

令和 4 年 5 月 17 日現在

機関番号：14401
研究種目：研究活動スタート支援
研究期間：2020～2021
課題番号：20K23001
研究課題名（和文）卵管上皮への電気穿孔法による高効率な遺伝子改変卵巣がんモデルマウスの作製法の確立

研究課題名（英文）Establishment of a novel genetically engineered mouse model that spontaneously develops ovarian cancer by introducing targeting plasmids into fallopian tube epithelium by in vivo electrophoresis

研究代表者
香林 正樹（Kobayashi, Masaki）

大阪大学・医学系研究科・招へい教員

研究者番号：30880786
交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 2,200,000円

研究成果の概要（和文）：予後不良な卵巣がんの発生・進展機構を解明し、様々な新薬の抗腫瘍効果を正常な免疫を持つ動物モデルで予測するために、卵巣がんが自然発症する新規の遺伝子改変モデルマウスの作製を目指した。しかし、当初の計画における卵管上皮へ電気穿孔法にて標的遺伝子をノックアウトまたは高発現させるプラスミドを導入するのは非常に効率が悪いことに直面した。そこで研究計画を変更し、我々が既に樹立している数十種類の患者由来腫瘍卵巣同所移植(PDX)マウスモデルを用いて、PDX腫瘍を3次元オルガノイド培養ならびに腫瘍片のExplant培養にて治療薬の抗腫瘍効果を検討するプラットフォームを確立した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

予後不良な卵巣がんに対する治療薬の抗腫瘍効果を検討するモデルとして、当初の計画を変更したが、患者由来腫瘍卵巣同所移植(PDX)マウスモデルを基に、PDX腫瘍を3次元オルガノイド培養ならびに腫瘍片のExplant培養にて治療薬の抗腫瘍効果を検討する有用な実験系を確立した。我々の卵巣がんPDXモデルマウスは高確率で樹立することが可能であり、一度樹立すればマウス体内にて継代し腫瘍を理論上無限に増幅することが出来る。よって本研究成果により、大量のPDX腫瘍片を用いて多くの候補薬のヒトでの抗腫瘍効果をより正確に再現性を持って確認することが可能となった。

研究成果の概要（英文）：For evaluating the effects of various new anti-tumor drugs in vivo on poor-prognosis ovarian cancer, we aimed to establish a novel genetically engineered mouse model that spontaneously develops ovarian cancer. However, we found the method was so inefficient that we could not introduce targeting plasmids into fallopian tube epithelium by in vivo electrophoresis very much. We changed our initial experimental plan and developed a new platform of 3D organoid culture and tumor chunks “explant” culture by utilizing our orthotopic patient-derived xenograft (PDX) ovarian cancer mouse model. This platform enables us to evaluate new anti-tumor drugs efficiently and accurately.

研究分野：婦人科癌、卵巣癌、分子標的治療、ゲノム医療、個別化医療

キーワード：卵巣癌 PDX 3次元培養 抗腫瘍効果予測 個別化医療

1. 研究開始当初の背景

卵巣がんは標準治療である手術と化学療法を実施しても大部分の進行がんは再発し、致死的となる予後不良な疾患である。これまで多くの基礎・臨床研究が行われてきたが、この 30 年間で治療成績の向上は殆ど見られていない。卵巣がんは早期発見可能な検診方法は確立されておらず、診断時には約半数が進行がんで見つかる。この進行卵巣がんの最も高頻度かつ特徴的な転移・再発形式は腹膜播種であり、この病態が進行すると癌性腹膜炎から腸閉塞や水腎症等を併発し、患者の全身状態は急速に悪化する (Lengyel E. Am J Pathol. 2010)。

