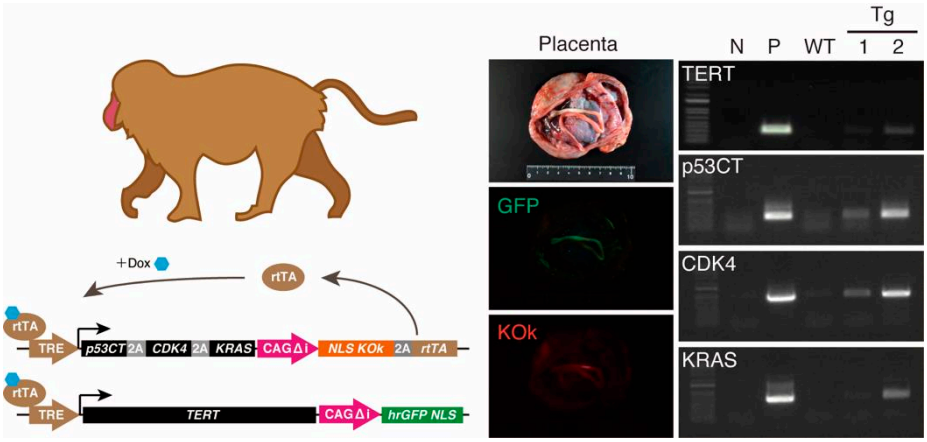
145　誘導性がんモデルサルの作製と免疫細胞療法への応用	富松　航佑

【目的】がんの発生は多段階的であり、そのプロセスに関わる遺伝子変異は動物種によって異なることが明らかになっている。これまでのがん研究においては、主にマウス等のげっ歯類が実験動物として用いられて来た。しかしながらマウスでは、単一のがん遺伝子の変異と、がん抑制遺伝子の欠失によってがんが誘発できるのに対して、ヒトの腫瘍形成には少なくとも 4 つの遺伝子の変異が必要である。またがん遺伝子が活性化したヒトの細胞は、細胞老化により細胞周期が永続的に停止させられるが、げっ歯類では細胞周期停止から逸脱してがん化しやすい。さらにマウスのがんで治療効果があった薬剤が、ヒトでは効果がないなど、マウスで得られた知見がヒトには外挿できない例が多く知られている。そのため非ヒト霊長類を用いたがん研究の推進が研究面・治療面ともに必要不可欠であるが、がん遺伝子を恒常的に発現する動物では個体の発生異常の回避が難しく、安定的に供給可能な非ヒト霊長類のがんモデル動物は未だほとんど例がない。そこで本研究では、薬剤添加により誘導的にがん遺伝子を発現させることで、任意にがん発症を可能にするモデルサルを作出し、治療応用へ結びつけることを目的とした。

【方法】ヒトの腫瘍形成に必要な 4 つの遺伝子（*p53CT*、*CDK4*、*KRAS*^{G12V}、*TERT*）をカニクイザルから単離し、ドキシサイクリン（Dox）で任意に発現誘導可能な形で 2 つのレンチウイルスベクターに挿入した。これらのベクターを保持するレンチウイルスを作製し、培養細胞でベクターの動作確認を行った。これらのレンチウイルスをカニクイザルの卵に感染後、顕微授精でトランスジェニック（Tg）胚を作製した。産まれた仔サルについては、現段階で解析可能な胎盤を用いて蛍光観察とジェノタイピングを行った。

【結果】4 つの遺伝子を誘導的に発現する 2 種類のベクターをレンチウイルスでカニクイザル由来の培養細胞に導入し Dox を添加すると、培養細胞が足場非依存的な増殖能を獲得した。またこれらのレンチウイルスを感染させたカニクイザル胚は GFP と Kusabira Orange（KO）の蛍光を呈するため、蛍光陽性胚を選定して仮親へ移植した。産まれた仔サルの胎盤を蛍光観察した結果、GFP と KO の 2 色の蛍光が確認され、さらにジェノタイピングによって 4 種類のトランスジーンが導入されていることを確認した。

