

香料等の遺伝毒性・発がん性短・中期包括的試験法の開発と、その標準的安全性評価法の確立に関する研究

分担研究課題名：オルガノイドを用いた新規発がんモデルの作成

研究分担者 筆宝義隆 千葉県がんセンター・研究所・発がん制御研究部長

研究要旨

遺伝子変異の蓄積はがんの大きな特徴であり、近年のがんゲノム解析の進展に伴いすでに多数の異常が報告されている。しかし、そのうち遺伝子改変マウスの作製などにより個体レベルで実際にがんの原因であることが確認されたものはごく一部にとどまり、検証の迅速化が求められている。近年、3次元オルガノイド培養法の発達により様々な組織の正常細胞の培養が可能になったことを受けて、我々は様々な臓器由来のマウス正常細胞に対してレンチウイルスにより極めて高い効率で複数の遺伝子異常を再現する手法を確立し、ヌードマウス皮下において短期間で発がんを誘導する実験系の確立を進めている。発がん過程を細胞レベルで迅速に再現するため、発がん機構の詳細な解析を可能にするのみならず、個々の変異の発がん性への寄与度の検証や作製したがん細胞を用いた治療法の評価を容易にするなど、がん研究の様々な分野における高い有用性が期待されている。胃がんに関しては、がんで変異頻度が高い遺伝子の改変マウスによる発がんモデルは数が少なく、また化学発がんにも抵抗性であることが知られている。そこで、本年度は胃がんで変異頻度の高いT53、CDH1、KRASに着目し、マウス正常胃オルガノイドに単独または複数の遺伝子異常を再現することで、ヌードマウス皮下における腫瘍形成能を評価した。単独の異常では腫瘍形成に不十分であったが、複数の遺伝子異常を組み合わせることで腫瘍形成を認めた。組織学的には、主に管状腺癌で、p53欠失とCdh1ノックダウンの組合せでは一部に印環細胞を伴う例もあり、多彩な組織像を呈していた。このような結果は、様々な変異を伴う胃がんモデルの作製が実現可能なことを示唆しており、化学発がんモデルの作成にも道を開くものと考えられる。

A．研究目的

食品添加物等の生体における発がん性は従来動物への長期投与により評価されることが標準的だったが、時間と労力を要することや国際的な動物愛護運動の影響もあり、代替法の開発が喫緊の課題となっている。こうした状況に鑑みて、本研究班では大腸や肺などの複数の臓器において遺伝子変異を有するまたはノックダウンを行ったオルガノイドを用いた高感度の発がん性検出法の開発を進めている。これらの臓器はいずれも遺伝子変異の再構成のみでヌードマウス皮下に腫瘍形成が可能であることを確認済みであり、その上で一部の変異を化学物質に置き換えてアッセイを行うことがその研究の基本デザインとなっている。我々は、こうした実験系に利用可能な各臓器の拡大を目指しており、本研究班では特に化学発がん抵抗性として知られる胃がんについてオルガノイド発がんモデルの作成に取り組むこととした。

B．研究方法

（1）マウス胃オルガノイドの培養

マウスにおいては胃の口側半分は扁平上皮であり、ヒトの胃に相当するのは肛門側の腺胃にあたる。十分なマージンをもって腺胃を単離し、物理的な剪断と酵素処理によって上皮腺管を単離し、固化したマトリゲル上に散布する。メディウムは腸管同様、Advanced DMEM/F12にEGF、R-spondin1、Noggin、Y27632等を添加したものをを用いた。マウスとしてはp53のコンディショナルアレルのホモマウス（以下Trp53^{f/f}と表記する）、Krasのコンディショナルアレルのヘテロマウス（Kras^{LSL-G12D/+}）を用いた。

（2）レンチウイルス感染

ベクターとしてはpLK0.1のバックボーンにCreまたはshRNAを組み込んだものを使用した。HEK293FT細胞を用いてウイルスを作成し、濃縮・凍結を行い使用時に解凍した。オルガノイドの感染は完全に単一細胞にまで分散させた上で、マトリゲル上に一晚共培養することで行った。当該遺伝子の組み替えはゲノムPCRで確認し、標的遺伝子のノックダウンはpuromycinによる薬剤選択後にWestern blottingで確

