

オルガノイド皮下移植系実験

研究分担者 落合 雅子
国立研究開発法人国立がん研究センター研究所 主任研究員

研究要旨

腫瘍性病変をエンドポイントとするオルガノイド系を用いる食品添加物等の遺伝毒性・発がん性の短期包括的試験法を開発する。正常マウスの各種臓器からオルガノイドを調整し、遺伝的再構成もしくは化学物質に暴露させた後に、ヌードマウス皮下に移植して腫瘍形成能を解析する試験を担当した。

大腸オルガノイドの腫瘍形成能の解析は、LSL*Kras*^{G12D/+}マウス由来オルガノイドの場合、*Kras*活性化のみでは皮下での上皮細胞の増殖は認められたが、異型性はなく、*Apc* shRNAを追加導入（*Kras*^{G12D} sh*Apc*）しても同様であった。*Kras*^{G12D} sh*Pten*では異型腺管の増殖が認められ、*Kras*^{G12D} sh*Apc* +shp53もしくは*Kras*^{G12D} sh*Apc* +sh*Pten*では、がん組織の増殖が認められた。B6由来大腸オルガノイドでは、sh*Apc*のみでは異型性のない上皮細胞の増殖が認められたのみで、sh*Apc* sh*Pten*、sh*Apc* sh*Pten* +shp53の場合に、異型腺管の増殖が認められた。膀胱に関しては、遺伝的再構成による発がんへの影響が示唆された。大腸オルガノイドへの腸管発がん物質PhIPの暴露をモデル系として、化学物質のオルガノイドへの細胞毒性の解析には、NADの還元能を指標とした96 well plateベースの細胞生存性測定試験が利用可能であり、化学物質暴露の際の用量設定に有用であることを示した。

各臓器からのオルガノイドの作成、遺伝的再構成による腫瘍形成能の確認、化学物質のオルガノイドへの細胞毒性の解析による用量設定は、試験法開発のための基礎的データとなる。次年度以降は、化学物質、臓器などの種類を増やして解析する予定である。

（具体的かつ詳細に記入すること）

A．研究目的

腫瘍性病変をエンドポイントとするオルガノイド系を用いる食品添加物等の遺伝毒性・発がん性の短期包括的試験法を開発する。正常マウスの各種臓器からオルガノイドを調整し、遺伝的再構成もしくは化学物質に暴露させた後に、ヌードマウス皮下に移植して腫瘍形成能を解析する試験を担当する。

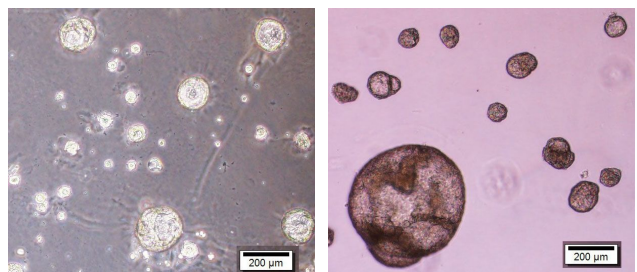
マウス小腸オルガノイドを用いて、レンチウイルスを用いたがん抑制遺伝子shRNAの導入により、遺伝的再構成を行い、ヌードマウス皮下に移植すると腫瘍様組織を形成可能であることは既に報告した（Onuma K et al., PNAS, 2013）。他臓器に関しては、大腸、肺、膀胱等は、オルガノイド系の調整法を確立している。まず、これらのオルガノイドにレンチウイルスを用いた遺伝子導入による遺伝的再構成を行い、ヌードマウス皮下への移植により、腫瘍形成能を確認する。同時に、オルガノイドへの化学物質の暴露方法や用量設定の手法を検討し、遺伝毒性・発がん性の短期包括的試験法の開発のための基礎的データを得る。

B．研究方法

B6マウスもしくは、LSL-*Kras*^{G12D}マウスの大腸及び膀胱からオルガノイドを作成した。図1に大腸及び膀胱オルガノイドの培養像を示す。

大腸に関しては、LSL-*Kras*^{G12D}マウス由来のオルガノイドを用いた場合は、レンチウイルスにより、Cre recombinase遺伝子を導入して*Kras*を活性化した後に、がん抑制遺伝子shRNAを追加導入した。

