慶應義塾大学学術情報リポジトリ
Keio Associated Repository of Academic resouces

Title	In vivoエレクトロポレーションを用いた新規マウス脳腫瘍モデルの開発
Sub Title	Development of novel mouse brain tumor model using in vivo electroporation and piggyBac system
Author	大西, 伸幸(Ōnishi, Nobuyuki)
Publisher	
Publication year	2019
Jtitle	科学研究費補助金研究成果報告書 (2018.)
JaLC DOI	
Abstract	効果的な治療法が確立されていない悪性脳腫瘍の分子基盤解明を目的に、マウス脳に直接がん遺伝子を導入して脳腫瘍を作製するin vivo発がんモデルの構築を目的とした。具体的には、ゲノム上に存在するトランスポゾン配列に目的配列を組み込むpiggyBacシステムとin vivoエレクトロポレーション法を組み合わせ、マウス脳内の神経幹細胞にがん遺伝子を導入したところ、高い細胞密度で周囲の脳実質に浸潤性に増殖し、不均質で悪性度の高い脳腫瘍を作製することができた。本モデルで作製した脳腫瘍で詳細な解析を行うことで、ヒト脳腫瘍の発がんおよび悪性化過程における分子基盤を明らかにしたいと考えている。 Glioblastoma multiforme (GBM), is one of the most malignant brain tumors, has highly-proliferative and invasive characters. To understand these malignant characters of GBM, an appropriate carcinogenesis model is required. Loss of INK4A/ARF and stimulation of common signal transduction pathways involving RAS are frequently found in GBM. Previously, we have established a stable mouse models of brain tumors, transplanting the genetically modified neural stem cells NSCs). Recently, for the purpose of reproducing a clinical tumor initiating process, we are developing a novel mouse model of brain tumors by gene transfer into mouse brain directly. Using in vivo electroporation and piggyBac system, transduction of activated-H-RAS and shInk4a/Arf into NSCs in mouse brain, efficiently formed highly proliferative, invasive and heterogeneous brain tumors. Based on these findings, we propose this in vivo carcinogenesis technique is efficient method to generate appropriate mouse brain tumor models.
Notes	研究種目：基盤研究 (C) (一般) 研究期間：2016～2018 課題番号：16K07125 研究分野：腫瘍生物学
Genre	Research Paper
URL	https://koara.lib.keio.ac.jp/xoonips/modules/xoonips/detail.php?koara_id=KAKEN_16K07125seika

慶應義塾大学学術情報リポジトリ(KOARA)に掲載されているコンテンツの著作権は、それぞれの著作者、学会または出版社/発行者に帰属し、その権利は著作権法によって保護されています。引用にあたっては、著作権法を遵守してご利用ください。

The copyrights of content available on the KeiO Associated Repository of Academic resources (KOARA) belong to the respective authors, academic societies, or publishers/issuers, and these rights are protected by the Japanese Copyright Act. When quoting the content, please follow the Japanese copyright act.

様　式　Ｃ－１９、Ｆ－１９－１、Ｚ－１９　（共通）

科学研究費助成事業　　研究成果報告書

令和　元 年　 ６ 月　 ３ 日現在

機関番号：３２６１２
研究種目：基盤研究(C)（一般）
研究期間：2016～2018
課題番号：１６Ｋ０７１２５

研究課題名（和文）In vivoエレクトロポレーションを用いた新規マウス脳腫瘍モデルの開発

研究課題名（英文）Development of novel mouse brain tumor model using in vivo electroporation and piggyBac system

