

# 進行卵巣がんを克服した患者の *PRDM1* および *ABCA13* 遺伝子多型を再現したマウスモデルの確立

所属： 北海道大学病院 婦人科

助成対象者：三田村 卓

共同研究者：翟 天玥、王 磊

おことわり

本研究は、申請時に「進行卵巣がんを克服した患者の *PRDM1* 遺伝子多型を再現したマウスモデルの確立」という課題名でしたが、採択時に研究対象とする遺伝子を変更することをお認めいただいております。そのため、本報告書では新しい課題名を記載いたします。研究内容は変更ございません。

## 概要

進行卵巣癌が治癒したと思われる患者の *PRDM1* および *ABCA13* 遺伝子に高頻度で出現する一塩基多型 (SNV) を、それぞれ CRISPR 法を用いて C57BL/6 マウスの配偶子に導入し、人工授精を行った。続いて受精卵を同種のマウスに胚移植し、遺伝子組換えマウスを誕生させることに成功した。この遺伝子組換えマウスは、個体を構成する全ての細胞に前述の予後良好 SNV が導入されており、オスもメスも作製可能であった。また、健康状態は良好で妊娠出産が可能であることを確認した。今後、これらのマウスを 3 世代継代した子孫を用いて、進行卵巣癌治癒の機序を解明する予定である。

## abstract

We used the CRISPR method to introduce a single nucleotide variant (SNV) frequently found in the *PRDM1* and *ABCA13* gene of patients who overcame advanced ovarian cancer to gametes of C57BL/6 mice and performed in vitro fertilization. We then transplanted embryos to mice of the same species and obtained mice with preferable prognosis-related SNV described above

in all cells that constitute each individual. We could establish both male and female gene recombinant mice and confirmed that they were healthy and could have offspring. We will study the mechanisms for the cure of advanced ovarian cancer using the 3rd generation offspring.

## 研究内容

### 背景

近年、一部の難治性悪性腫瘍患者の短期予後が改善されたとされるが、短ければわずか3ヶ月程度、長くても1～2年程度の無増悪生存期間の延長のために、患者一人当たり薬代だけでも最低でも月に数十万円、高価な薬剤を使用する治療や重大な合併症が発生した場合であれば月に数百万円の医療費がかかっていると予測される。このような現状は、卵巣癌患者の半数以上を占める60歳未満の妊娠、出産、育児世代の女性にとっては非常に負担が大きく、希望が見えない。また少子高齢化が急激に進む中で次世代への経済的負担があまりにも大きい。そのため、本当の意味での予後改善、すなわち初回治療から長期の完全寛解を得るための治療開発を行い、完治を必要としている若い女性の人生を強力に後押しする必要がある。

進行卵巣癌の70%以上は手術と化学療法による初回治療により一度は寛解に至るが、その後3年以内をピークに再発が起こるため10年後の無病生存率は5%未満と推定されている。しかし、ごく一部の患者は一度も再発を経験せずに寛解状態を維持し続けて、驚異的な長期生存を遂げる。このような患者は、❶他の患者と異なる特殊な初回治療を受けたり長期にわたり抗癌剤などの維持療法を受けたりしたたわけではないため、標準的な癌治療に対する感受性が高い、あるいは❷抗腫瘍免疫的機序により微小な再発病変を排除しやすい体質が生来備わっていることが示唆され、また❸重大な基礎疾患がない。そこで、これらの長期生存患者に共通する体質に関わる遺伝子学的背景を解明して有害事象が少なく最大限の効果を発揮できる治療法を確立するために、本研究を立ち上げた。

先行研究において、進行卵巣癌の超長期寛解患者16人（治癒群；6人は治療開始から5年以上10年以内の無再発生存、10人は10年以上の無再発生存）と、5年未満に再発した患者8人（非治癒群）の血液から胚細胞系遺伝子を採取し、次世代シーケンサーによる160の代表的な腫瘍関連遺伝子のエクソン解析と、全ゲノムを対象とした60万ヶ所以上の1塩基多型(SNV)解析を行った。その結果、治癒群に特異的と思われる遺伝子変化