卵巣がんの発がん機構の解明、早期診断方法の開発、分子標的治療や免疫治療を含む新規治療法の確立のためには、ヒト卵巣がんの病態を忠実に模倣する卵巣がんモデルマウスが必要とされる。これまでのモデルマウスの殆どが卵巣がん細胞株の免疫不全マウスへの腹腔内移植による Cell line-derived xenograft (CDX) である。しかし CDX が可能な細胞株は限られており、また近年の遺伝子解析より従来より頻用されてきた細胞株が実は卵巣がんの典型的な遺伝子変異パターンを示していないことが明らかとなった (Domche S. Nat Commun. 2013)。例えば最も汎用されてきた細胞株 SKOV3 は高異型度漿液性卵巣癌 (High-grade serous ovarian carcinoma; HGSOC) として必須ともいえる *TP53* の変異を有していない。そのような問題が解決するために近年、高度免疫不全マウスやラットに患者由来の腫瘍組織の一部を移植することにより腫瘍の Heterogenicity を忠実に再現する Patient-derived xenograft (PDX) model が導入されている。しかしながら、PDX は免疫不全動物を用いるため、今後の臨床で重要な免疫チェックポイント阻害剤などの Preclinical での治療効果を確認することができない。すなわち、今後の卵巣がん研究のためには卵巣がんが自然発生する遺伝子改変モデルマウス (Genetically Engineered Mouse Model; GEMM) の作製が必要である。ところが、従来のコンディショナルノックアウト法はマウスの交配を要するため、莫大な費用と時間を要するという問題点があり、どの研究者でも容易に扱うことは困難である (Stuckelberger S. J Pathol. 2018)。従って、卵巣がんの予後を改善するために、より安価で短時間で誰でも効率よく作成できる卵巣がん GEMM の確立が必要と考えた。

卵巣がん GEMM の作成のために卵巣がんの発生母地を改めて考察した。約 10 年前までヒト卵巣がんの起源は卵巣だと考えられていたが、近年の病理学的検索や次世代シーケンサーの技術により、卵巣がんの大半の起源が卵巣表層上皮細胞ではなく分泌型卵管上皮細胞であると証明されてきた (Labidi-Galy SI. Nat Commun. 2017、Ducie J. Nat Commun. 2017、Zhang S. Nat Commun. 2019)。つまり、卵巣がんの大部分を占める組織系である HGSOC は、卵管上皮細胞に

まず *TP53* 変異が入り (p53 signature)、次に上皮内癌 (Serous tubal intraepithelial carcinoma; STIC) が発生し、浸潤がんである HGSOC となり、腹膜播種などの進展をきたす (図 1)。すなわち、卵管上皮細胞特異的に発癌のために必要な遺伝子導入を効果的に起こすことができれば、卵

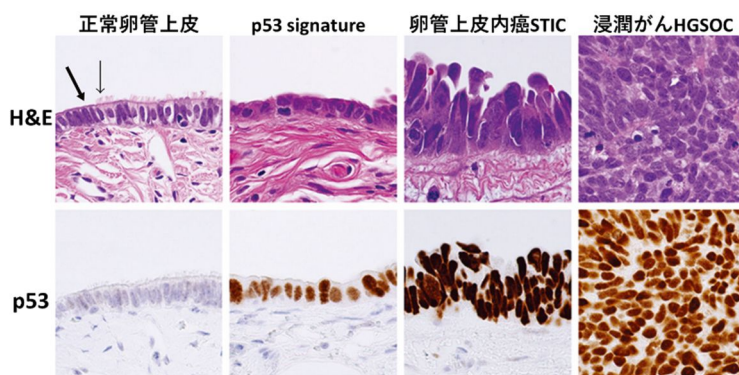


図1 正常卵管上皮細胞からHGSOCへの発がんの病理組織学的検討 (Karst AM. J Oncol. 2010;2010:932371. を改変)

巣がん GEMM が作成できると考えた。そして、McGill University の Dr. Yojiro Yamanaka らは

卵管に電気穿孔法を行うことに高率に着床前の受精卵に遺伝子導入する方法を開発している (Yamanaka Y. Methods Mol Biol. 2016)。彼らの基礎検討では同法により卵管上皮にも高率に遺伝子改変が導入されると報告している。

以上の背景をもとに、正常免疫雌マウスの卵管特異的に遺伝子改変を行い、新規の卵巣がん GEMM を作成する研究計画を立案した。本法は受精卵に遺伝子改変を加える必要がなく、かつ交配を必要としない。すなわち、開発されれば安価でありかつ再現性も高く、卵巣がんに対する様々な抗腫瘍薬の評価に応用することの可能な画期的な方法であると考えた。