研究代表者
大西　伸幸（Onishi, Nobuyuki）

慶應義塾大学・医学部（信濃町）・訪問研究員

研究者番号：４０５３４５４０

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費）　　3,900,000円

研究成果の概要（和文）：効果的な治療法が確立されていない悪性脳腫瘍の分子基盤解明を目的に、マウス脳に直接がん遺伝子を導入して脳腫瘍を作製するin vivo発がんモデルの構築を目的とした。具体的には、ゲノム上に存在するトランスポゾン配列に目的配列を組み込むpiggyBacシステムとin vivoエレクトロポレーション法を組み合わせ、マウス脳内の神経幹細胞にがん遺伝子を導入したところ、高い細胞密度で周囲の脳実質に浸潤性に増殖し、不均質で悪性度の高い脳腫瘍を作製することができた。本モデルで作製した脳腫瘍で詳細な解析を行うことで、ヒト脳腫瘍の発がんおよび悪性化過程における分子基盤を明らかにしたいと考えている。

研究成果の学術的意義や社会的意義
悪性脳腫瘍、特にグリオブラストーマ(glioblastoma multiforme: GBM)は原発性脳腫瘍のうち悪性度が最も高く、浸潤の早さから手術による全摘は困難とされており、平均生存期間は約1年と極めて予後不良な悪性腫瘍である。GBMは放射線・化学療法に抵抗性を持ち、効果的な治療は未だ確立されていない。GBMの性状を理解し、新たな治療戦略を考案するためには適切な発がんモデルの構築が必須である。本研究で構築したマウス脳腫瘍モデルは、ヒトGBMに酷似した特徴を有する脳腫瘍を簡便な方法で作製することができ、最も予後が悪く難治性のがんの一つであるGBMの治療を目指した研究を促進するものである。

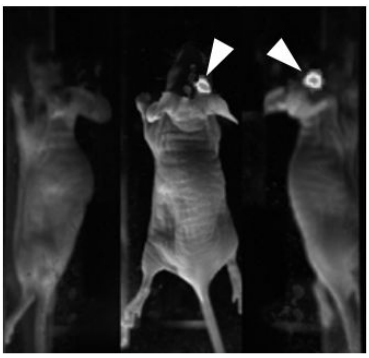
研究成果の概要（英文）：Glioblastoma multiforme (GBM), is one of the most malignant brain tumors, has highly-proliferative and invasive characters. To understand these malignant characters of GBM, an appropriate carcinogenesis model is required. Loss of INK4A/ARF and stimulation of common signal transduction pathways involving RAS are frequently found in GBM. Previously, we have established a stable mouse models of brain tumors, transplanting the genetically modified neural stem cells NSCs). Recently, for the purpose of reproducing a clinical tumor initiating process, we are developing a novel mouse model of brain tumors by gene transfer into mouse brain directly. Using in vivo electroporation and piggyBac system, transduction of activated-H-RAS and shIink4a/Arf into NSCs in mouse brain, efficiently formed highly proliferative, invasive and heterogeneous brain tumors. Based on these findings, we propose this in vivo carcinogenesis technique is efficient method to generate appropriate mouse brain tumor models.