認した。

(3) 造腫瘍の検証

1x10⁵個の細胞をオルガノイドのままマトリゲルと混和してヌードマウス皮下に移植し、8週間程度観察したのちに解剖を行い皮下腫瘍を単離した。半分を組織評価に用い、残りの半分は再びオルガノイド培養を行った。組織評価としては通常H&E染色を中心に一部免疫組織化学による評価を加えた。

(倫理面への配慮)

本研究で行う動物実験の実施にあたり「動物の愛護及び管理に関する法律(昭和48年法律第105号、平成24年最終改正法律第50号)」「実験動物の飼養及び保管並びに苦痛の軽減に関する基準(平成18年環境省告示第88号、平成25年最終改正環境省告示第84号)」及び「厚生労働省の所管する実施機関における動物実験等の実施に関する基本指針(平成18年6月1日厚生労働省通知、平成27年2月20日一部改正)」を遵守した。また、千葉県がんセンター動物実験委員会の承認を得て実験を行った。実際の実験においては、適切な人道的エンドポイントを見極め、屠殺は頸椎脱臼やイソフルラン麻酔下にて腹部大動・静脈からの脱血により行うなど動物の苦痛を軽減するよう細心の注意を払うとともに、使用する動物数を最小限に留めるなど、動物の愛護に十分配慮して行った。また、遺伝子組換え実験については、遺伝子組換え生物等の使用等の規制による生物の多様性の確保に関する法律(平成15年法律第97号)等、遺伝子組換え生物等の第二種使用等に当たって執るべき拡散防止措置等を定める法令に則り、機関承認を得た後に実施した。

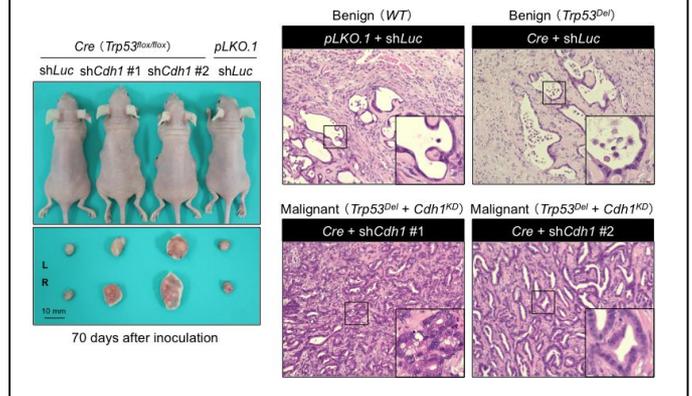
C. 研究結果

(1) Cdh1ノックダウン/p53欠失(図1)

すでにp53とCdh1の二重KOマウスにより胃がんが誘導されることが報告されていることから、同様の結果が得られるかオルガノイドを用いて検討した。まず、これまでの臓器での結果と違い、コントロールベクターを導入したオルガノイドでも常に小さいながら充実性の腫瘍が形成されるのが胃のモデルの特徴としてあげられる。これらの腫瘍は異型に乏しいほぼ正常の腺管で構成され、Ki-67陽性細胞も多数見られた。皮下接種後2ヶ月後にも関わらず増殖を継続する正常細胞の存在は予想外だったが、これらを再び培養したところ、オルガノイドとしては増殖することがなかったため、腫瘍には至っていないと結論づけた。また、Creによるp53のKOでもほぼ同様の結果であり造腫瘍性はないことを確認した。一方、Cdh1のノックダウンをp53KOに追加したところ、腺管の密度が著明に増加し、粘液産生を伴うものを多く認めた。また、一部の症例ではスキルス胃がんの特徴的とされる印環細胞(Signet-ring cell)の出現を認めるなど、in vivoでの生理的な環境下以外でも

