

2022年11月9日

報道解禁 2022年11月16日 午前0時（日本時間）

報道関係者 各位

子宮内膜がんモデルマウス作製の迅速化に成功

- 子宮内膜がん治療薬開発への貢献が期待-

1. 本件のポイント

- これまで子宮内膜がんモデルマウスを作製するためには複数の遺伝子改変マウス^{*1}を交配して子孫を得る必要があり、作製するためには時間（概ね1年以上）と手間を要した。
- CRISPR/Cas9システム^{*2}を応用することで、交配などを経ずに生体マウスの子宮上皮細胞を直接ゲノム編集する方法を開発した。
- ゲノム編集により子宮内膜がんの原因となる複数の遺伝子変異を野生型マウス^{*3}の子宮上皮細胞に同時導入することにより、短期間（3ヶ月）で子宮内膜がんを発症させることに成功した。
- 本技術では、変異させる遺伝子の種類や数を自在にカスタマイズすることができる。この特徴により、例えばヒトのがんで発見された新たな遺伝子変異が子宮内膜がん発症の原因であるかどうかを迅速に検証できる可能性を秘めている。
- 今後このモデルを利用した子宮内膜がん治療標的の探索や、投薬試験による治療薬の検証などを通じて、子宮内膜がん新規治療薬・治療法開発への貢献が期待できる。

2. 本件の概要

子宮内膜がん（子宮体がんとも呼ばれます）は、日本の婦人科領域で年間の新規患者数が最も多いがんです。子宮内膜がん研究には、遺伝子改変によって子宮内膜がんを自然発症するモデルマウスが用いられています。しかし、子宮内膜がんを発症するような遺伝子型を持ったマウスを得るためには、異なる遺伝子改変マウス系統を繰り返し交配させて子孫を得る必要があり、モデルマウスを作製するために多大な時間と労力が費やされてしまうことが問題でした。

今回、群馬大学生体調節研究所ゲノム科学リソース分野の畑田出穂教授、小林良祐日本学術振興会特別研究員、堀居拓郎准教授、森田純代助教のグループは、群馬大学未来先端研究機構の西山正彦名誉教授および川端麗香講師、北里大学獣医学部の杉山真言助教、群馬大学医学系研究科の小山徹也教授、東海大学医学部の大塚正人教授との共同研究で、CRISPR-Cas9システムによるゲノム編集技術を応用し、マウスの子宮上皮細胞を直接ゲノム編集することで、子宮内膜がんを発症するモデルマウスを迅速（3ヶ月）かつ高効率に作製する方法を開発しました。この新たな技術は、子宮内膜がん発症の原因解明や新規治療薬開発に貢献することが期待されます。本研究は、生命科学・創薬研究支援基盤事業（BINDS）「ゲノム、エピゲノム編集疾患モデル動物の作出支援」（研究代表者：畑田 出穂）の一環で行われました。

本成果は日本時間11月16日午前0時に国際科学雑誌「International Journal of Cancer」のオンライン版に掲載されます。

3. 研究の背景

子宮内膜がんは、日本の婦人科領域で年間の新規患者数が最も多いがん種です。子宮内膜がんのリスク因子としては肥満、食の欧米化、出産の高齢化などが挙げられ、現代社会におけるライフスタイルを鑑みると今後も患者数が増加することが懸念されます。

子宮内膜がんでは、PTEN^{*4}と呼ばれる遺伝子に変異がある症例が約80%を占めており、PTEN変異が生じた細胞では増殖が促されることによって発がんに寄与していると考えられています。ほとんどの子宮内膜がん症例では、PTEN以外の遺伝子にも変異が同時に発生しています。PTENの変異だけでは子宮内膜がんの発症に不十分であることが過去の研究から分かっており、複数の遺伝子変異が組み合わさることが子宮内膜がんの発生に重要だと考えられていますが、どのような組み合わせが重要かなど、不明な点は数多く残されています。

子宮内膜がん発症の原因となる遺伝子変異を明らかにするため、また子宮内膜がんの新規治療法の開発のため、これまで遺伝子改変マウスを用いた子宮内膜がん自然発症モデルが研究に用いられてきました。このモデルでは、Cre/loxPシステム^{*5}を使って狙った遺伝子が子宮特異的に破壊されることにより、子宮内膜がんを発症します。モデル樹立のためには、複数の遺伝子改変マウスを交配させ、目的の遺伝子型を持った個体を選抜する必要があるため、研究を開始するまでに多大な労力と時間（概ね1年以上）を要するということが問題でした。また、ヒトのがんで認められるように複数の遺伝子変異を同時に発生させようとすると、さらに他の遺伝子改変マウスとの交配を追加する必要があるため、複数遺伝子の同時変異ががん病態に及ぼす影響を評価する研究は非常に難しいものでした。