研究分野：腫瘍生物学

キーワード：マウス脳腫瘍モデル　In vivoエレクトロポレーション　piggyBacシステム　神経幹細胞

１．研究開始当初の背景

悪性脳腫瘍、特にグリオブラストーマ(glioblastoma multiforme: GBM)は原発性脳腫瘍のうち悪性度が最も高く、浸潤の早さから手術による全摘は困難とされており、平均生存期間は約 1 年と極めて予後不良な悪性腫瘍である。GBM は放射線・化学療法に抵抗性を持ち、効果的な治療は未だ確立されていない。GBM の性状を理解し新たな治療戦略を考案するためには適切な発がんモデルの構築が必須であり、既に様々なマウスモデルの構築が進められている(①*Nat Genet.* 25: 55-7. 2000, ②*Cancer Cell.* 1:269-77. 2002)。これまでに研究代表者らは、ヒト GBM において高頻度に異常がみられる *Ink4a/Arf* 遺伝子の欠損マウス(KO)神経幹細胞(neural stem cell: NSCs)にレトロウイルスを用いて活性型 H-RAS (H-RAS V12)ならびに活性型 ALK (ALK F1174L, R1275Q)を導入後、同系マウス脳内に移植することで、高い細胞密度で周囲の脳実質に浸潤性に増殖し、ヒト GBM に酷似した特徴を有するマウス GBM モデルを構築した(③*Neoplasia.* 13:784-91. 2011、④投稿準備中)。また、研究代表者らは Tet-On system を用いて Doxycycline (Dox)添加により遺伝子発現を誘導できる Tet-On NSCs を樹立し、この細胞をヌードマウス脳内に移植後、Dox 含有餌を投与して脳内で ALK R1275Q を発現させることで、Dox 投与依存的に脳腫瘍を形成できる誘導型 GBM モデルも構築している(図１)。さらに、研究代表者らは piggyBac system を用いて(図 2)、ウイルス感染を伴わずに直接ゲノム DNA 上のトランスポゾン配列に H-RAS V12 や ALK F1174L、R1275Q の挿入を行うことで、上記同様にマウス脳内で腫瘍を形成する人工がん幹細胞(induced Cancer Stem Cells: iCSCs)の樹立に成功している。また、エレクトロポレーション法を用いて細胞にがん遺伝子発現ベクターを導入する際に、機能亢進 transposase (piggyBac 転移酵素)である hyPB の発現ベクターと同時導入することで高発現株を樹立できることを確認しており(Proc Natl Acad Sci U S A. 108: 1531-6. 2011)、レトロウイルス感染よりも簡便かつ短期間に iCSCs の樹立が可能となった(図 3)。



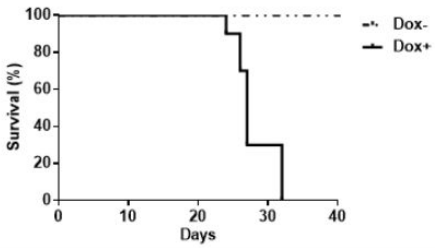


図 1. Tet-On-ALK R1275Q-Luc-NSCs をヌードマウス脳内に移植して作製した脳腫瘍の *in vivo* イメージングならびに生存曲線

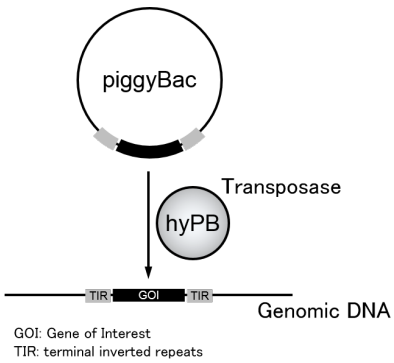


図 2. PiggyBac system を用いたゲノム DNA への遺伝子挿入

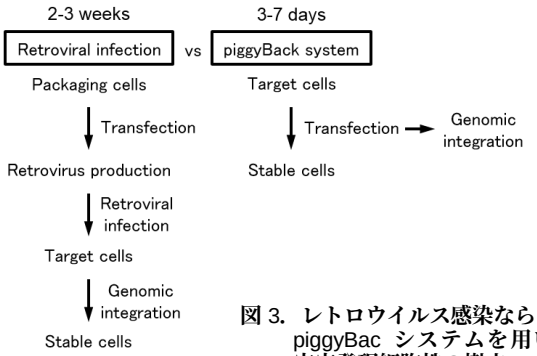


図 3. レトロウイルス感染ならびに piggyBac システムを用いた安定発現細胞株の樹立

２．研究の目的

効果的な治療法が確立されていない悪性脳腫瘍の分子基盤を明らかにするために、これまでに研究代表者は人工がん幹細胞(induced Cancer Stem Cells; iCSCs)を用いたマウス脳腫瘍モデルの構築ならびに解析を行ってきた。iCSCs 樹立法について、従来のレトロウイルス感染による遺伝子導入法に比べ、エレクトロポレーション法と piggyBac system を組み合わせることで簡便化・最適化することができた。本研究では、これまでに研究代表者らが構築してきたマウス脳腫瘍モデルを発展させ、より臨床的なヒトの発がん過程を再現することを目的にマウス脳への直接遺伝子導入による簡便かつ安定した新規脳腫瘍モデルの開発を目指す。本モデルを用いて詳細な性状解析を行うことで脳腫瘍の発がんおよび悪性化過程における分子基盤を明らかにすることを目的とする。

