

# 多段階変異によるヒト類似癌モデルマウスの作出と解析

群馬大学 先端科学研究指導者育成ユニット  
山本 正道

## 1. はじめに

がん治療における重要な課題は、早期発見と転移腫瘍細胞のゲノム情報の抽出である。現状では早期発見は定期健診によって行われているが、微小転移・転移早期における検出は困難である。また、悪性度が高い転移腫瘍は全身検診によって転移腫瘍が発見された場合、転移癌細胞を治療するためのゲノム情報は抽出されることなく、必要かつ可能な場合に限り生検で一部の癌細胞を採取し、限られた病理及び遺伝型鑑定をする。そのため臨床癌を経時的に解析することは治療観点と倫理面から不可能である。従って、ヒトがん細胞を模倣した生組織を安定的に得られ、発がん期から悪性期までを経時的に病理・細胞レベルとゲノムレベル両解析が可能となるシステムの開発・利用は、今後の癌治療研究領域の展開上価値が非常に高い。これを可能にする悪性膵がんモデルマウスを開発し、ここから得られる病変組織を利用し新規標的分子を探索すること及び薬理的試験への有用性を検討することを目的とする。これまでに様々な膵がんモデルマウスが作製されてきたが、臨床サンプルとの相同性及びサンプル間の安定性が低く、これまでの膵がんモデルマウスを用いて解析しても更なる新規ターゲット分子を見出すことは困難であった。例えば、p53欠損マウスではsarcoma様の癌が増える傾向にあり、K-Ras変異マウスではヒトの癌にmimicしているが、これら単独の変異ではほとんどがPanINで留まっており、一部で癌が進行したが組織学的にもバリエーションに富んでいた。この理由を探っていた結果、遺伝子変異のタイミング及び遺伝子変異後の経時時間と共に遺伝型へバリエーションが蓄積されていくことが明らかとなっていった。そこで、タイミング及びバリエーションを最適化した膵がんモデルマウスを開発しなければ新規ターゲット分子を見出すことは不可能であると考えた。

膵臓癌患者では遺伝子変異及びこの段階的変異の蓄積が臨床的知見としてよく知られている。特に、Pancreas ductal adenocarcinomaが発症する過程で変異する遺伝子変異は第一段階目（膵臓癌初期変異）として *K-Ras (G12D)* 変異と *INK4a/ARF* 変異が知られている。続いて、第二段階目（膵臓癌後期変異）として *p53* 変異、*Smad4* 変異、*BRCA2* 変異が知られている。このため、膵臓特異的な2段階の経時的変異によりヒト膵臓癌を模倣する事にした。

## 2. 方法

### ES細胞培養と樹立

ES細胞はC57BL/6Jから樹立したES細胞とBDF1から樹立したHaploid ES細胞を使用した。培養はMEF細胞をフィーダー細胞として使用し、modified Stem Cell mediumを用いて通常の方法に基づいて行った。Haploid ES細胞はBDF1 10週齢雌にhCG処理を行った後、第2減数分裂中

期の受精卵を回収後にストロンチウム活性化培地で活性化した後に M16 培養液にて Blastocyst まで培養して、これを 2i (PD0325901 と CHIR99021) 入り ES 細胞培養液で培養する事により得た(参考文献 1)。Haploid ES 細胞の確認は FACS で行った。

### 遺伝子改変

BAC recombination 法を用いて作製したターゲティングベクターを直線化した後にエレクトロポレーション法で ES 細胞に導入して遺伝子組換えを行った。耐性薬剤は neomycin, puromycin, hygromycin を用いた。ES 細胞内での相同組換えは PCR 法, Real-time PCR 法, Southern Blotting 法にて確認した。

## 3. 結果

### ES 細胞内での遺伝子改変の途中経過

膵臓癌患者で見られる遺伝子変異及びこの段階的変異の蓄積をマウス作製に応用して、多段階型自然発がんマウスを作出することにより、悪性膵がんモデルマウスを開発する。

Pancreas ductal adenocarcinoma を発症する様に膵管腺で遺伝子改変が誘導的に起こる構築にする。そのため Tet-ON システムと SCre-Slox システム、CreER-lox システムを使用した構築にする(参考文献 2)。Pdx1 の転写開始点に Doxycycline で機能が誘導される rtTA を挿入。その受け手の TetO をマウス ROSA26 領域へ挿入して、その下流に SCre を挿入する。第一段階目(膵臓癌初期変異)として临床上知られている K-Ras (G12D) 変異が SCre の機能した部位特異的に発現するように SLoxP で STOP 配列を挟んだ構築を K-Ras (G12D) の上流に挿入、また INK4a/ARF も同様の SCre の機能した部位特異的に欠損するように SLox2272 を挿入する。