2. 研究の目的

本研究は、ヒト卵巣がんの発がんと進展する病態を模した新規の卵巣がんモデルマウス GEMM の作製方法を確立することを目的とした。そしてこの卵巣がん GEMM を用いて発がん機構の解明、早期診断方法の開発、各抗腫瘍薬を用いた新規治療法の確立についての研究へと応用していくことである。我々の新しい卵巣がん GEMM 作成方法は従来とは異なる非常に独創的な手法であり、安価で有用な卵巣がん GEMM が確立されればその応用範囲は非常に広く、世界中の卵巣がん研究を加速させる大きなインパクトを持つと考えた。

3. 研究の方法

(1) 新規遺伝子導入法によって遺伝子変異が *in vivo* にマウス卵管上皮細胞へ導入できるか確認する

4-6 週齢のメスの C57BL/6 マウスを麻酔下に開腹し、卵管遠位端の上皮細胞に電極を接触させることで通電させ、細胞膜に微小な穴をあけてその内部に変異導入核酸を送り込み (電気穿孔法)、卵管上皮細胞に遺伝子変異を発現させる (図 2)。変異導入は、標的遺伝子をノックアウトする CRISPR-Cas9 法と、逆に標的遺伝子を導入/高発現させる Piggybac 法を組み合わせで行う。標的遺伝子は、ヒトの卵巣がん細胞において変異の頻度が高いと報告のあるものとする (Cancer Genome Atlas Research Network. Nature. 2011)。すなわち、CRISPR-Cas9 法でノックアウトさせるがん抑制遺伝子は *Brcal*、*Tp53*、*Pten*、*Lkb1*、Piggybac 法で高発現させるがん遺伝子は *Myc*、*Mecom*、*Pax8* を予定している。これら標的遺伝子変異の組み合わせは過去の GEMM の報告 (Perets R. Cancer Cell. 2013、Zhai Y. J Pathol. 2017、McCool KW. Cancer Res. 2020) を踏まえて、以下のものを想定している (*Brcal-Tp53-Lkb1-Myc+*、*Brcal-Tp53-Myc+ Pax8+*、*Tp53-Pten-Lkb1-Myc+ Mecom+*)。もしこれらの組み合わせで卵巣がん発がんが見られない場合はさらに様々な遺伝子変異の組み合わせを試す。

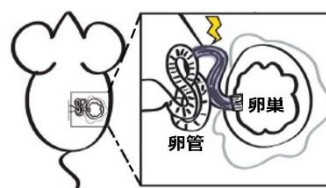


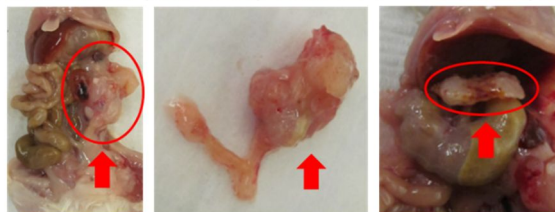
図2 電気穿孔法でマウスの卵管へ変異プラスミドを導入

変異プラスミドの卵管上皮細胞への導入が成功したか否かの確認は、変異プラスミドに挿入された赤色蛍光タンパク質 RFP の発色で判定する。電気穿孔から 1 ヶ月後に、赤色発光している卵管上皮細胞としていない細胞をそれぞれ摘出し、Single cell にして RNA を抽出し、次世代シーケンサー (Miseq) で RNA sequencing を行い両者の遺伝子発現を解析し比較する。その結果、電気穿孔を行った細胞のみに標的遺伝子の変異を認めれば、マウスの卵管細胞への遺伝子変異に成功したと証明できる。電気穿孔法を用いた卵管上皮細胞への変異プラスミド導入が成功することについては、既にいくつかのがん抑制遺伝子のノックアウトで確認済である。本研究については先行して研究を開始している McGill University の Dr. Yojiro Yamanaka との共同研究にて行い、新しい卵巣がんを発症する GEMM の作成を目指す。

(2) 我々が樹立している卵巣がん同所移植 PDX マウスモデルの PDX 腫瘍を用いて、*In vitro* の実験系にて 3 次元オルガノイド培養ならびに *Ex vivo* での Explant 培養にて各種薬剤の抗腫瘍効果を検討するモデルを確立する