３．研究の方法

ヒト GBM の発がん過程を再現できる脳腫瘍モデルを開発するために、*In vivo* エレクトロポレーションを用いてマウス脳内に直接がん遺伝子およびがん抑制遺伝子 shRNA を導入する。その前段階として、*In vivo* エレクトロポレーションの実験条件や導入する発現ベクターの最適化を行う。

(1)EGFP 発現を指標に *In vivo* エレクトロポレーションを用いたマウス脳内 NSCs への遺伝子導入条件を最適化する。

(2)*In vivo* エレクトロポレーションを用いた NSCs 遺伝子導入ならびにゲノム DNA 挿入に最適な発現ベクターを構築する。

(3)H-RAS V12 cDNA ならびに *Ink4a/Arf* shRNA 導入について *In vivo* エレクトロポレーションモデルと iCSCs モデルを比較する。

４．研究成果

(1) ガラスキャピラリーを用いてマウス新生児脳室に EGFP 発現ベクターを注入後、エレクトロポレーションにて側脳室への遺伝子導入を行い、EGFP 発現を確認することができた。

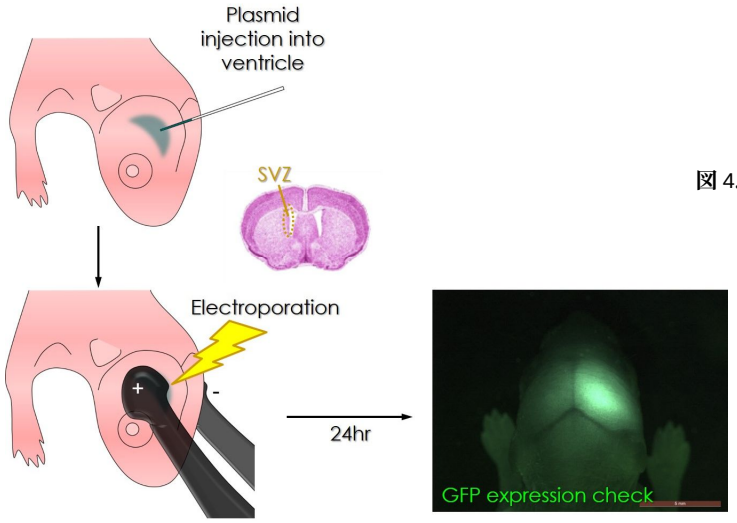


図 4. *In vivo* エレクトロポレーションを用いたマウス新生児脳への遺伝子導入

(2) *In vivo* エレクトロポレーションを用いた NSCs 遺伝子導入ならびにゲノム DNA 挿入を効率化するために最小ユニットでの発現ベクターをデザインし、自作にて構築した。

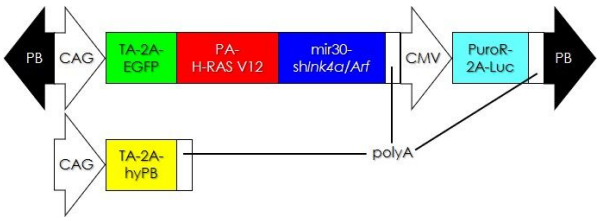


図 5. *In vivo* エレクトロポレーションを用いた発がんモデル構築のための発現ベクター構築

(3) マウス新生児脳への H-RAS V12 cDNA ならびに *Ink4a/Arf* shRNA 導入により、iCSC モデル同様に悪性度の高い脳腫瘍を作製でき、本モデルでは初めてリンパ球浸潤も観察された。