(出現頻度; 治癒群の 50% 以上、非治癒群の 10% 未満、一般的な日本人の 33% 未満) が約 40 ヶ所見つかった。

## 目的

前述の進行卵巣癌治癒に関わる遺伝子変化のうち、抗腫瘍免疫において重要な役割を果たす *PRDM1* 遺伝子 (引用文献 1, 2) と、細胞内外の薬物輸送において重要な役割を果たす *ABCA13* 遺伝子 (引用文献 3, 4) の変化に注目し、これらの遺伝子変化を再現したノックインマウスを作製して新規治療の研究開発を行う。

## 結果

1. ヒト *PRDM1* 遺伝子 220 番目の塩基であるグアニンのアデニンへの変化、およびヒト *ABCA13* 遺伝子 4618 番目の塩基であるチミンのシトシンへの変化、これら 2 つのヒト遺伝子の変化に相当するマウスの *prdm1* 遺伝子および *abca13* 遺伝子変化を発生させるため、CRISPR 法で用いる gRNA を設計した (CRISPR 法の原理については省略させていただきます。また、gRNA の塩基配列については秘匿とさせていただきます)。マウス *prdm1* タンパクおよび *abca13* タンパクを構成するアミノ酸配列は、それぞれヒト *PRDM1* タンパクおよび *ABCA13* タンパクのアミノ酸配列とほぼ同一であることが知られている。
2. 実験用動物である C57BL/6 マウスの精子に対して、1. に記載した gRNA を用いて CRISPR 法による遺伝子切断を行った (図 1)。
3. 2 の遺伝子切断がマウス自身の遺伝子修復酵素により修復された後で当該領域の塩基配列を確認したところ、目的の遺伝子変化 (図 2 *prdm1*, 図 3 *abca13*) が起きている精子を得ることができた。

図 1 CRISPR 法によるマウス *prdm1* 遺伝子切断

▽: 遺伝子切断に成功した clone.

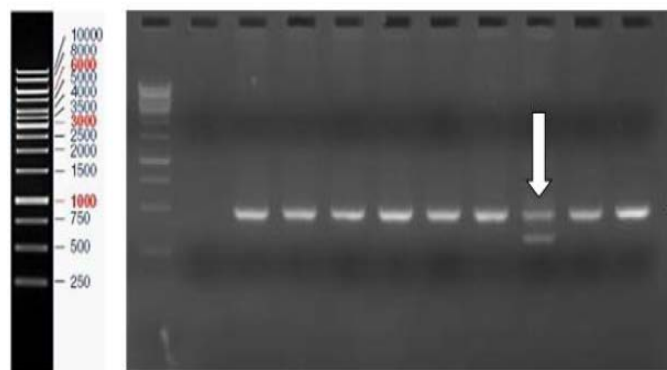


図2 *prdm1* 遺伝子の組換え

赤枠の領域 上段の遺伝子変化が起きていない元のマウスの CAG 配列が、遺伝子組換え後に下段の CAA となっており、グアニンがアデニンに変化したことを確認できた。

