

オルガノイドを用いる発がん性試験の技術整備、動物モデルにおける腫瘍性病変発臓器
における発がん性評価

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の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実は数が少なく、また胃は化学発がんにも比較的抵抗性であることが知られている。そこで、昨年度までに胃がんで変異頻度の高い TP53、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いて腫瘍を作成した。今年度はさらに PIK3CA、APC についても、単独変異または TP53 変異と組み合わせて腫瘍を作成した。得られた腫瘍はいずれも腺癌の組織像を呈したが、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。メディアウムは腸管同様、Advanced DMEM/F12 に EGF, R-spondin1, Noggin, Y27632 (ROCK阻害剤)、CHIR99021 (GSK3阻害剤) 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)、Rosa26-Pik3ca コンディショナル変異アレルのノックインヘテロマウス (R26-Pik3ca^{H1047R})、Apc のコンディショナル truncation ホモ変異マウス (Apc^{580sf/f}) をを用いた。

(2) レンチウイルス感染

ベクターとしては pLKO.1 の骨格に 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) 造腫瘍性の検証

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の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29年最終改正法律第51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、平成29年最終改正法律第41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。

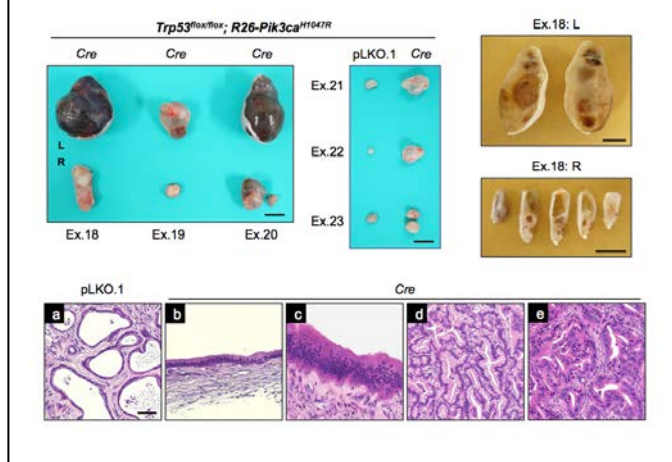
C. 研究結果

(1) Pik3ca活性化変異/p53欠失(図1)

PI3K経路の活性化は胃癌では高頻度で見られることから、p53欠失との発がん協調作用をオルガノイドを用いて検討した。他の遺伝子変異での検討と同様に、陰性対照においても皮下腫瘍を形成し、その組織像は異形を伴わなかった。一方で、Pik3ca変異を誘導したオルガノイドでは腫瘍の大きさは明らかに増大し、その性状は嚢胞主体だが一部固形腫瘍となる皮下腫瘍が形成された。また、一部の腫瘍の中には血性の液体貯留を認めた。実験により、組織像は良性に近いものから悪性まで多彩な像を示すことが特徴だった。腫瘍由来のオルガノイドについてpAKTのレベルをWestern Blotで評価したところ、予想されるように活性化の程度に差が認められ

たことから、Pik3caによるAKT活性化は遺伝学的な要素以外の制御も受けていることが示唆された。

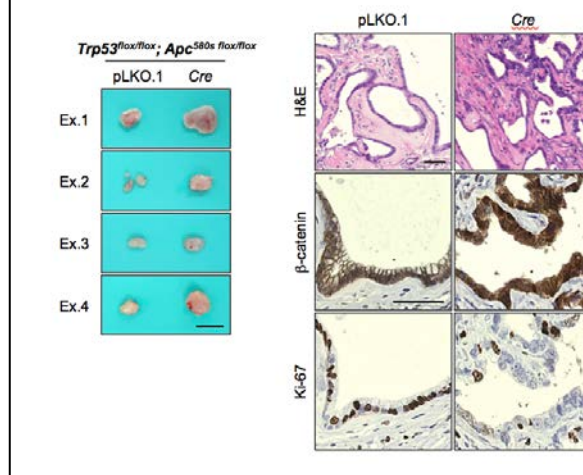
図1 p53KOとPik3ca活性化変異によるオルガノイドからの発がん誘導



(2) Apc欠失/p53欠失(図2)

胃癌における変異頻度ではp53が約半数で首位だが、Apc変異やCTNNB1変異によるWnt経路の活性化も高頻度で見られる。そこで、p53欠失とWnt経路の活性化の発がん協調作用をオルガノイドを用いて検討した。まず、皮下腫瘍の大きさはわずかに増大した程度に留まり、組織像についても軽度の異形にとどまっていると考えられた。ただし、Wnt経路の活性化の指標であるβカテンンの細胞膜から細胞質内及び核内への移行・蓄積自体は観察されたことからWnt経路の活性化とp53欠失の発がん協調作用は、あるとしても強いものとは考えにくかった。代表的な胃癌マウスモデルであるGANマウスにおいても、発がんにはWnt経路の活性化と炎症の協調作用が必要であることから、ex vivoの発がんモデルである本実験系においては炎症シグナルの取り込みは大きくないものと推定された。