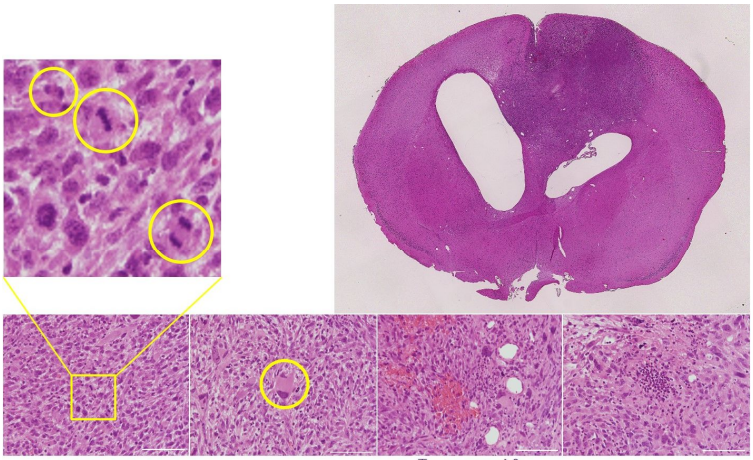


図 6. H-RAS V12 cDNA ならびに *Ink4a/Arf* shRNA 導入により作製したマウス脳腫瘍の HE 染色像

また、作製した脳腫瘍は未分化マーカーNestinと分化(アストロサイト)マーカーGFAPが混在する不均質な腫瘍型であった。

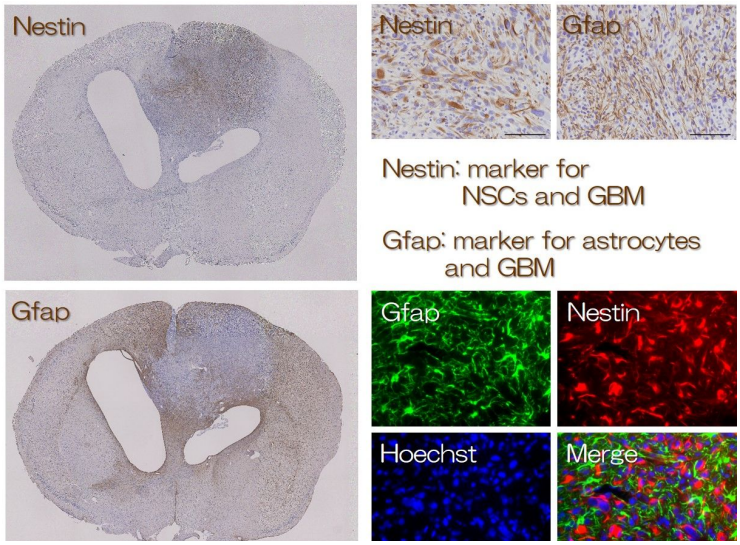


図 7. H-RAS V12 cDNA ならびに *Ink4a/Arf* shRNA 導入により作製したマウス脳腫瘍の免疫染色像

５．主な発表論文等

〔雑誌論文〕（計　7　件）

(1) Takahashi N, Nobusue H, Shimizu T, Sugihara E, Yamaguchi-Iwai S, Onishi N, Kunitomi H, Kuroda T, Saya H.
ROCK Inhibition Induces Terminal Adipocyte Differentiation and Suppresses Tumorigenesis in Chemoresistant Osteosarcoma Cells.
Cancer Res. pii: canres.2693.2018, 2019. doi: 10.1158/0008-5472.CAN-18-2693.(査読あり)

(2) Saito Y, Onishi N, Takami H, Seishima R, Inoue H, Hirata Y, Kameyama K, Tsuchihashi K, Sugihara E, Uchino S, Ito K, Kawakubo H, Takeuchi H, Kitagawa Y, Saya H, Nagano O.
Development of a functional thyroid model based on an organoid culture system.
Biochem Biophys Res Commun. 497:783-789, 2018. doi: 10.1016/j.bbrc.2018.02.154. (査読あり)

