

## In vitro発がん再構成系の確立およびその応用研究

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

マウス由来の小腸や肺オルガノイドに種々の遺伝子異常を導入した上で、発がん性化学物質を投与することで、従来in vivoで行われていた発がん性試験を代替可能か検討した。Apc遺伝子をノックダウンした小腸オルガノイドに対するPhIPの投与では発がん性の亢進が確認された。一方、p16, Pten等をノックダウンした肺オルガノイドではNNKの投与による顕著な発がん性の亢進は今の所確認できず、発がん性の検出には条件検討が必要と考えられた。また、新規の発がんモデル系として胆のうおよび子宮由来のオルガノイドからも発がん誘導が可能であることを確認し、今後種々の化学物質のアッセイへの利用に有用な実験系と考えられた。

## A. 研究目的

個々の化学物質の発がん性は、従来もっぱら個体レベルでの長期間の投与や観察により評価をされていた。一方、オルガノイドを用いた細胞レベルの発がんモデル実験系は、種々の遺伝子異常を導入した上で化学物質を投与することで、短期間かつ高感度に化学物質の協調的な発がん性を検出することが期待される。そこで、こうしたコンセプトの正しさを実際に証明することを目的とした。また、アッセイ可能な臓器の種類を増やす目的で他の組織由来のオルガノイドからも発がん誘導が可能であるか検討した。

## B. 研究方法

マウスから各種臓器を単離した上で、酵素的および物理的に細胞の分散を行った上で、マトリゲルを用いた3次元培養を行った。オルガノイドの培養にはEGF, Noggin, R-spondinなどを添加したメディウムを用い、遺伝子の導入にはレンチウイルスベクターを用いた。shRNAの導入後には標的遺伝子のノックダウンを確認し、PhIPやNNKなどの投与を種々の濃度で行った。また、新規の発がんモデル系を確立するために胆のうと子宮について、遺伝子変異の組み合わせによる発がん性誘導の検証を行った。

## C. 研究結果

## 1. 小腸オルガノイド

大腸発がん物質であるPhIPはマウスではリンパ腫を発症させるため、これまで腸管での発がん性を調べることは技術的に困難だった。B6マウス由来の小腸細胞について、shApcおよびshLuc(陰性対照)を導入したのちにS9mixの存在下でPhIPを種々の条件で投与してヌードマウス皮下に移植したところ、shApcの存在下でのみ腫瘍が形成される場合があることを見出した。左右の両側に移植しても片側のみ腫瘍が形成される場合もあることから、Apc変異、PhIPの変異原性、皮下組織の微小環境の間で確率的に発がん協調作用が成立している可能性が示唆された。現在症例を増やして腫瘍発生率の計測を進めている。

## 2. 肺オルガノイド

NNKはタバコ中の主要な発がん物質であり、げっ歯類への投与により肺腺癌を誘導することが知られている。また、特にAJマウスへの投与ではKras変異を高率に誘導することから、肺オルガノイドへの投与でも同様の効果が期待される。肺オルガノイドへのKras変異誘導は単独では発がん性を持たず、p16やPtenなどのノックダウンを必要とすることから、あらかじめこれらの遺伝子をshRNAでノックダウンしておくことで、NNKによる変異導入を高感度で検出することが可能になると予測した。IC50のNNK濃度で投与を3回繰り返したのちに、ヌードマウス皮下へ移植したところ、NNKの有無による発がんへの顕著な効果を見られなかった。より低濃度で長期間暴露した場合に発がん性が検出可能となると推測して、現在経過観察を行っている。

## 3. 新規発がんモデルの確立

胆のうと子宮について、それぞれマウスより単離してオルガノイド培養を行った。それぞれCreの導入によりKrasおよびPik3caの活性化を行ったところ、それら単独では腫瘍系性に至らなかった。そこで、がん抑制遺伝子のノックダウンを組み合わせたと、特定の遺伝子との組み合わせでのみ腺癌類似の組織像を呈する腫瘍が誘導された。これらの細胞も化学物質の発がん性検出に利用可能と考えられた。

## (倫理面への配慮)

動物実験計画は千葉県がんセンター内の動物実験研究委員会の承認を得た上で行い、動物愛護への十分な配慮を行った上で遂行した。ヒト検体を用いた実験を行っていない

## D. 研究発表

## 1. 論文発表

(1) Kangawa Y, Yoshida T, Maruyama K, Okamoto M, Kihara T, Nakamura M, Ochiai M, Hippo Y, Hayashi SM, Shibutani M. Cilostazol and enzymatically modified isoquercitrin attenuate experimental colitis and colon cancer in mice by inhibiting cell proliferation and inflammation. *Food Chem Toxicol*. 100:103-114. 2017

(2) Maru Y, Tanaka N, Ohira M, Itami M, Hippo Y, Nagase H. Identification of novel mutations in Japanese ovarian clear cell carcinoma patients using optimized targeted NGS for clinical diagnosis. *Gynecol Oncol*. 144(2):377-383 . 2017

(3) Maru Y, Orihashi K, Hippo Y. Lentivirus-based stable gene delivery into intestinal organoids. *Methods Mol Biol*, 1422:13-21. 2016

