。エコー検査、MRI、CT等の画像診断は腫瘍の発見、進行度転移の有無などに有効であるが、良性・悪性の診断には不十分である。また、有効な腫瘍マーカーが見つかっていない。

(3) 卵巣癌の診断・治療法の開発にはモデル動物が不可欠である。

同所性モデルは数多く報告されているが、がん細胞の発生母地を決定づける初期病態の解析に相応しいモデル動物がないことが上皮性卵巣癌の診断・治療法の開発を妨げている。この15年間、精力的に遺伝子組換えマウスが作製されたが、前述のパラダイムシフトを支持する例は少ない。発症率や組織特異性に問題があるにも関わらず、申請者が樹立したmOGPTag Tgマウス(詳細は後述)が卵巣癌モデルマウスとして注目されている事実は、如実にその重要性の高さを意味する。

2. 研究の目的

本研究では、卵管上皮細胞特異的に発癌・可視化する新規遺伝子組換えマウスを作製し、卵巣癌のがん化初期の分子機構を明らかにすると共に、診断・治療の標的分子やマーカーの探索研究に応用する。

3. 研究の方法

(1) mOGPTag-IRES-EGFP トランスジェニックマウスの作製：実績があるmOGP遺伝子の発現制御領域の長さを変え、その下流にTagおよびEGFPをIRESを介してバイシストロニックに発現する遺伝子を作製・導入し、特異的に卵管上皮細胞に発現し、腫瘍化・可視化する遺伝子組換えマウス系統を樹立する。発現制御領域を調整することにより、卵管上皮での発現特異性の向上とともに、発現量の異なる系統の確立を試みた。

(2) 我々が作製したmOGPTagマウスは、エストロゲン依存的に雌性生殖器官で腫瘍を発生する一方、オスの甲状腺や前立腺等も腫瘍化することから、mOGPが卵管以外の組織での発現が示唆された。野生型マウスを用いて、改めてmOGP遺伝子発現の組織特異性及びエストロゲン依存性を検証した。

(3) mOGP:Tag-IRES-EGFP ノックインマウスの作製：CRIPR/Cas9システムを用いて、mOGP遺伝子内にTag-IRES-EGFPをノックインしたゲノム編集マウスの作出を試みた。

4. 研究成果

mOGPTag-IRES-EGFP トランスジェニックマウス並びにmOGP:Tag-IRES-EGFP ノックインマウスの作製に関して、以下に示す理由から各々の系統の樹立やその病理学的解析が遅れている。mOGPTag-IRES-EGFP トランスジェニックマウスの作製：導入遺伝子の構築の際、幾つかの段階で塩基配列の確認を省略したことから遺伝子自身に問題が発覚し、再度導入遺伝子の構築から開始した。これまでのところ、報告されている条件ではノックインを目的としたゲノム編集が達成されていない。

発現制御領域遺伝子の機能を検討する比較対照として、改めて内在性mOGP遺伝子発現の組織特異性およびホルモン依存性を検討した。卵巣を切除した4週齢のC57BL/6Crメスの皮下に挿入した浸透圧ミニポンプ(Alzet)を用いてエストロゲンを12時間あるいは1週間、2週間継続的に投与した後、各臓器におけるmOGP遺伝子発現をreal-time PCRにより解析した。従前の報告通り、mOGP遺伝子は卵管で極めて強く発現していたが、他の臓器ではほとんど検出されなかった。また、0.1あるいは1.0、10、100 µg/kg/dayのエストロゲンを投与したが、驚いたことに高濃度投与群では顕著な子宮肥大が確認されたものの、mOGP遺伝子の発現は濃度あるいは投与期間の相異による影響を受けなかった。そもそもmOGPは、そもそも転写レベルでの発現が著しく高く、また、微量のエストロゲンに瞬時に反応するのかもしれない。この結果は、これ

