

厚生労働科学研究費補助金（食品の安全確保推進研究事業）  
分担報告書

3次元オルガノイド培養を用いたin vitroでの化学発がん研究

研究分担者 筆宝 義隆  
千葉県がんセンター研究所 発がん制御研究部 部長

研究要旨

化学発がん実験は従来げっ歯類を用いて個体レベルで行われてきたが、多大な時間と労力を要することなどから簡便かつ迅速な代替法の開発が求められていた。我々は以前、3次元培養下マウス初代培養上皮細胞への遺伝子導入により、in vitroでも個体レベルと同様の大腸がん発がん過程が再現可能であることを示したことから、本手法を化学発がん実験へ適用することを着想した。そこで、マウス由来肺オルガノイドに対してレンチウイルスベクター-shRNAを用いてがん抑制遺伝子をin vitroでノックダウンし、さらにタバコ由来肺発がん物質NNK(4-(methylnitrosamino)-1-(3-pyridyl)-1-butanone)を投与することで、肺発がん過程が再現可能か検証を進めている。現在ヌードマウスに接種し、皮下腫瘍が形成されるか経過観察中である。今後化学物質の投与方法を最適化するなどして新規発がん性試験としての確立を目指したい。

A．研究目的

化学物質の発がん性試験は通常マウスやラットを用いた長期試験により行われるため、莫大な時間と労力が必要とされる。また世界的な動物愛護意識の高まりもあり、動物実験の3Rの原則に照らし合わせて、何らかの代替法の開発が望まれていた。我々は以前、上皮細胞のみを用いても個体レベルと同様の発がん過程が3次元培養下で再現可能であることを示していることから、同手法を化学発がん実験へ応用することが可能か検討することを本研究の目的とした。

B．研究方法

C57BL/6Jマウス（野生型もしくはKras<sup>LSL-G12D/+</sup>）の肺を単離後に、酵素処理などにより一細胞レベルまで分散させた。腸管と同様の培養条件を用いてマトリゲル3次元初代培養を行い、オルガノイドとして長期間にわたり培養・継代を行った。また、レンチウイルスを用いて野生型マウス由来正常オルガノイドにがん抑制遺伝子であるp16やPTEN などに対するshRNAを導入し、実際にタンパクレベルでノックダウンされていることを確認した。Kras<sup>LSL-G12D/+</sup>マウス由来正常オルガノイドにはCre-recombinase遺伝子を導入し、Cre-loxPシステムを利用したSTOPコドンの除去による活性型変異アレルの発現を誘導した。肺オルガノイドに対してはタバコに含まれる代表的な発がん物質である4-(methylnitrosamino)-1-(3-pyridyl)-1-butanone(以後NNK)を0~5000μM

の濃度で1-3回オルガノイドに投与した後に腫瘍原性の検証を行うためにヌードマウス皮下に10<sup>6</sup>細胞ずつ接種した。

C．研究結果

肺由来の上皮細胞はオルガノイドとして半永久的に培養・継代することが可能だった。レンチウイルスによる遺伝子導入効率も常に90%を超えており、またGFPを導入した際にも陽性細胞が数ヶ月にわたり培養されていたことから幹細胞のゲノムへ安定的に遺伝子が導入されたと結論付けた。遺伝子異常未導入の場合にはNNK投与後の肺由来オルガノイドは腫瘍を形成しなかったため、現在p16やPTENに対するshRNAを導入した肺オルガノイド、あるいはKrasを活性化した肺オルガノイドへNNKを投与したのちにヌードマウス皮下に移植し腫瘍形成能を検証している。本実験系においては、これまでにKras変異とp16やPTENに対するshRNAの導入により腺癌類似の腫瘍が誘導されている。一方、今回、PTENに対するshRNAを導入した肺オルガノイドでは、通常であれば嚢胞状の形態のところは充実性かつ乳頭状に変化し、組織学的にも扁平上皮化生が強く示唆される初見を見出したことから、発がん物質を投与することで扁平上皮癌を誘導できる可能性が浮上してきている。これまでに各種臓器由来の細胞から得られた腫瘍はすべて腺癌であり、扁平上皮癌は皆無であった。喫煙は扁平上皮癌のリスク因子であることから、PTENのノックダウンとNNK投与の組み合

わせにより扁平上皮癌の誘導に成功した場合、極めて新規性の高い結果となることから慎重に観察を進めていく予定である。

(倫理面への配慮)

本研究ではヒト検体を使用しておらず、動物実験およびDNA組み替え実験に関しては機関内の委員会に本研究の申請を行い、承認を得た後に、規定を遵守して研究を行った。

D. 研究発表

1. 論文発表

(1) Maru Y, Orihashi K, Hippo Y. Lentivirus-based stable gene delivery into intestinal organoids. *Methods Mol Biol*, in press