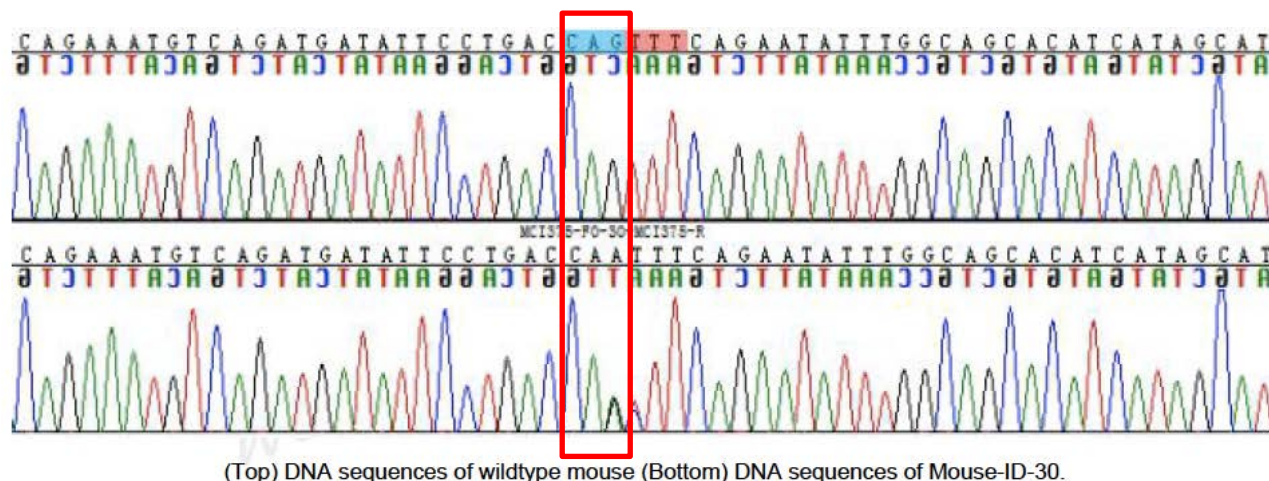
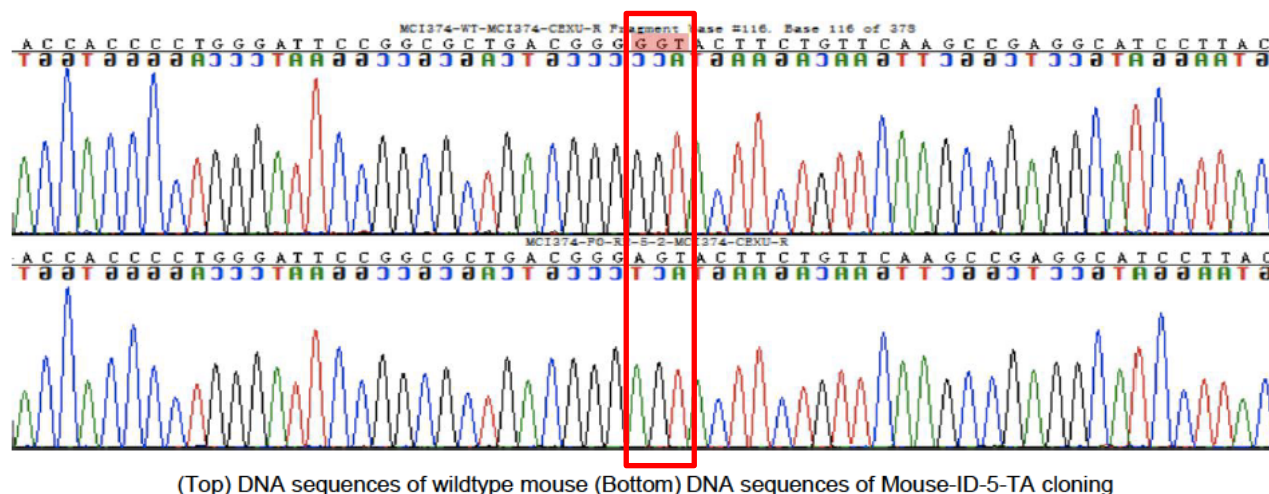


図3 *abca13* 遺伝子の組換え

赤枠の領域 上段の遺伝子変化が起きていない元のマウスの GGT 配列が、遺伝子組換え後に下段の AGT となっており、グアニンがアデニンに変化したことを確認できた。



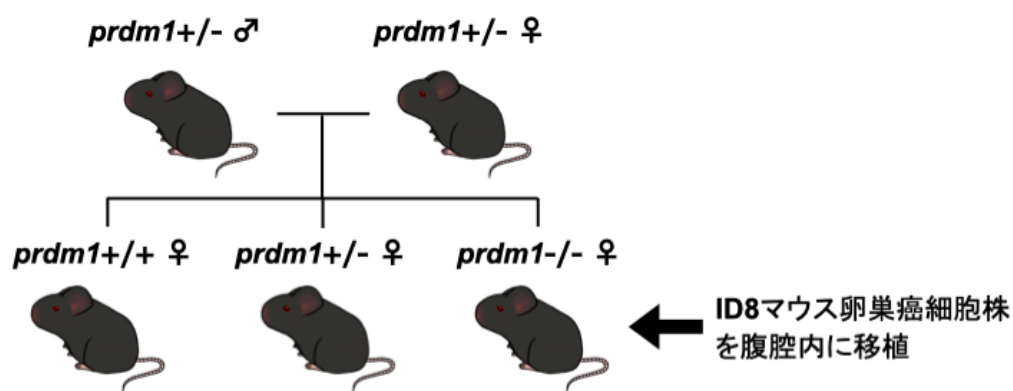
4. この遺伝子組換え精子を用いた体外受精に成功した。
5. 4の受精卵を C57BL/6 マウスの子宮に移植したところ妊娠が確認された。胎児は順調に成長し、生児を得ることができた。