図1 大腸及び膀胱オルガノイドの培養像



大腸

膀胱

C57BL6/J(B6)マウス由来大腸オルガノイドの場合は、まず、*Apc* shRNA(sh*Apc*)を導入した後に、他のがん抑制遺伝子shRNAの追加導入を行い、ヌードマウス皮下に移植後、4~6週間で腫瘍形成及び組織型の解析を行った。

膀胱に関しても、B6マウス由来のオルガノイドに、*Pten* shRNAをレンチウイルスで導入し、ヌードマウス皮下に移植後8週間で腫瘍形成及び組織型の解析を行った。

オルガノイドへの化学物質の暴露は、オルガノイドの継代時に行った。オルガノイドの播種から2時間後に、S9 mix（化学物質の代謝活性化のため）存在下、24時間化学物質に暴露させた。暴露終了時に測定試薬を含む培地と交換し、化学物質のオルガノイドに対する細胞毒性を、NADの還元能を指標とした96 well plateベースの細胞生存性測定試験（同じplateを用いて、3日間以上の連続した解析が可能）

を用いて解析した。

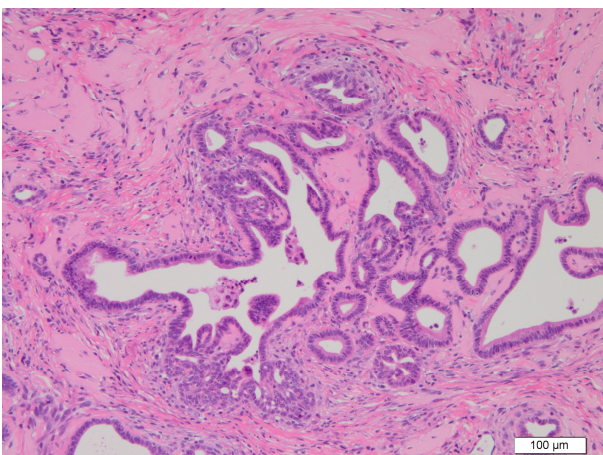
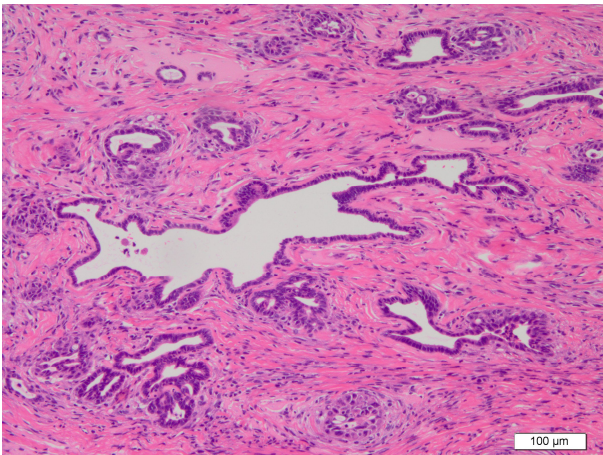
C. 研究結果

ヒト腸管発がんでは、大部分は大腸に腫瘍が発生するので、小腸のみならず、大腸由来のオルガノイドが利用可能かという点は非常に重要である。そこで、マウス正常大腸由来のオルガノイドに関して、腫瘍形成能を有するか否かを、遺伝的再構成による発がんから解析した。LSL*Kras*^{G12D/+}マウス由来大腸オルガノイドの場合、*Kras*活性化のみでは皮下での上皮細胞の増殖は認められたが、異型性はなく、*Apc* shRNAを追加導入 (*Kras*^{G12D} sh*Apc*) しても同様であった。*Kras*^{G12D} sh*Pten* では異型腺管の増殖が認められ、*Kras*^{G12D} sh*Apc* +shp53 もしくは *Kras*^{G12D} sh*Apc* +sh*Pten* では、がん組織の増殖が認められた。ヌードマウス皮下腫瘍のマクロ像(図2a)と組織写真(図2b)を示す。