4. 研究の成果

4-1. マウス子宮上皮への生体内ゲノム編集法の開発

子宮内膜がんモデルマウスをより迅速に作出するために、今回私たちはCRISPR/Cas9ゲノム編集法に注目しました。このゲノム編集技術では、Cas9タンパク質と複合体を形成したガイドRNAが、狙ったゲノム領域を認識して結合し、その後Cas9タンパク質によってDNA二本鎖が切断されることにより変異が導入されます。私たちは、子宮内膜がんの原発である子宮上皮細胞に、エレクトロポレーション法^{*6}によってこのCas9タンパク質とガイドRNAの複合体（Cas9-Ribonucleoprotein, Cas9-RNP）を直接送達することにより、生体内でゲノム編集を実行し遺伝子変異を導入できないかと考えました。生体内ゲノム編集でがんを発症させる技術は肝臓や膵臓などですでに報告がありましたが、これまで子宮での報告はありませんでした。また、生体内ゲノム編集ではCas9やガイドRNAを発現するプラスミドDNA^{*7}を細胞に送達する方法が主流であり、Cas9-RNPでがんを誘導できるかも不明でした。

麻酔下のマウスの子宮内にCas9-RNPを注入し、その後速やかにピンセット型の電極で子宮を挟み電気刺激を与えることで、細胞に一過性の孔が生じてCas9-RNPが細胞内に送達されます（**図1左**）。ゲノム編集が生じると蛍光タンパク質を発現するレポーターマウス（東海大学・大塚正人教授らが開発）を使用して確認したところ、狙い通り子宮上皮細胞だけでゲノム編集ができていたことがわかりました（**図1右**）。

4-2. 子宮内膜への生体内ゲノム編集による子宮内膜がんモデル作出

続いて、子宮内膜がんとの関連が知られていた3つの遺伝子（Pten、Trp53^{*8}、Lkb1^{*9}）を破壊するようなゲノム編集を、野生型のマウスの子宮で実施しました。先ほど紹介した方法でゲノム編集を実施し3ヶ月後に子宮を観察したところ、単独の遺伝子を標的としたマウスではいずれも肉眼観察で子宮の異常を認めませんでしたが、PtenとLkb1を組み合わせるゲノム編集時に明瞭な腫瘍を発症させることに成功しました（**図2**）。また腫瘍の発生率は、Pten、Trp53、Lkb1の3遺伝子を同時にゲノム編集した時に最も効率が良いこともわかりました（**図2**）。組織学的な観察から、腫瘍は確かに子宮内膜がんであることがわかりました。また発生した腫瘍のDNAを抽出して解析したところ、3つの遺伝子に機能欠損型の変異が発生していることが確認できました。

子宮内膜がんではCTNNB1遺伝子^{*10}の機能活性化型変異も認められます。ゲノム編集に用いるガイドRNAの種類を変更し、この遺伝子変異を再現するようなゲノム編集を実施したところ、Ctnnb1変異をPtenおよびLkb1のゲノム編集と組み合わせた時に、Pten、Trp53、Lkb1の組み合わせの時よりもさらに大きな腫瘍を発生させることがわかりました。

図1：マウス子宮上皮細胞のゲノム編集方法(左)とゲノム編集の確認(右)