薬剤誘導性がん遺伝子発現システムを持つ Tg カニクイザル



145. 誘導性がんモデルサルの作製と免疫細胞療法への応用

富松　航佑

*滋賀医科大学 医学部 生化学・分子生物学講座 分子生理化学部門

Key words：トランスジェニックカニクイザル，がんモデル動物，薬剤誘導性遺伝子発現

緒　言

がんの発生は多段階的であり、そのプロセスに関わる遺伝子変異は動物種によって異なる。これまでのがん研究では、主にマウス等のげっ歯類が実験動物として用いられてきたが、マウスの細胞は単一のがん遺伝子変異とがん抑制遺伝子の欠失によってがん化が誘導できるのに対して、ヒトの腫瘍形成には少なくとも 4 つの遺伝子変異が必要である［1］。またがん遺伝子が活性化したヒトの細胞は、細胞老化により細胞周期が永続的に停止するが、げっ歯類では細胞周期停止から逸脱してがん化しやすい。このように齧歯類とヒトの間には、がんの発生と抑制のメカニズムに顕著な違いがある。さらにマウスのがんで効果のあった薬剤がヒトでは治療効果を発揮しないなど、マウスで得られた知見がヒトには外挿できない例が多く知られている［2］。そのため非ヒト霊長類を用いたがん研究の推進が研究面・治療面共に必要不可欠であるが、がん遺伝子を恒常的に発現する動物では個体の発生異常の回避が難しく、非ヒト霊長類のがんモデル動物はまだほとんど例がない。そこで本研究では、薬剤により誘導的に 4 つのがん遺伝子を発現するがんモデルサルの作出を目的とした。我々の研究グループでは細胞傷害性 T 細胞を用いたがん免疫細胞療法の研究を行っているため、本研究で作製されるがんモデルサルを用いて、がん免疫細胞療法の効果を検証する効果的な治療モデルの確立を目指した。

方　法

1.　がん遺伝子を誘導性に発現するベクターの構築

ヒトの腫瘍形成に必要な 4 つの遺伝子（p53 を阻害する顕性変異体 *p53CT*、Rb 経路による細胞老化を阻害する *CDK4*、活性化型 $KRAS^{G12V}$、テロメラーゼ逆転写酵素 *TERT*）をカニクイザルから PCR で増幅し、ドキシサイクリン（Dox）による発現誘導が可能な形で 2 つのレンチウイルスベクターに分割して挿入した。次に構築したベクターを HEK293FT にトランスフェクションし、その培養上清 を回収して超遠心することでレンチウイルスを調整した。その後カニクイザル骨髄由来間葉系幹細胞にレンチウイルスを感染させ、誘導性がん遺伝子発現システムを安定的に保持する細胞株を取得した。ウイルス感染した細胞は GFP 由来の緑色蛍光と Kusabira Orange（KO）由来の橙色蛍光を示すため、これらの蛍光陽性細胞をソーティングし実験に用いた。足場非依存的な細胞の増殖は軟寒天を用いたコロニー形成アッセイで評価した。

2.　トランスジェニックカニクイザルの作製

上記作製したレンチウイルスをカニクイザルから取得された卵に感染させ、その後顕微授精を行うことで Tg 胚を作製した。顕微授精から 7 日後に GFP と KO の蛍光が観察された胚を仮親に移植し、妊娠個体を取得した。その後　産まれた仔サルの胎盤を用いて蛍光の観察し、胎盤由来のゲノム DNA を用いて外来性遺伝子が導入されているかジェノタイピングを行った。

*現在の所属：九州大学 生体防御医学研究所 トランスクリプトミクス分野

結果および考察

1. がん遺伝子誘導性システムの構築と評価

まず霊長類（ヒト）の腫瘍形成に必要な遺伝子を任意に誘導するため、Dox 添加により以下 4 つの遺伝子（*p53CT*、*CDK4*、*KRAS*^{G12V}、*TERT*）を発現するレンチウイルスベクターを構築した。ベクターはインサートサイズを考慮し、2 つに分割して作製した。1 つ目のベクターには TET 応答領域の下流に *p53CT*、*CDK4*、*KRAS*^{G12V} 遺伝子を自己開裂型ペプチド：P2A をコードする配列でタンデムに繋ぐことで、1 つの転写から 3 つのタンパク質を発現させることを可能にした。またその下流に、ベクターサイズを考慮しイントロンを除いた CAG プロモーター（CAGΔi）により蛍光タンパク質である KO と TET アクティベーターを恒常的に発現するシステムを挿入した。2 つ目のベクターには TET 応答領域の下流に TERT 遺伝子を挿入し、そのさらに下流には CAGΔi プロモーターによって GFP が恒常的に発現するよう設計した（図 1a）。これらの 2 つのベクターをカニクイザル由来間葉系幹細胞（BM-MSC）にレンチウイルスシステムを用いて導入し、ベクター由来の KO と GFP の 2 色の蛍光を呈する細胞を取得した（図 1b）。この細胞を用いてコロニーフォーメーションアッセイを行った結果、Dox を添加することで細胞が足場非依存的な増殖を示した（図 1c）。Dox による 4 つの遺伝子誘導については、ウェスタンで Dox 依存的な誘導が確認されたものの BM-MSC 細胞の内在性 TERT の発現が高く評価が困難であったため（結果未掲載）、他の細胞株で再試験する必要がある。

2. トランスジェニックカニクイザルの作製

がん誘導システムを保持するレンチウイルスを感染させた胚を顕微鏡で観察した結果、GFP と KO の蛍光の発現が確認された（図 2a）。この胚を仮親に移植し、産出された仔サルの胎盤を観察した結果、GFP と KO の蛍光が確認された（図 2b）。また胎盤からゲノム DNA を取得してジェノタイピングを行った結果、2 つのトランスジェニック個体から外来性 *TERT*、*p53CT*、*CDK4*、*KRAS* がそれぞれ確認された（図 2 c）。本実験から、KO を発現するカニクイザルの作製が可能であること、また GFP と KO の 2 種類の蛍光タンパク質を発現する Tg カニクイザル個体の作製が可能であることが示された。がん誘導性については、今後このトランスジェニック個体から細胞を取得し、Dox を加えて調べることに加え、埋込型プログラムポンプにより Dox を投与し生体内で腫瘍形成が起きるか検討する予定である。