までの発現制御領域遺伝子の構造，あるいは mOGPTag マウスを用いた研究結果と一致せず，導入遺伝子の構造を吟味する必要があることを示唆した。

CRISPR/Cas9 によるゲノム編集システムの構築および mOGPTag-IRES-EGFP トランスジェニックマウスと掛け合わせることによって，このマウスの遺伝子発現プロファイルの詳細を明らかにするために mOGP 遺伝子欠損マウスを作製した。C57BL/6J マウスの受精卵をもちいて，CRISPR/Cas9 のシステムを用いた。mOGP 遺伝子において第 7 エクソンの上流域と第 8 エクソンの下流域にガイド RNA を設計した。CRISPR/CAS9 およびガイド RNA を受精卵にエレクトロポレーションによって細胞内に導入した。その後，ゲノム編集を行った受精卵を仮親 ICR マウスの卵管に移植し，出産させた。その結果，第 7 および第 8 エクソンをヘテロに欠失させたマウスの作製に成功した（図 1 の ⑥）。

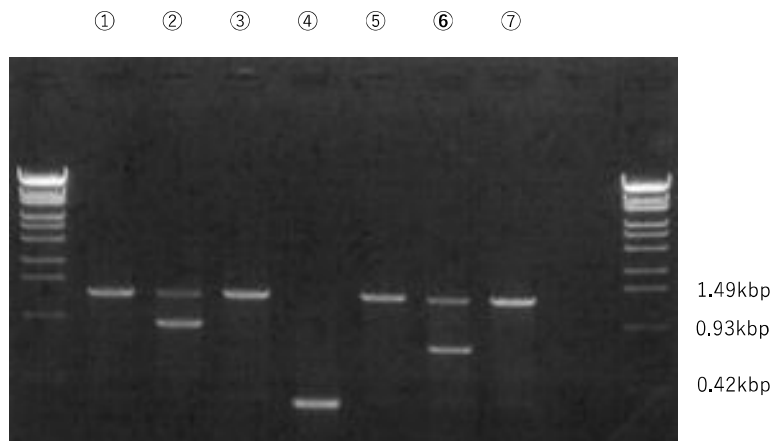


図1.ジェノタイプングPCRによるPCR産物の電気泳動写真。ゲノム編集後に得られたマウスを①から⑦でそれぞれを示す。

⑥が第VIIおよび第VIIIエクソンをヘテロに欠失させたマウスでmOGP遺伝子の野生型アレルで得られる約1.29kbのバンドと目的のDNA配列が欠失した時に得られる約0.68kbpのバンドが観察される。

mOGP:Tag-IRES-EGFP ノックインマウスの作製に関しては，受精卵を用いてゲノム編集を行うため，相同組換えによるノックインを行うプラスミドを構築し，エレクトロポレーションでDNA断片をゲノムに導入するつもりであったが，DNA断片が約4.4Kbpと比較的長い配列のためエレクトロポレーションでは導入が難しいことが分かった。そのため顕微鏡によるマイクロインジェクション法に変更することにした。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計5件（うち査読付論文 4件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 1件）

1. 著者名 Okumura H, Nakanishi A, Toyama S, Yamanoue M, Yamada K, Ukai A, Hashita T, Iwao T, Miyamoto T, Tagawa YI, Hirabayashi M, Miyoshi I, Matsunaga T.	4. 巻 26(1)
2. 論文標題 Contribution of rat embryonic stem cells to xenogeneic chimeras in blastocyst or 8-cell embryo injection and aggregation.	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Xenotransplantation	6. 最初と最後の頁 e12468
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1111/xen.12468. Epub 2018 Oct 30.	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -
1. 著者名 三好一郎	4. 巻 73
2. 論文標題 個別基準の解説(第4章個別基準) 実験等を行う施設の運用に関する解説(特集 教育セミナーフォーラム 2018 実験動物の飼養及び保管並びに苦痛の軽減に関する基準解説書:改訂の背景並びに基準の適正な理解と運用のために) -- (基準の適正運用と解説書の活用)	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 LABIO 21 (1345-9147)	6. 最初と最後の頁 12-15
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） なし	査読の有無 無
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -
1. 著者名 Kitamura H, Ishino T, Shimamoto Y, Okabe J, Miyamoto T, Takahashi E, Miyoshi I.	4. 巻 2017:6909415
2. 論文標題 Ubiquitin-Specific Protease 2 Modulates the Lipopolysaccharide-Elicited Expression of Proinflammatory Cytokines in Macrophage-like HL-60 Cells.	5. 発行年 2017年
3. 雑誌名 Mediators Inflamm.	6. 最初と最後の頁 15
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1155/2017/6909415.	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている(また、その予定である)	国際共著 -
1. 著者名 Saito N, Kimura S, Miyamoto T, Fukushima S, Amagasa M, Shimamoto Y, Nishioka C, Okamoto S, Toda C, Washio K, Asano A, Miyoshi I, Takahashi E, Kitamura H.	4. 巻 9
2. 論文標題 Macrophage ubiquitin-specific protease 2 modifies insulin sensitivity in obese mice.	5. 発行年 2017年
3. 雑誌名 Biochem Biophys Rep.	6. 最初と最後の頁 322-329
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.bbrep.2017.01.009.	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Iki Y, Ito T, Kudo K, Noda M, Kanehira M, Sueta T, Miyoshi I, Kagaya Y, Okada Y, Unno M.	4. 巻 66
2. 論文標題 Animal ethics and welfare education in wet-lab training can foster residents' ethical values toward life.	5. 発行年 2017年
3. 雑誌名 Exp Anim.	6. 最初と最後の頁 313-320
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1538/expanim.17-0026.	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