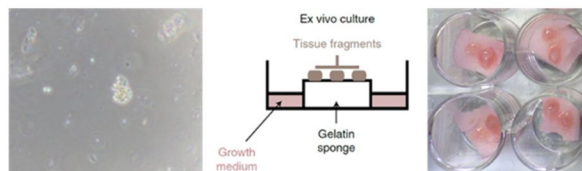
我々はヒト卵巣がんの腫瘍進展を忠実に再現する卵巣がん同所移植 PDX マウスモデルを数十種類確立している。また PDX モデルによる抗腫瘍効果は、従来の細胞株を用いた CDX モデルに比べてヒトにおける臨床の抗腫瘍効果と相関が高いとされ、薬剤の臨床応用において PDX モデルによる検討が近年重要視されてきている。我々の PDX モデルではヒト腫瘍を手術・生検時に採取し、清潔操作下にて細切し、一部は凍結保存とホルマリン固定し組織学的評価用検体とした。1 mm³ 大に細切されたヒト腫瘍片 3 個ずつを、全身麻酔下で開腹された免疫不全マウス (ヌードマウス) の卵巣に同所移植した。数か月かけて増大していく PDX 腫瘍を触診または経腹超音波にて経時的に観察し、腫瘍が 1500 mm³ に達した際あるいは腹膜播種などでマウスの全身状態が不良となった際は人道的な観点よりマウスを安楽死させたのち、開腹し増大した腫瘍を回収した (図 3)。この採取した PDX 腫瘍を同様に細切し、次のヌードマウスに移植し、順次 PDX マウスの継代を行う。このマウス体内での継代を繰り返すことで、腫瘍を理論上無限に増幅することが可能となり、十分な PDX 腫瘍を作成した。

図 3 卵巣がん卵巣同所移植 PDX モデルにおける左卵巣腫瘍 (左、中央) と肝下面への転移巣 (右)



本研究では卵巣中腎管癌 PDX モデル OU-UT3 を用いた。卵巣中腎管癌は卵巣がんの中で頻度が少なく希少であるが、高率に再発をきたすと報告されている。しかしながら、その希少性のためにどのような治療法が奏功するのか未だ解明されていない。まず、作成した PDX 腫瘍を用いて、3 次元オルガノイド培養を行い (図 4)、各種の既存の抗癌剤の感受性を検討した。抗腫瘍効果の評価は Cell viability assay (CellTiter-Glo® 2.0 Cell Viability Assay, Promega) に行った。また、この PDX 腫瘍を用いた *Ex vivo* Patient-Derived Explant (PDE) 培養モデルでも抗腫瘍効果の評価した。PDE モデルは腫瘍と間質が混ざり合った 3 次元環境である *Ex vivo* 培養であり、我々は過去の報告 (Nature. 2015;523:313-317.) を参考にしてこの実験系を確立した (図 4)。ヒト腫瘍と同じ性質を持つ PDX 腫瘍を用いて、より生体内に近い 3 次元環境の短期間 PDE 培養にて既存の抗癌剤が真に奏功するかを Ki-67 の免疫組織化学染色にて検証した。

図 4 中腎管癌 PDX 腫瘍を用いた 3 次元 Organoid 培養 (左)、*Ex vivo* PDE 培養 (中央、右)



4. 研究成果

(1) 新規遺伝子導入法によって遺伝子変異が *in vivo* にてマウス卵管上皮細胞へ導入できるか確認する

当初の上記の計画のように卵管上皮へ電気穿孔法にて標的遺伝子をノックアウトまたは標的遺伝子を高発現させるプラスミドを *In vivo* にて導入させる方法を試行錯誤してみたが、この方法では遺伝子導入効率が非常に悪いことに直面した。McGill University の Dr. Yojiro Yamanaka とともに各種トラブルシューティングを試みたが、本科研費での研究期間内ではこの新規方法による GEMM の作成が困難であると判断し、別の方法で多くの候補薬の抗腫瘍効果の評価する

実験系を確立する目的で(2)の方法で研究を実施した。

(2) 我々が樹立している卵巣がん同所移植 PDX マウスモデルの PDX 腫瘍を用いて、*In vitro* の実験系にて 3 次元オルガノイド培養ならびに *Ex vivo* での Explant 培養にて各種薬剤の抗腫瘍効果を検討するモデルを確立する

