

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）
分担研究年度終了報告書

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複数導入することで発がん誘導が可能であることを確認している。本実験系を利用して、単独では発がんに不十分な遺伝子変異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 vitroで行われていた発がん性試験を代替可能か検討した。小腸におけるApcノックダウンとPhIPは発がん協調作用を検出したが、NNK投与では肺腫瘍形成に至らなかった。また、新規の発がんモデル系として胆のう、子宮、卵管、胃由来のオルガノイドへの遺伝子導入により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、本研究では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多数の組織由来のオルガノイドを用いて同様の発がんモデルの確立を進めることを目的とした。

B．研究方法

1. 遺伝子改変オルガノイドを用いた化学発がん

げっ歯類で発がん性が確認されているPhIP（大腸がん）およびNNK（肺がん）を当該臓器（小腸および肺）由来の遺伝子改変オルガノイド（Apc, Pten, p16, Kras変異等）に種々の濃度で投与してヌードマウス皮下へ移植した。腫瘍径の大きさや組織像の悪性化を指標にして、上記化学物質の発がん性の検出が可能か検討を行った。なお、コントロールとしては空バクターやLuciferaseに対するshRNAなどを用いた。

2. 新規発がんモデルの確立

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などを添加した血清非含有メディウムを用い、遺伝子の導入にはレンチウイルスベクターを用いた。Cre-recombinaseやshRNAの導入後には、Cre-LoxPによる当該遺伝子の組み替えや標的遺伝子のノックダウンをそれぞれゲノムPCRやWestern Blottingにより確認した。このようにして得られた遺伝子導入後のオルガノイドをヌードマウス皮下へ移植して、2ヶ月間観察を行い腫瘍形成能を評価した。得られた皮下腫瘍は組織学的な解析を行うと同時に再び3次元培養を行った。今年度は新規の発がんモデル系を確立するために胆のうと子宮、卵管、胃について単独および複数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. 遺伝子改変オルガノイドを用いた化学発がん

肺のshRNA導入オルガノイドへのNNK投与に関しては、投与回数、投与量、培養期間などのパラメーターを変更して実験を繰り返したものの、NNK投与による明確ながん悪性化の効果は確認できなかった。KrasG12D変異に関して同様の実験を行い、現在経過観察を行っている。腸管に関しては以前shApcとPhIPの発がん協調作用を検出しているため、Apc-KOおよびKrasG12D変異についてもPhIPの協調作用が検出されるか、現在解析を進めている。

2. 新規発がんモデルの確立

卵管と子宮内膜に関してはKras^{G12D}変異+shp16/p19またはp53KOにより100%の確率で癌肉腫（Carcinomaと

Sarcomaの成分の両方を含む病変)が得られることを見出した。Sarcomaへの変化は不可逆的であり、上皮間葉転換とは異なる分子機序が想定された。また、子宮オルガノイドに関しては、Kras^{G12D}変異+shPtenおよびPik3ca^{H1047R}変異+shPtenの両方で通常の腺癌と同様の組織像の腫瘍形成をみた。胆のうに関してはKras^{G12D}変異+shp16/p19変異で通常の腺癌が得られた。いずれも単独の変異では腫瘍形成が見られなかった。また、胃に関してもp53K0、Kras^{G12D}変異、shCdh1のそれぞれ単独では腫瘍が得られなかったものの、p53K0+shCdh1の導入により印環細胞を含む腫瘍が得られ、Kras^{G12D}変異+p53K0により腺管の分枝や腸上皮化生が顕著に認められる腫瘍の形成を認めた。これらの腫瘍は複数遺伝子変異の協調作用により初めて認められ、単独の変異では腫瘍形成に至らないことから、単独変異導入オルガノイドへの化学物質による変異導入を高感度に検出する実験系の構築に有用であると考えられた。

(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) Enjoji S, Yabe R, Tsuji S, Yoshimura K, Kawasaki H, Sakurai M, Sakai Y, Takenouchi H, Yoshino S, Hazama S, Nagano H, Oshima H, Oshima M, Vitek M, Matsuura T, **Hippo Y**, Usui T, Ohama T, and Sato K. SET/PP2A/E2F1 Axis Enhances Gastric Cancer Cell Stemness, *Mol. Cancer. Res.* 16(3): 554-563, 2018
- (2) Sato T, Morita M, Tanaka R, Inoue Y, Nomura M, Sakamoto Y, Miura K, Ito S, Sato I, Tanaka N, Abe, Takahashi S, Kawai M, Sato M, **Hippo Y**, Shima H, Okada Y and Tanuma N. Ex vivo model of non-small cell lung cancer using mouse lung epithelial cells. *Oncology Lett.* 14: 6863-6868, 2017

2. 学会発表

- (1) 丸 喜明、**筆宝 義隆** (示説)オルガノイドへの遺伝子導入による子宮内膜発がん.第76回日本癌学会学術総会(横浜)2017年9月
- (2) **筆宝 義隆**(英語シンポジウム:招待口演)オルガノイド移植モデルおよびPDXによる胆道・膵管発がん再構成.第76回日本癌学会学術総会(横浜)2017年9月
- (3) 松浦 哲也、加藤 真吾、落合 雅子、今井 俊夫、中島 淳、**筆宝 義隆** (示説)in vitro モデルが明らかにするマウス膵管発がんにおける微小環境の重要性.第76回日本癌学会学術総会(横浜)2017年9月
- (4) 丸喜明、**筆宝義隆**(口演)マウスオルガノイドを用いた子宮内膜発がん過程の再現.第32回発癌病理研究会(大津)2017年8月
- (5) **筆宝義隆**(シンポジウム)3次元オルガノイド培養のがん研究への応用、第26回日本癌病態治療研究会(横浜)2017年6月
- (6) **筆宝義隆**(招待講演 Human Cell セミナー)オルガノイドを用いた発がん過程のin vitro再構成.第58回日本臨床細胞学会総会春季大会(大阪)2017年5月
- (7) 丸 喜明、田中尚武、**筆宝義隆**(口演)オルガノイド培養を用いた細胞レベルの子宮体がん発がんモデルの開発.第58回日本臨床細胞学会総会春季大会(大阪)2017年5月
- (8) 丸 喜明、田中尚武、**筆宝義隆**(口演)オルガノイド培養を用いた卵巣がん発がんモデルの開発.第106回日本病理学会総会(東京)2017年4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