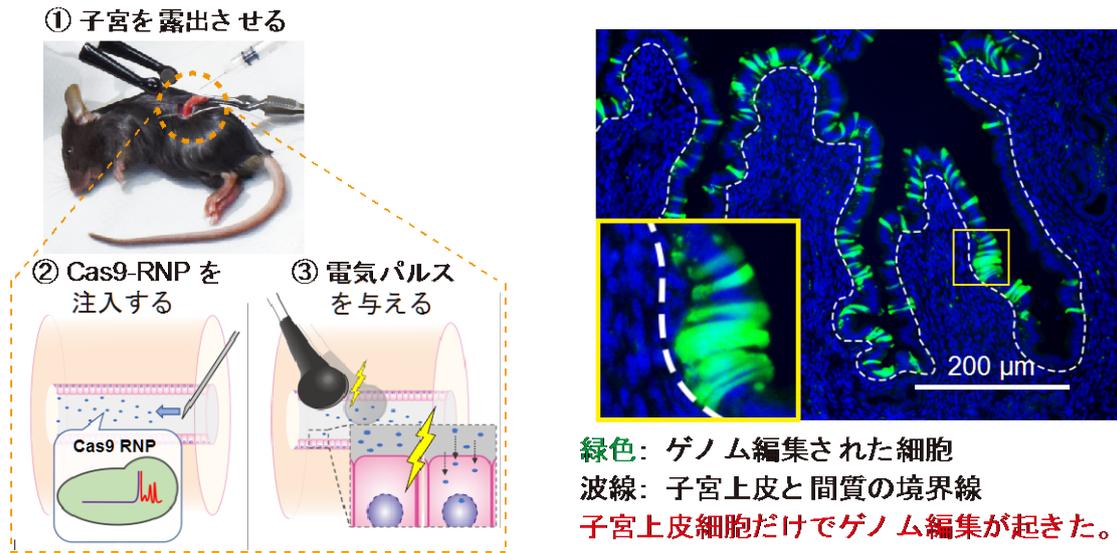
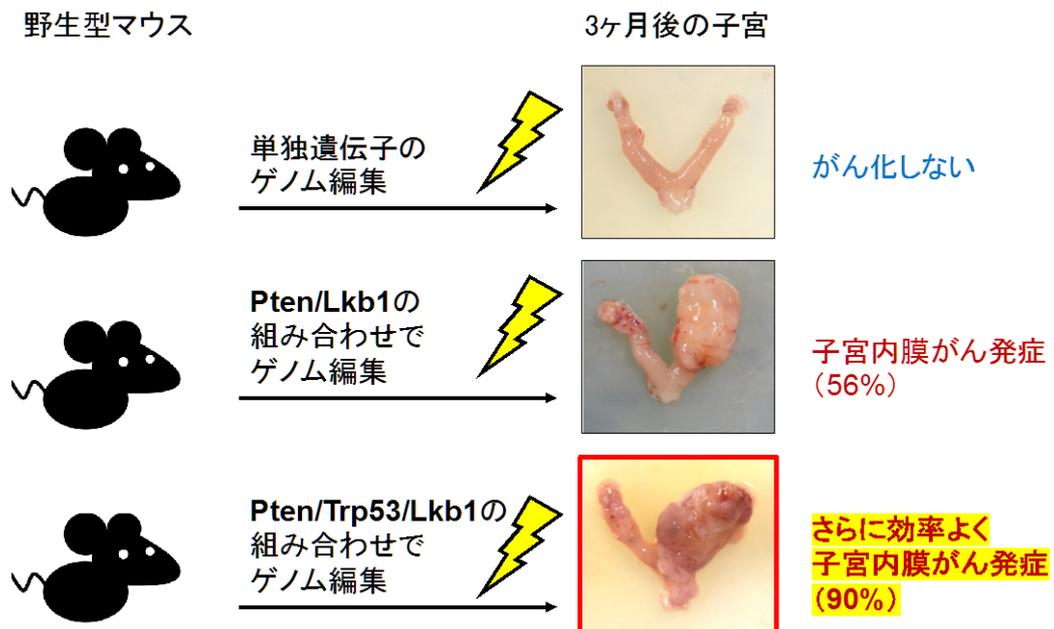


図2：子宮上皮細胞へのゲノム編集による子宮内膜がんモデル作製



5. 本研究の社会的意義と今後の展望

本研究では、CRISPR/Cas9ゲノム編集技術を用いてマウスの子宮上皮細胞をゲノム編集することにより、野生型マウスから子宮内膜がんを発症させることに成功しました。これにより、年単位の時間を要していた子宮内膜がんモデルの作出を大幅に短縮することができました。また本モデルではガイドRNAの配列を変更したり、数を増やしたりするだけでゲノム編集標的の種類や数を自在にカスタマイズできるため、従来式モ

デルでは困難だった複数遺伝子の変異によるがん病態への影響を評価できる可能性を秘めています。今回私たちが開発したモデルを利用することで、子宮内膜がん発症メカニズムに対する理解が進み新たな治療標的が発見されたり、投薬により治療薬の評価を行ったりすることを通じて、子宮内膜がんの新規治療薬・治療法開発に貢献することが期待されます。