図2 p53KOとApc欠失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) Naruse M, Masui R, Ochiai M, Maru Y, Hippo Y, Imai T. An organoid-based carcinogenesis model induced by in vitro chemical treatment. *Carcinogenesis*. in press doi: 10.1093/carcin/bgaa011
- (2) Matsuura T, Maru Y, Izumiya M, Hoshi D, Kato S, Ochiai M, Hori M, Yamamoto S, Tatsuno K, Imai T, Aburatani H, Nakajima A, Hippo Y. Organoid-based *ex vivo* reconstitution of Kras-driven pancreatic ductal carcinogenesis. *Carcinogenesis*. in press doi: 10.1093/carcin/bgz122
- (3) Maru Y, Kawata A, Taguchi A, Ishii Y, Baba S, Mori M, Nagamatsu T, Oda K, Kukimoto I, Osuga Y, Fujii T, Hippo Y. Establishment and molecular phenotyping of organoids from the squamocolumnar junction region of the uterine cervix. *Cancers*. 12(3), 694. doi.org/10.3390/cancers12030694. 2020
- (4) Maru Y, Tanaka N, Ebisawa K, Odaka A, Sugiyama T, Itami M, Hippo Y. Establishment and characterization of patient-derived organoids from a young patient with cervical clear cell carcinoma. *Cancer Sci*. 110 (9); 2992-3005. 2019
- (5) Maru Y, Hippo Y. Current status of patient-derived ovarian cancer models. *Cells*. 8(5). pii: E505. doi: 10.3390/cells8050505. 2019 [Review] 同誌の Editor's Choice に選出
- (6) Maru Y, Tanaka N, Itami M, Hippo Y. Efficient use of patient-derived organoids as a preclinical model for gynecologic tumors. *Gynecol. Oncology*. 154(1): 189-198, 2019 doi: 10.1016/j.ygyno.2019.05.005
- (7) Ochiai M, Yoshihara Y, Maru Y, Matsuura T, Izumiya M, Imai T, Hippo Y. Kras-driven heterotopic tumor development from hepatobiliary organoids. *Carcinogenesis*. 40:1142-1152. 2019
- (8) Maru Y, Onuma K, Ochiai M, Imai T, Hippo Y. Shortcuts to intestinal carcinogenesis by genetic engineering in organoid. *Cancer Sci*. 110: 858-866, 2019 [Review] 同誌の Highlight に選出

2. 学会発表

- (1) 丸喜明、筆宝義隆 (口演) : 患者由来婦人科がん検体からのオルガノイド培養. 第 37 回日本ヒト細胞学会学術集会 2019 年 10 月 (東京)

- (2) 丸喜明、筆宝義隆 (シンポジウム) : オルガノイドを用いた婦人科がんの統合的研究. 第 78 回日本癌学会学術総会 (京都) 2019 年 9 月
- (3) 吉原靖典、丸喜明、筆宝義隆 (英語口演) : マウスオルガノイドを用いた胃発がんモデルの確立. 第 78 回日本癌学会学術総会 (京都) 2019 年 9 月
- (4) 丸喜明、筆宝義隆 (示説) : 患者由来卵巣がんからのオルガノイド培養. 第 61 回日本婦人科腫瘍学会学術講演会 (新潟) 2019 年 7 月
- (5) 丸喜明、筆宝義隆 (示説) : 正常子宮内臓オルガノイドへの遺伝子導入による高転移性がん細胞の直接誘導. 第 28 回日本がん転移学会学術集会・総会 (鹿児島) 2019 年 7 月
- (6) 丸喜明、筆宝義隆 (示説) オルガノイド培養を用いた婦人科腫瘍の統合的研究 第 108 回日本病理学会総会 (東京) 2019 年 5 月
- (7) 筆宝義隆 (シンポジウム) : マウスオルガノイドを用いた臓器横断的 *ex vivo* 発がんモデルの確立. 第 32 回モロシヌス研究会 (千葉) 2019 年 7 月
- (8) 丸喜明 (シンポジウム) : マウスおよび患者由来オルガノイドを用いた婦人科がんの統合的研究. 第 7 回細胞凝集研究会 (那覇) 2019 年 11 月
- (9) 丸喜明、筆宝義隆 (口演) : Establishment of Cell-based Carcinogenesis Models with Genetic Reconstitution of Murine Gastric Organoids. 第 34 回発癌病理研究会 (鳥羽) 2019 年 8 月
- (10) 丸喜明、筆宝義隆 (口演) : オルガノイドを用いた婦人科がんの統合的研究. 第 1 回日本癌学会若手の会 (熱海) 2020 年 2 月

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