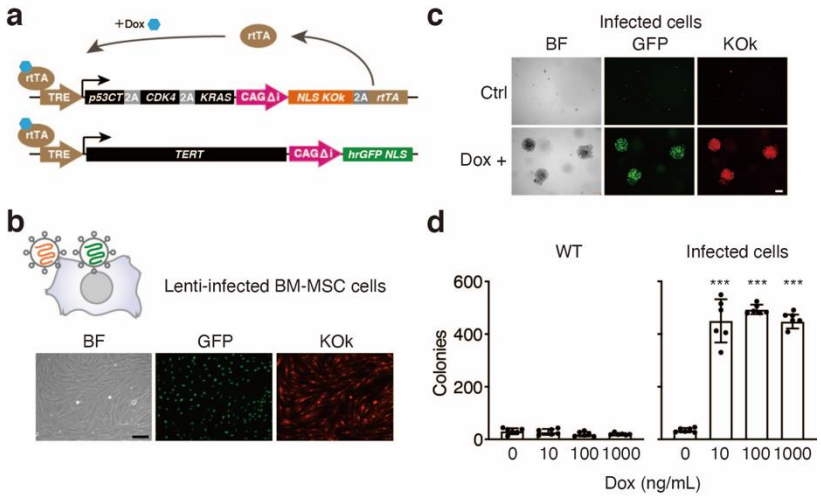


図 1. がん遺伝子誘導システムの構築と評価

a）Dox 誘導性がん遺伝子発現ベクターの構図。

b）がん遺伝子発現ベクターを導入したカニクイザル由来間葉系幹細胞（BM-MSC）の顕微鏡観察写真 （スケールバー：100μm）。ベクターはレンチウイルスによって細胞へ導入した。

c）コロニーフォーメーションアッセイの顕微鏡観察写真 （スケールバー：100μm）。

d）コロニーフォーメーションアッセイの定量。One-Way ANOVA を用いて Dox 0 のサンプルと比較した（***P>0.001）。

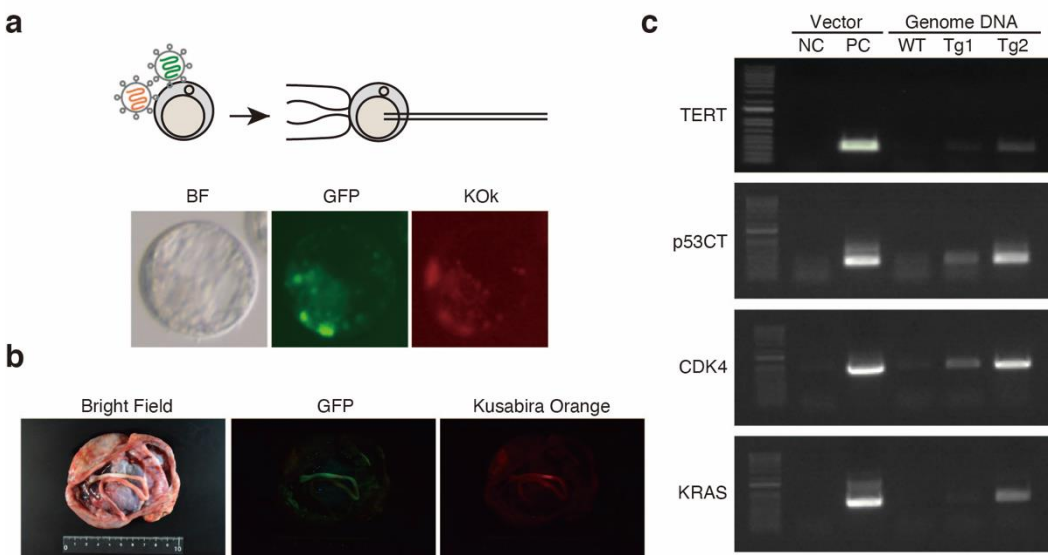


図 2. トランスジェニックカニクイザルの作製

a）レンチウイルス感染による Tg カニクイザル胚の作製。

b）Tg カニクイザル由来胎盤の蛍光写真。

c）Tg カニクイザルのジェノタイピング。NC：Negative control、PC：Positive control、WT：Wild type、Tg：Transgenic。

共同研究者・謝辞

本研究を遂行するにあたりまして、滋賀医科大学動物生命研究センターの依馬正次先生、清田弥寿成先生、築山智之先生、岩谷千鶴さんのご尽力に感謝申し上げます。

文　献

1） Akagi T. Oncogenic transformation of human cells: shortcomings of rodent model systems. Trends Mol Med. 2004, 10(11):542-8. PMID: 15519280. DOI: 10.1016/j.molmed.2004.09.001

2） Perlman RL. Mouse models of human disease: an evolutionary perspective. Evol Med Public Health. 2016, (1):170-6. PMID: 27121451. DOI: 10.1093/emph/eow014