更に、第二段階目(膵臓癌後期変異)として同じく临床上知られている p53 変異、Smad4 変異、BRCA2 変異を誘導的に導入する。このため、Pdx1-rtTA の下流に 2A peptides で CreER を結合させる。更に 3 つの遺伝子を LoxP, Lox511, Lox2272 で挟んだコンディショナルノックアウトマウスを構築する。これにより Tamoxifen 投与による CreER が核へ移行する事により p53, Smad4, BRCA2 が欠損するように構築する。現在、SLoxP で挟まれた STOP 配列を K-Ras (G12L) の上流へ挿入し、p53 遺伝子は loxP 挿入にて両アレル改変した。Smad4 は lox511 にて片アレル改変した。

作出時間を短縮するため、これらを全ての遺伝子組み換えを ES 細胞内で行う。これらの変異をホモ変異で有した ES 細胞からテトラプロイド法により直接使用可能な悪性膵がんモデルマウスを作製する。

### Haploid ES 細胞を用いた遺伝子改変のための準備

作出時間を短縮するため、2011 年に樹立と生殖系列移行が報告された Haploid ES 細胞を用いて試みる事にした(参考文献 3)。Haploid ES 細胞は通常の Diploid ES 細胞と異なり、片アレルしか持たないため一度ターゲティングすると遺伝子はヌルとなる。これを用いれば約半分のターゲティングで目的が達成される。そこでまず、Haploid ES 細胞の樹立を行った。樹立効率を比較するために通常の ES 培養液(Stem Cell Medium)と 2i を含んだ ES 培養液の両方で比較検討した。ES 様細胞の樹立成績は通常の ES 培養液の方では 32% (6/19)であったが、2i を含んだ ES 培養液の方では 50% (10/20)であった。また、この樹立した ES 様細胞を FACS にて解析を行い、Haploid

ES細胞とDiploid ES細胞を選別する試みを行った。結果、Haploid ES細胞は通常のES培養液の方では0% (0/6)であったが、2iを含んだES培養液の方では20% (2/10)であった。この樹立したHaploid ES細胞を用いてターゲティングするために性状解析を行った。最初にHaploid ES細胞が生殖系列移行するかを確認するために、アグリゲーション法にてキメラマウス作製を行った。MEF細胞上で継代を行っていないHaploid ES細胞ではキメラマウスが全く得られなかった(0%, 0/50)。しかしMEF細胞上で4回継代を行ったHaploid ES細胞ではキメラ率は10%程度であったが、キメラマウスが得られた(6.7%, 3/45)。また、Haploid ES細胞での未分化マーカー遺伝子の発現を調べた所、Oct3/4の発現は正常であったが、Nanogの発現は低下していた。これより、Haploid ES細胞を用いたターゲティング及びキメラマウス作製には更なる樹立や継代などの検討が必要である。

#### 4. まとめ

現在、SloxPで挟まれたSTOP配列をK-Ras (G12L)の上流へ挿入し、p53遺伝子はloxP挿入にて両アレル改変した。Smad4はlox511にて片アレル改変した段階である。今後、Smad4を両アレル改変すると共にINK4a/ARF, BRCA2を改変する。更にPdx1下流にrtTA-2A peptides-CreERを挿入する。またROSA26領域にTet0-SCreを挿入したES細胞を作製していく予定である。

Haploid ES細胞を用いたターゲティングを行う事で、当初予定していた遺伝子改変回数を抑制しようとした。しかし、現段階では改変したES細胞を用いてキメラマウスにする事が困難である事より通常のES細胞を用いた方法を行っていく。またHaploid ES細胞を用いてキメラマウス率及び生殖系列移行率を上げるため、樹立方法の検討、培養方法の検討等を行っていく。

#### 5. 参考文献

参考文献1: Ying, Q.L., Wray, J., Nichols, J., Battle-Morera, L., Doble, B., Woodgett, J., Cohen, P. and Smith, A. (2008) The ground state of embryonic stem cell self-renewal. *Nature* 453: 519-23

参考文献2: Suzuki, E. and Nakayama, M. (2011) VCre/VloxP and SCre/SloxP: new site-specific recombination systems for genome engineering. *39*: e49

参考文献3: Leeb, M. and Wutz, A. (2011) Derivation of haploid embryonic stem cells from mouse embryos. *Nature* 479: 131-134