〔学会発表〕 計6件 (うち招待講演 6件 / うち国際学会 0件)

1. 発表者名 三好一郎
2. 発表標題 個別基準：その1 実験等を行う施設
3. 学会等名 第65回日本実験動物学会総会 動物福祉・倫理委員会シンポジウム (招待講演) (招待講演)
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 三好一郎
2. 発表標題 実験動物の飼養及び保管並びに苦痛の軽減に関する基準の解説 個別基準：実験等を行う施設
3. 学会等名 日本実験動物技術者協会北海道支部第43回支部通常総会講演会 (招待講演)
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 三好一郎
2. 発表標題 大学における学生・研究者を対象とした教育訓練
3. 学会等名 日動協教育フォーラム2019 (招待講演)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 末田輝子, 三好一郎, 笠井恵雪
2. 発表標題 ブタを用いた動物実験への看護的視点の導入
3. 学会等名 第160回日本獣医学会学術集会, 日本実験動物医学会シンポジウム (招待講演)
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 三好一郎
2. 発表標題 外部検証, 認証による動物実験機関管理の促進
3. 学会等名 第64回日本実験動物学会総会 動物福祉・倫理委員会シンポジウム (招待講演)
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 末田輝子, 三好一郎, 笠井恵雪
2. 発表標題 飼育技術者が行う看護的飼育ケアの実際－技術者が説く動物実験計画書－
3. 学会等名 第42回日本実験動物技術者協会関東支部懇話会シンポジウム (招待講演)
4. 発表年 2017年

〔図書〕 計3件

1. 著者名 三好一郎	4. 発行年 2018年
2. 出版社 朝倉書店	5. 総ページ数 228
3. 書名 発生工学・獣医学教育モデル・コア・カリキュラム準拠実験動物学 (第2版, 久和茂編)	

1. 著者名 三好一郎 (実験動物飼養保管基準解説書研究会)	4. 発行年 2017年
2. 出版社 アドスリー	5. 総ページ数 198
3. 書名 4章個別基準4-1実験を行う施設・実験動物の飼養及び保管並びに苦痛の軽減に関する基準の解説 (環境省 自然環境局総務課動物愛護管理室編)	

1. 著者名 三好一郎	4. 発行年 2017年
2. 出版社 アドスリー	5. 総ページ数 36
3. 書名 実験動物・動物実験施設の取組み 大学等・明日の幸せは健康から (改定版) NPO法人動物実験関係者連絡 協議会編	

〔産業財産権〕

〔その他〕

<p>病態モデル動物の開発を通じて各種疾患のメカニズムを解明し、予防・診断・治療法創出に貢献する http://www.med.tohoku.ac.jp/about/laboratory/099.html 病態モデル動物の開発を通じて各種疾患のメカニズムを解明し、予防・診断・治療法創出に貢献する http://www.med.tohoku.ac.jp/about/laboratory/099.html</p>

6. 研究組織			
	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
研究 分 担 者	北村 浩 (Kitamura Hiroshi) (80312403)	酪農学園大学・獣医学群・教授 (30109)	

6. 研究組織（つづき）

	氏名 (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
研究 協力 者	原田 伸彦 (Harada Nobuhiko)		