卵巣中腎管癌 PDX 腫瘍を用いた 3 次元オルガノイド培養と *Ex vivo* PDE 培養では、既存の抗癌剤 (Adriamycin, Carboplatin, Cisplatin, Paclitaxel, Fluorouracil) の抗腫瘍効果を調べた。3 次元オルガノイド培養、*Ex vivo* PDE 培養ともに濃度依存性に抗腫瘍効果を認めたと、Paclitaxel にて最も強い濃度依存性の抗腫瘍効果を認めた (図 5)。増幅した PDX 腫瘍を用いて繰り返し同様の実験を行い、再現性があることを確認した。

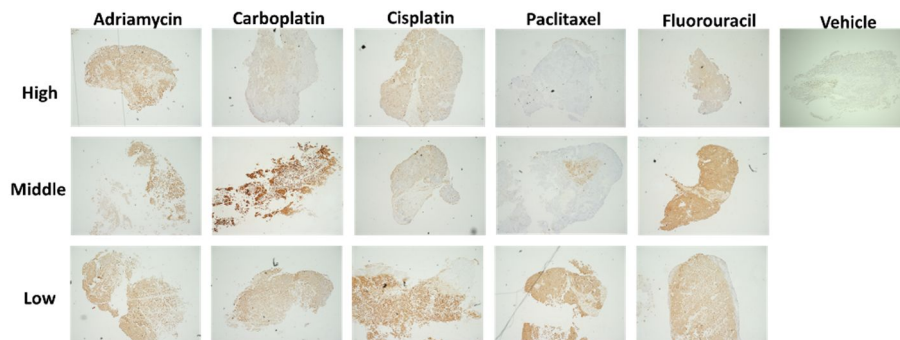


図5 中腎管癌 PDX 腫瘍を用いた *Ex vivo* PDE 培養の抗 Ki-67 抗体を用いた免疫組織化学 (“High”、“Middle”、“Low” はそれぞれの薬物の濃度を示す。Adriamycin 1, 10, 100 nM、Carboplatin 0.5, 5, 50 μ M、Cisplatin 0.5, 5, 50 μ M、Paclitaxel 0.5, 5, 50 nM、Fluorouracil 1, 10, 100 μ M。)

本研究期間内では、予後不良な卵巣がんの発生・進展機構を解明し、様々な分子標的治療薬の抗腫瘍効果を正常な免疫を持つ動物モデルで予測するための、新規の卵巣癌 GEMM の作製を完遂することが出来なかった。そこで研究計画を変更し、我々が既に樹立している数十種類の患者由来腫瘍卵巣同所移植マウス PDX モデルを用いて、PDX 腫瘍を 3 次元オルガノイド培養ならびに *Ex vivo* での PDE 培養にて治療薬の抗腫瘍効果を検討するモデルを確立することが出来た。我々の卵巣がん PDX モデルマウスは 80% 以上の高確率で樹立することが可能であり、一度確立すればマウス体内にて継代し腫瘍を理論上無限に増幅することが出来る。よって本研究成果により、大量の PDX 腫瘍片を用いて多くの候補薬の抗腫瘍効果を *In vitro*、*Ex vivo* の系にて確認することで、*In vivo* の系よりも非常に安価で効率の良い投薬実験をすることが可能となった。今後は PDX マウスモデル、3 次元オルガノイド培養、PDE 培養を用いて多くの婦人科がんの新規治療開発に応用していく。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計1件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 Kanako Kasuya, Yasuto Kinose, Michiko Kodama, Kae Hashimoto, Kenjiro Sawada, Tadashi Kimura
2. 発表標題 Development of a patient-derived xenograft model of gynecologic mesonephric carcinoma for rare tumor precision medicine
3. 学会等名 第80回日本癌学会学術総会
4. 発表年 2021年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

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
研究協力者	木瀬 康人 (Kinose Yasuto) (90778531)	大阪大学・医学系研究科・助教 (14401)	
研究協力者	粕谷 香南子 (Kasuya Kanako)	大阪大学・医学系研究科・大学院生 (14401)	
研究協力者	王 妍 (Wang Yan)	大阪大学・医学系研究科・大学院生 (14401)	
研究協力者	岡村 綾子 (Okamura Ayako) (40910253)	大阪大学・医学系研究科・技術補佐員 (14401)	

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8 . 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------