図2a LSL*Kras*^{G12D/+}マウス由来大腸オルガノイドの遺伝的再構成-ヌードマウス皮下腫瘍のマクロ像



図2b:組織写真(上段1、下段2)



B6由来大腸オルガノイドでは、sh*Apc*のみでは異型性のない上皮細胞の増殖が認められたのみで、sh*Apc* sh*Pten*, sh*Apc* sh*Pten*+shp53の場合に、異型腺管の増殖が認められた。図3にヌードマウス皮下腫瘍の組織写真を示す。表1に小腸オルガノイドを用いた場合の遺伝的再構成による発がんの結果との比較を示す。例えば、小腸オルガノイドの場合には、B6でのsh*Apc*のみで異型腺管の増殖が認められる場合があるが、大腸オルガノイドでは、MOCKの場合と組織型は変わらず、大腸オルガノイドの方が腫瘍形成には、より多くの遺伝子変化を必要とする傾向が認められた。*Apc*^{flin}マウス(*Apc*変異を片方のアレルに持つ)での、腸管の自然発生腫瘍の発生個数が小腸に非常に多く、大腸では極く少ないこととも一致する。また、大腸オルガノイドでも、*Kras*活性化に加えてsh*Apc*の導入、更にshp53もしくはsh*Pten*を導入すれば、がん組織の増殖が認められたので、腫瘍形成能を有することが証明された。

表1 マウス正常小腸/大腸由来オルガノイドの遺伝的再構成による発がん

Mouse	遺伝的再構成	小腸 ^{*1,2}	大腸 ^{*2}
B6	MOCK	- ~ ±	- ~ ±
B6	sh <i>Apc</i>	± ~ +	- ~ ±
B6	shp53	NT	- ~ ±
B6	sh <i>Pten</i>	- ~ ±	±
B6	shp53 + sh <i>Pten</i>	- ~ ±	±
B6	sh <i>Apc</i> shp53	++	- ~ ±
B6	sh <i>Apc</i> sh <i>Pten</i>	++	+
B6	sh <i>Apc</i> shp53 + sh <i>Pten</i>	++	+

<i>Kras</i> ^{LSL-G12D/+}	MOCK	- ~ ±	- ~ ±
<i>Kras</i> ^{LSL-G12D/+}	Cre	± ~ +	±
<i>Kras</i> ^{LSL-G12D/+}	Cre sh <i>Apc</i>	++	±
<i>Kras</i> ^{LSL-G12D/+}	Cre shp53	NT	±
<i>Kras</i> ^{LSL-G12D/+}	Cre sh <i>Pten</i>	NT	+
<i>Kras</i> ^{LSL-G12D/+}	Cre sh <i>Apc</i> + shp53	NT	++
<i>Kras</i> ^{LSL-G12D/+}	Cre sh <i>Apc</i> + sh <i>Pten</i>	NT	++

*1 Onuma K et al., PNAS, 2013より

*2 組織型

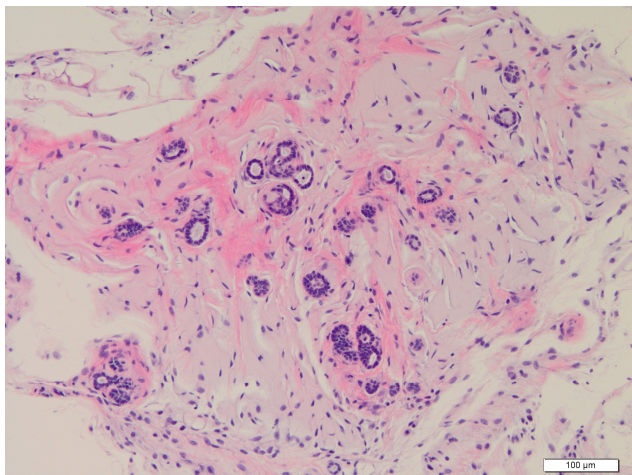
- ; No cells/organoids retention
- ± ; Proliferated glands without atypia
- + ; Dysplasia
- ++ ; Carcinoma
- NT ; Not tested

