

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）
分担総合報告書

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でも個体レベルとほぼ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。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タバコ由来肺発がん物質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。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。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

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、上皮細胞オルガノイド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。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、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。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も目的とした。

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

1.1 腸管化学発がん 食事由来変異原でありラットで大腸発がん性が確認されているPhIPについて、マウスではリンパ腫を発症してしまい腸管発がん性の有無はこれまで検出不可能だ

った。腸管オルガノイドにおけるApcのノックダウンにより弱い腫瘍原性を認めることから、ApcノックダウンオルガノイドにS9mixにより代謝活性化を行ったPhIPを投与することにより、腫瘍原性の増強が認められるか、同様に検証した。

1.2 肺化学発がん タバコ由来変異原である4-(methylnitrosamino)-1-(3-pyridyl)-1-butanone（以後NNK）はマウスへの投与で肺がんを誘発可能で、AJマウスに対してはKras変異を高頻度で誘発することが知られている。オルガノイドを用いた発がんモデルではKras変異は単独では腫瘍形成に不十分だが、p16やPtenのノックダウンを組み合わせた場合に腫瘍形成が誘導可能であることを確認している。そこで、p16やPtenのノックダウンをあらかじめ行った肺オルガノイドにNNKを0～5000 μ Mの濃度で1-3回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10⁵細胞ずつ接種した。

2．新規発がんモデルの確立

3次元培養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アウムを用い、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マトリゲルと混和してヌードマウス皮下へ移植して、2ヶ月間経過観察した。その際、コントロールと比較した腫瘍径、腫瘍形成率、組織像の変化を指標として腫瘍形成能を評価した。コントロールとしては空ベクターやLuciferaseに対するshRNAなどを用いた。得られた皮下腫瘍は組織学的な解析に供すると同時に同時に再び3次元培養を行った。これまでに腸管、肺、膵臓、胆道に関して発がんモデルを確立しているが、新規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

1.1 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。

1.2 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。

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が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。

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p53K0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)が見出された。上皮細胞から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。一方で、shPten単独では腫瘍形成に不十分であり、子宮特異的PtenK0のみで発がんしたとするin vivoモデルの過去の報告と乖離を認めた。子宮特異的な微笑環境の影響や間質でのPtenK0が協調的に発がんを促進していた可能性がある。

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が、単独の変異では腫瘍形成が見られなかった。Kras^{G12D}変異にp53K0いずれも加えた場合には腺癌が誘導され、婦人科系腫瘍とは異なり癌肉腫の発症は認めなかった。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。興味深いことに胃特異的なKras^{G12D}変異+p53K0では腫瘍形成が見られないことが知られている。一般的に化学発がんでは胃がんに誘導は容易ではないことと考え合わせると、in vivoでは発がん抑制因子が存在する可能性が示唆される。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)

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) 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

(3) 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

(4) 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

(5) 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) 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

(9) 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

(10) 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

(11) 落合雅子、松浦哲也、中釜 齊、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

(12) 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

(13) 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

(14) 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

(15) 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

(16) 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

(17) 落合雅子、松浦哲也、中釜 齊、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

（18）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

（19）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

（20）落合雅子、松浦哲也、中釜 齊、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

（21）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

（22）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

（23）落合雅子、松浦哲也、中釜 齊、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

（24）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