(3) Ishimoto T, Miyake K, Nandi T, Yashiro M, Onishi N, Huang KK, Lin SJ, Kalpana R, Tay ST, Suzuki Y, Cho BC, Kuroda D, Arima K, Izumi D, Iwatsuki M, Baba Y, Oki E, Watanabe M, Saya H, Hirakawa K, Baba H, Tan P.
Activation of Transforming Growth Factor Beta 1 Signaling in Gastric Cancer-associated Fibroblasts Increases Their Motility, via Expression of Rhomboid 5 Homolog 2, and Ability to Induce Invasiveness of Gastric Cancer Cells.
Gastroenterology. 153:191-204.e16, 2017. doi: 10.1053/j.gastro.2017.03.046. (査読あり)

(4) Kamel WA, Sugihara E, Nobusue H, Yamaguchi-Iwai S, Onishi N, Maki K, Fukuchi Y, Matsuo K, Muto A, Saya H, Shimizu T.
Simvastatin-Induced Apoptosis in Osteosarcoma Cells: A Key Role of RhoA-AMPK/p38 MAPK Signaling in Antitumor Activity.
Mol Cancer Ther. 16:182-192, 2017. doi: 10.1158/1535-7163.MCT-16-0499. (査読あり)

(5) Miyawaki S, Kawamura Y, Oiwa Y, Shimizu A, Hachiya T, Bono H, Koya I, Okada Y, Kimura T, Tsuchiya Y, Suzuki S, Onishi N, Kuzumaki N, Matsuzaki Y, Narita M, Ikeda E, Okanoya K, Seino K, Saya H, Okano H, Miura K.
Tumour resistance in induced pluripotent stem cells derived from naked mole-rats.
Nat Commun. 7:11471, 2016. doi: 10.1038/ncomms11471. (査読あり)

(6) Tsuchihashi K, Okazaki S, Ohmura M, Ishikawa M, Sampetrean O, Onishi N, Wakimoto H, Yoshikawa M, Seishima R, Iwasaki Y, Morikawa T, Abe S, Takao A, Shimizu M, Masuko T, Nagane M, Furnari FB, Akiyama T, Suematsu M, Baba E, Akashi K, Saya H, Nagano O.
The EGF Receptor Promotes the Malignant Potential of Glioma by Regulating Amino Acid Transport System xc(-).
Cancer Res. 76:2954-63, 2016. doi: 10.1158/0008-5472.CAN-15-2121. (査読あり)

(7) Yoshimura Y, Shiino A, Muraki K, Fukami T, Yamada S, Satow T, Fukuda M, Saiki M, Hojo M, Miyamoto S, Onishi N, Saya H, Inubushi T, Nozaki K, Tanigaki K.
Arsenic trioxide sensitizes glioblastoma to a myc inhibitor.
PLoS One. 10:e0128288, 2016. doi: 10.1371/journal.pone.0128288.（査読あり）

〔学会発表〕（計　2　件）
(1) 大西 伸幸、佐谷 秀行
In vivo エレクトロポレーションを用いたマウス発がんモデルならびに簡便な遺伝子改変マウス作製法の開発
第 77 回 日本癌学会学術総会
2018 年
(2) 大西 伸幸、佐谷 秀行
In vivo エレクトロポレーションを用いた新規マウス脳腫瘍モデルの開発
第 75 回 日本癌学会学術総会
2016 年

〔図書〕（計　0　件）

〔産業財産権〕
○出願状況（計　0　件）

○取得状況（計　0　件）

〔その他〕
ホームページ等

(1) 慶應義塾大学 医学部 先端医科学研究所 遺伝子制御研究部門
http://www.genereg.jp/
(2) researchmap
https://researchmap.jp/nobuyukionishi

６．研究組織
(1)研究分担者
無し
(2)研究協力者
無し

※科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属されます。