## 2. 学会発表

(1) 筆宝義隆、丸喜明、落合雅子、松浦哲也、今井俊夫（英語口演）オルガノイドを用いた胆嚢発がんモデルの確立。第75回日本癌学会学術総会（横浜）2016年10月

(2) 丸喜明、落合雅子、今井俊夫、筆宝義隆（口演）オルガノイドを用いた卵巣がんモデルの開発。第75回日本癌学会学術総会（横浜）2016年10月

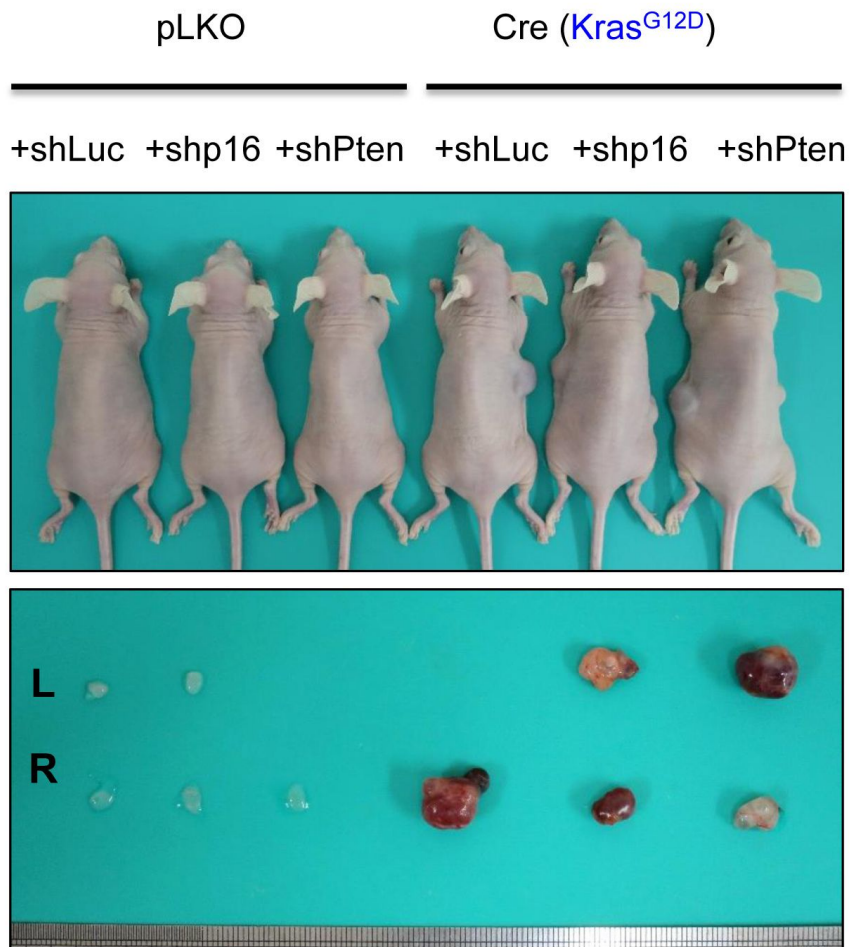
(3) 落合雅子、松浦哲也、中釜斉、筆宝義隆、今井俊夫。マウス正常大腸上皮細胞の3次元培養による in vitro 発がんモデルの開発。第75回日本癌学会学術総会（横浜）2016年10月  
（発表誌名巻号・頁・発行年等も記入）

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



pLKO+shp16

Cre+shp16

Cre+shp16  
(再移植)

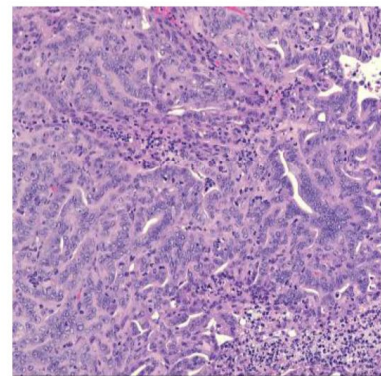
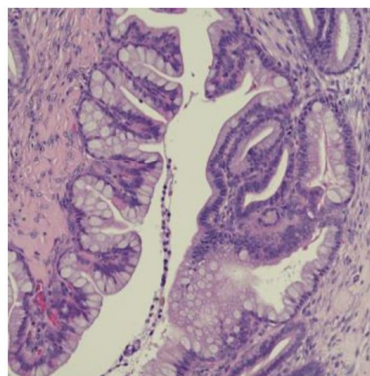
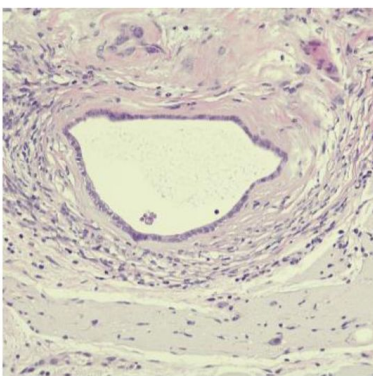


図1 LSL-*Kras*<sup>G12D</sup>マウス胆のうオルガノイド由来皮下腫瘍