膀胱に関しても、B6マウスからオルガノイドを作成することが可能であるが、ヌードマウス皮下に移

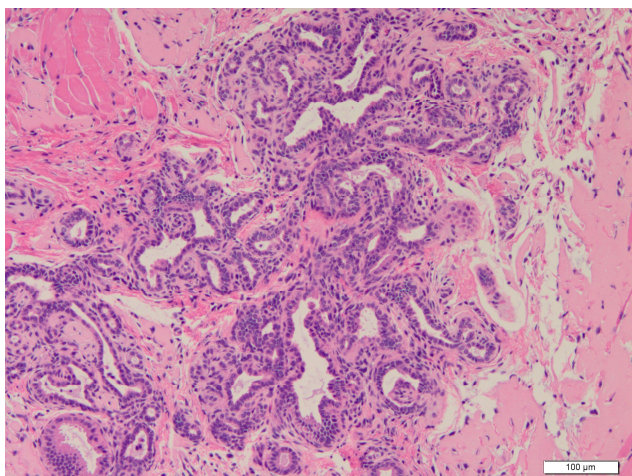
植した場合には、MOCKを導入しただけのオルガノイドの場合には、上皮細胞が若干認められたのみであった。*Pten* shRNAを導入したオルガノイドでは、腺管が大きくなるなどの細胞増殖への影響が認められ、遺伝的再構成による発がんへの影響が示唆された。

図3: B6由来大腸オルガノイドの遺伝的再構成- ノードマウス皮下腫瘍の組織写真

sh*Apc* sh*Luc*



sh*Apc* sh*p53*+sh*Pten*



化学物質のオルガノイドに対する細胞毒性の解析に関しては、齧歯類において、腸管への発がん性が報告されているPhIPをモデル化合物として用いて、大腸オルガノイドに暴露させる系において解析した。1 well当たり5000~10000個の細胞数を播種した場合に、NADの還元能を指標とする細胞生存性測定試験において、細胞数に応じた増殖曲線を示し、この試験が、細胞増殖を反映していることが示された。PhIPを0.05~10 μMの濃度で(S9mix存在下)、24時間暴露し、暴露終了時点から72時間まで測定した。72時間の時点で、0 μMに比して、1 μMまでは差が認められず、2~10 μMで約9割の細胞生存であったが、細胞増殖の停止などは認められなかった。PhIPが、用量依存性に細胞生存性に影響を与えることが示され、化学物質の暴露の際の用量設定の基礎的データ

となることが示された。今後、細胞生存性測定試験でのどのポイント(0 μMに比して8~9割の細胞生存か、細胞増殖の停止が誘発される用量か等)を最大用量とするかは、複数回暴露を行い、腫瘍形成能を解析した結果と比較して検討を行う必要がある。大腸オルガノイドを用いた解析結果を示したが、どの臓器由来のオルガノイドにもこの解析法は応用可能である。

各臓器からのオルガノイドの作成、遺伝的再構成による腫瘍形成能の確認、化学物質のオルガノイドへの細胞毒性の解析による用量設定は、試験法開発のための基礎的データとなる。次年度以降は、化学物質、臓器などの種類も増やして解析する予定である。

(倫理面への配慮)

動物実験の実施に際しては、各研究施設の動物実験倫理委員会の承認を得た後に行い、実験動物に対する動物愛護に関して十分配慮して行った。遺伝子組換え生物等を用いる実験については、実施機関の承認を得た。

D. 研究発表

1. 論文発表

なし

2. 学会発表

1. 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、がん予防学術大会2015さいたま、さいたま、2015年6月。

2. 落合 雅子、松浦 哲也、中釜 斉、筆宝 義隆、今井 俊夫。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回発癌病理研究会、小豆島、2015年8月。

3. 落合 雅子、松浦 哲也、中釜 斉、筆宝 義隆、今井 俊夫。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74回日本癌学会学術総会、名古屋、2015年10月。

4. 落合 雅子、中釜 斉。マウス正常上皮細胞の3次元培養法を用いる*in vitro*発がんモデルの開発、日本環境変異原学会第44回大会、福岡、2015年11月。

(発表誌名巻号・頁・発行年等も記入)

E. 知的財産権の出願・登録状況

(予定を含む。)

1. 特許取得

なし

2. 実用新案登録

なし

3. その他

なし