6. 本研究への支援

本研究は、生命科学・創薬研究支援基盤事業（BINDS）「ゲノム、エピゲノム編集疾患モデル動物の作出支援」（研究代表者：畑田 出穂）の一環で行われました。

7. 関連リンク

群馬大学生体調節研究所

<https://www.imcr.gunma-u.ac.jp>

生体調節研究所ゲノム科学リソース分野

<http://epigenome.dept.showa.gunma-u.ac.jp/~hatada/>

8. 論文詳細

雑誌名：International Journal of Cancer

論文名：**Multiplexed genome editing by *in vivo* electroporation of Cas9 ribonucleoproteins effectively induces endometrial carcinoma in mice**

（Cas9リボヌクレオタンパクの生体内エレクトロポレーションによるマルチプレックスゲノム編集は、マウスで効率的に子宮内膜がんを誘導する。）

著者：Ryosuke Kobayashi, Reika Kawabata-Iwakawa, Makoto Sugiyama, Tetsunari Oyama, Masato Ohtsuka, Takuro Horii, Sumiyo Morita, Masahiko Nishiyama, Izuhiko Hatada

DOI番号：10.1002/ijc.34342

9. 用語解説

*1 遺伝子改変マウス

人工的な操作によって外来性遺伝子が導入されたり、内在性の遺伝子が改変されたりしたマウスです。

*2 CRISPR/Cas9

特定のゲノム領域を切断する技術の一つであり、狙った遺伝子を破壊したり改変したりするゲノム編集を可能にします。ゲノムを切断する活性を持つCas9タンパク質は、特定のゲノム領域を認識するガイドRNAと複合体を形成することで狙った領域を切断することができます。

*3 野生型マウス

遺伝子改変を持たない、本来のゲノムを維持するマウスです。

*4 PTEN (Pten)

様々ながんにおいて高頻度で変異が認められるがん抑制遺伝子の一つです。イノシトールリン脂質であるPIP3の脱リン酸化を触媒することで、細胞増殖などに関わるPI3K/Akt経路の抑制に働きます。

*5 Cre/loxPシステム

バクテリオファージに由来するDNA組換え機構を応用したものであり、組織特異的なノックアウトマウス作製で頻繁に用いられるシステムです。loxPと呼ばれる配列で挟まれた遺伝子領域（Flox）が、Creリコンビナーゼによって組換えられることで破壊されます。特定の組織でのみCreリコンビナーゼを発現するマウスを用いることで、組織特異的なノックアウトが可能となります。

*6 エレクトロポレーション法

細胞に電気パルスを与えることで細胞膜に一過性の孔が生じることを利用して、細胞内にタンパク質や核酸などの高分子を導入する技術です。電気穿孔法とも言います。

*7 プラスミドDNA

細菌などで認められる環状の二本鎖DNA分子。人工的に作られたプラスミドDNAは、遺伝子組換えや遺伝子導入などの用途で、生命科学研究分野で広く利用されています。

*8 Trp53

様々ながんにおいて高頻度で変異が認められるがん抑制遺伝子の一つで、p53タンパク質をコードしています。細胞増殖や細胞死誘導など重要な役割を多く持つため、「ゲノムの守護者」とも呼ばれています。

*9 Lkb1

AMPKをリン酸化する活性をもち、結果的にmTOR経路を抑制することによってがん抑制に働く遺伝子です。Stk11とも呼ばれます。

*10 CTNNB1 (Ctnnb1)

Wntシグナル経路の細胞内シグナル伝達因子であるβカテニンをコードする遺伝子です。子宮内膜がんではβカテニンタンパク質の安定化に関わるような機能活性型の遺伝子変異が認められ、Wntシグナル経路を異常活性化することでがんの進展に寄与していると考えられています。

注意事項（報道関係者へ）

日本時間11月16日 午前0時（米国東部標準時：11月15日 午前10時）以前の公表は禁じられていますので報道関係者の皆様にご協力をよろしくお願い申し上げます。

【本件に関するお問合せ先】

（研究に関すること）

群馬大学 生体調節研究所 ゲノム科学リソース分野

教授 畑田 出穂 TEL：027-220-8057 E-MAIL：hatada@gunma-u.ac.jp

（報道に関すること）

同研究所

庶務係 係長 富澤 一未 TEL：027-220-8822 E-MAIL：kk-msomu4@jimu.gunma-u.ac.jp