## 今後

本来であれば、遺伝子組換えマウスを 2020 年春頃に中国の共同開発施設である Cyagen から輸入する予定であったが、COVID19 感染の拡大により 2 度輸入の延期を余儀なくされた。そのため中国において遺伝子組換えマウスを 1 世代継代し、第 2 世代のマウスを 2021 年 3 月に輸入した。現在、健康状態の監視のため 1 ヶ月の隔離飼育を行っている。

2021 年 4 月より以下の基礎実験を予定している。

1. *PRDM1* 遺伝子 SNV をヘテロ接合性 (図 2 上段 *prdm1+/-*) に有するノックインマウスの交配により、*PRDM1* 遺伝子 SNV ホモ接合 (図 2 上段 *prdm1+/+*)、ヘテロ接合 (図 2 上段 *prdm1+/-*)、および本 SNV を有さないコントロールマウス (図 2 上段 *prdm1-/-*) の子孫を得る。これらの 3 群のマウスに対して 1 回につき 10000000 個以上の同種 (マウス) 卵巣癌細胞株 ID8 (シグマ アルドリッチ社、本社：米国 ミズーリ州セントルイス) を最適な medium に溶解して合計容積を 300ul 以内になるように調整して皮下もしくは腹腔内に移植する。腫瘍の増殖や浸潤転移能力が、ノックインマウスと陰性コントロールマウスで有意に異なるかどうかを比較検討する。また、食欲低下や癌性疼痛による行動変化を観察する。
2. 前述の 3 群のマウスに対して、1 回につき 10000000 個以上の同種卵巣癌細胞株を皮下もしくは腹腔内に移植する。ヒト悪性腫瘍の標準的治療で用いられるパクリタキセル (和光純薬、DMSO に溶解して投与)、カルボプラチン (和光純薬、生理食塩水に溶解して投与)、およびベバシズマブ (中外製薬、生理食塩水に溶解して投与) 等の薬剤に対する感受性試験を行い、各群のマウスにおいて治療効果が有意に異なるかどうかを比較検討する。各薬剤は 10-40mg/kg を合計容積 200ul 以下に調整し、皮下もしくは腹腔内に 3-5 日間隔で投与する。14 日後に皮下移植の場合は腫瘍容積、腹腔内移植の場合は腹水量より体外から治療効果を判定する。この治療効果とマウスの全身状態により、必要に応じて 21 日程度まで治療を延長する。また、食欲低下や癌性疼痛による行動変化を観察する。
3. 上記 2 および 3 で安楽死直後に得られた動物実験検体を使用して、マイクロアレイ法等を用いた網羅的遺伝子解析、Western blot 法等を用いたタンパク発現解析、FACS 等を用いた腫瘍免疫解析、また必要に応じてその他の *in vitro* 実験を追加して、抗腫瘍効果に大きく寄与した因子の機能解析を行う。



1. 無治療で腫瘍の増殖能、浸潤能、転移能を観察
2. 抗腫瘍薬の治療効果と予後を観察
3. 採取された腫瘍組織を用いた遺伝子・タンパクの網羅的解析

#### 引用文献

1. Collins PL, et al. Gene Regulatory Programs Conferring Phenotypic Identities to Human NK Cells. *Cell*. 2019;176(1-2):348-60.
2. Chihara N, et al. Induction and transcriptional regulation of the co-inhibitory gene module in T cells. *Nature*. 2018;558(7710):454-9.
3. Gellert P, et al. Impact of mutational profiles on response of primary oestrogen receptor-positive breast cancers to oestrogen deprivation. *Nature Communications*. 2016;7.
4. Nymoen DA, et al. CIAPIN1 and ABCA13 are markers of poor survival in metastatic ovarian serous carcinoma. *Molecular Cancer*. 2015;14.

#### 本助成に関わる成果物

[論文発表] なし

[口頭発表] なし

[ポスター発表] なし

[その他] なし