2. 学会発表

- (1) Yoshiaki Maru, Tetsuya Matsuura, Masako Ochiai, Yoshitaka Hippo (口演).  
Lentivirus-based Tumor Induction from Upper Gastrointestinal Tract 「個体レベルでのがん研究支援活動」ワークショップ(大津)2016年2月
- (2) Tetsuya Matsuura, Masako Ochiai, Toshio Imai, Yoshitaka Hippo. Induction of Pancreatic Ductal Adenocarcinoma from Primary Murine Pancreatic Cells 「個体レベルでのがん研究支援活動」ワークショップ(大津)2016年2月
- (3) Yoshitaka Hippo, Masako Ochiai, Kaoru Orihashi, Yoshiaki Maru, Tetsuya Matsuura, Toshio Imai. A Novel Cell-based Model for Intrahepatic Cholangiocarcinoma (英語口演). 第74回日本癌学会総会(名古屋)2015年10月
- (4) Tetsuya Matsuura, Kaoru Orihashi, Masako Ochiai, Hitoshi Nakagama, Toshio Imai, Yoshitaka Hippo. Direct transformation of primary murine pancreatic ductal cells in vitro (口演). 第74回日本癌学会総会(名古屋)2015年10月
- (5) Yoshiaki Maru, Kaoru Orihashi, Tetsuya Matsuura, Masako Ochiai, Toshio Imai, Yoshitaka Hippo. Lentivirus-based Tumor Induction from Murine Gastric Organoids. 第74回日本癌学会総会(名古屋)2015年10月
- (6) 落合雅子、松浦哲也、中釜 斉、今井俊夫、筆宝義隆. マウス正常腸管上皮細胞の3次元培養系を用いる発がん再構成系に対する PhIP の修飾作用. 第74回日本癌学会総会(名古屋)2015年10月
- (7) 筆宝義隆(招待講演)「in vitroでの発がん再構成」お茶の水がん学アカデミア第117回集会(東京)2015年9月

- (8) 筆宝義隆、松浦哲也、落合雅子、今井俊夫、折橋郁、丸喜明(口演)「3次元初代培養を用いた膵管・胆道発がんモデルの確立」第30回発がん病理研究会(小豆島)2015年8月
- (9) 落合雅子、松浦哲也、中釜 斉、筆宝義隆、今井俊夫(口演)「マウス正常腸管上皮の3次元培養法を用いる発がん再構成系に対する PhIP の修飾作用」第30回発がん病理研究会(小豆島)2015年8月
- (10) 筆宝義隆(口演)「3次元初代培養を利用した新規肝内胆管がんモデルの確立と個別化医療への応用」第19回日本がん分子標的治療学会学術集会(松山)2015年6月
- (11) 松浦哲也、筆宝義隆「マウス初代培養細胞による膵管がん発がん過程の再現」第19回日本がん分子標的治療学会学術集会(松山)2015年6月
- (12) 落合雅子、松浦哲也、中釜 斉、筆宝義隆、今井俊夫「正常上皮細胞の3次元培養による *in vitro* 発がんモデルの開発 - 化学発がん・予防研究への応用に向けて」第22回日本がん予防学会(さいたま)2015年6月
- (13) 筆宝義隆(口演)「3次元初代培養を利用した新規肝内胆管がんモデルの確立」第22回肝細胞研究会(米子)2015年6月

E. 知的財産権の出願・登録状況

1. 特許取得

なし

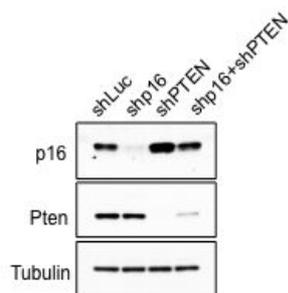
2. 実用新案登録

なし

3. その他

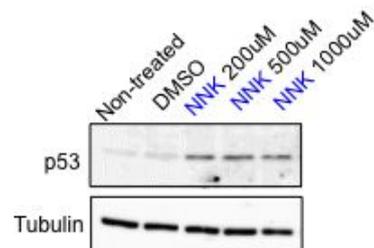
なし

図1 肺オルガノイドへの shRNA 導入による癌抑制遺伝子のノックダウン



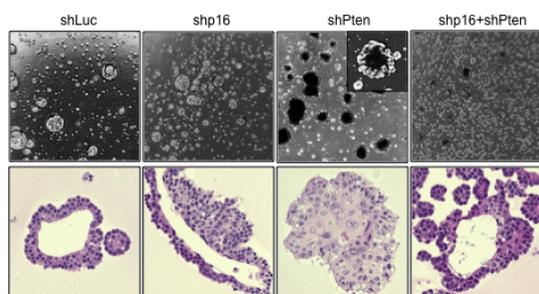
遺伝子導入後の野生型マウス肺オルガノイドの Western Blotting。タンパクレベルで各遺伝子のノックダウンを確認した。shLuc はルシフェラーゼ遺伝子に対する shRNA であり、陰性コントロールに相当する。Tubulin はローディングコントロール。

図3 肺オルガノイドに対する NNK 投与による p53 活性化



NNK を肺オルガノイド 3 次元培養の培養上清に添加後 24 時間でタンパクを回収して Western Blotting を行った。Tubulin はローディングコントロール。

図2 肺オルガノイドの形態変化



上段は 3 次元培養の位相差顕微鏡明視野画像。shPten のみ拡大したオルガノイドを示す。他では管腔構造を示す嚢胞性のオルガノイドだが shPten のみ充実性の形態に変化して大型で黒色の凝集塊となっている。下段は H&E 染色像であり、やはり shPten 導入オルガノイドのみ充実性であり扁平上皮化生が示唆される。

研究成果の刊行に関する一覧表

書籍

著者氏名	論文タイトル名	書籍全体の 編集者名	書 籍 名	出版社名	出版地	出版年	ページ
	該当なし						

雑誌

発表者氏名	論文タイトル名	発表誌名	巻号	ページ	出版年
Maru Y, Orihashi K, <u>Hippo Y.</u>	Lentivirus-based stable gene delivery into intestinal organoids.	<i>Methods Mol Biol</i>	in press		2016