同様の変化が誘導されることを確認した。これらの細胞の周囲では確かに細胞接着が低下していたが、基本的には腺癌と分類されるがんが誘導されていた。

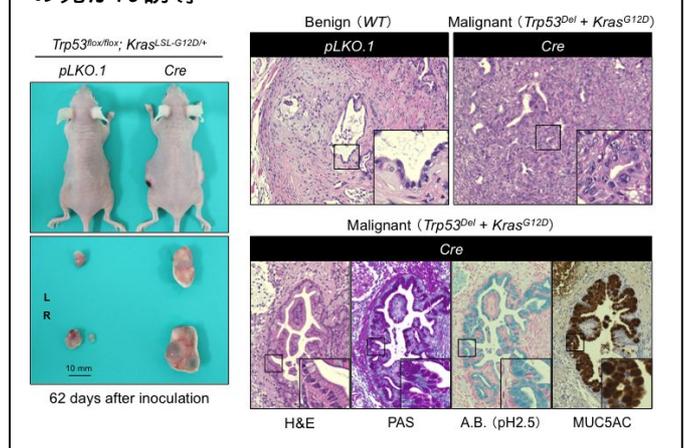
図1 p53KOとCdh1ノックダウンによるオルガノイドからの発がん誘導



(2) Kras活性化変異/p53欠失(図2)

胃がんにおける変異頻度ではp53が約半数で首位だが、Krasも10%程度に認められる。一方、これまでにp53KOとKras変異を胃特異的に再現したマウスは報告されていない。二重または三重変異マウスでの解析や論文化されていない学会発表等からの知見を総合するとp53KOとKras変異を組み合わせても他の臓器とは異なり胃がんが発症しない可能性が高いと推定された。また、このことは化学発がんが胃がん抵抗性であることと関連する可能性もあると考えられた。Kras変異単独では異型の腺管を有する腫瘍は誘導されなかったが、実際に両者の組み合わせをCreの導入によりオルガノイドレベルで検討したところ、分化型の腺癌が誘導され、in vivoとは異なる結果となった。このことから、p53KOとKras変異は協調的に発がんを誘導することが証明された。生体内の胃微小環境において発がん抑制的な要因が存在することが示唆された。

図2 p53KOとKras変異によるオルガノイドからの発がん誘導



D . 研究発表

1. 論文発表

(1) Ochiai M, Yoshihara Y, Maru Y, Tetsuya M, Izumiya M, Imai T, **Hippo Y.** Kras-driven heterotopic tumor development from hepatobiliary organoids. *Carcinogenesis*. doi: 10.1093/carcin/bgz024. [Epub ahead of print] 2019

(2) Maru Y, Onuma K, Ochiai M, Imai T, **Hippo Y.** Shortcuts to intestinal carcinogenesis by genetic engineering in organoid. *Cancer Sci.* 110(3):858-866, 2019

2. 学会発表

(1)丸喜明、**筆宝義隆**:マウス胃オルガノイドへの包括的な遺伝子導入による胃発がん過程の再現、ポスター、第16回がんとハイポキシア研究会(2018年11月千葉)

(2)丸喜明、**筆宝義隆**:マウス胃細胞の3次元培養を用いた胃発がん過程の再現、ポスター、第27回日本

癌病態治療研究会(2018年5月千葉)

(3) Masashi Izumiya, Masako Ochiai, Yasunori Yoshihara, Yoshiaki Maru, Matsuura Tetsuya, Toshio Imai, **Yoshitaka Hippo**: Kras-driven heterotopic tumor development from hepatobiliary organoids、口演、第33回発癌病理研究会(2018年8月御殿場)

(4)泉谷昌志、吉原靖典、丸喜明、落合雅子、松浦哲也、今井俊夫、**筆宝義隆**: 変異遺伝子の in vitro 再構成による胆管細胞発がんの誘導、ポスター、第77回日本癌学会学術総会(2018年9月大阪)

E . 知的財産権の出願・登録状況 (予定を含む。)

1. 特許取得

該当なし。

2. 実用新案登録

該当なし。

3. その他

該当なし