

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、がんゲノム解析の急速な進展に伴い多数の遺伝子異常が報告されている。しかし、遺伝子改変マウスの作製などにより実際に発がんへの関与が証明されたものはごく一部であり、検証の迅速化・簡便化が求められていた。3次元オルガノイド培養法の確立により様々な組織の正常細胞の長期培養が可能になったことを受けて、我々はマウスオルガノイドへのレンチウイルス感染により複数遺伝子異常を再構成した上で、ヌードマウス皮下で短期間に腫瘍形成を誘導する実験系を様々な臓器に対して確立してきた。胃がんに関しては、がん関連遺伝子の改変マウスがもともと少ない上に動物化学発がんモデルでも発がん抵抗性を示すことが多いから、新規モデルの確立が長年の課題となっていた。そこで、我々は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多様な悪性度を示す腫瘍を昨年度までに作成した。今年度は本モデルに発がん性物質 MNU および DMBA 投与を組み合わせることで新たにオルガノイド培養に基づく胃化学発がんモデルの確立を試みた。

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る評価が標準的だったが、時間と労力を要することや世界的な3Rの推進の潮流もあり、代替法開発が喫緊の課題となっていた。我々は消化器系および女性生殖器系のマウスオルガノイドを用いて、遺伝子変異の組み合わせにより協調的に発がんを誘導するモデルをこれまでに複数確立してきた。胃は化学物質に対する発がん性が低いこと、遺伝子改変マウスが少ないことが知られていたため、昨年度までに胃オルガノイド発がんモデルを確立し、弱い発がん性を示す遺伝子異常の組み合わせを同定していた。本年度は弱い発がん性を示すオルガノイドに発がん性物質を追加投与することで、癌化誘導が可能か検証を行うこととした。

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した。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) を添加したものを用いた。p53のコンディショナルアレルのホモマウス（以下p53^{f/f} と表記する）、および

Apcのコンディショナルtruncationホモ変異マウス (Apc^{580Sf/f}) との二重変異マウスを用いた。

(2) レンチウイルス感染

ベクターとしてはpLK0.1の骨格にCreおよび shRNAを組み込んだものを使用した。HEK293FT細胞を用いてレンチウイルスを作成し、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単一細胞にまで分散させた上で、マトリゲル上で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 blot解析で確認した。

(3) 化学物質投与

発がん性物質として動物モデルで汎用されるMNUおよびDMBAを遺伝子改変後の胃オルガノイドに投与した。最初に投与後72時間後の用量反応曲線を作成し、IC50を参照しながらコントロール、低濃度、高濃度の3ポイントを両化学物質に対して設定した。次に、これらの濃度で3回にわたり間欠的投与を行った後にヌードマウス皮下に接種して造腫瘍性を検証した。

(4) 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) 胃オルガノイド発がんモデルの確立

マウス胃オルガノイドへの遺伝子導入により、Cdh1に対するshRNAを用いたノックダウン、CreによるKras^{G12D}誘導、Pic3ca^{H1047R}誘導、p53欠失、Apc欠失、Tgfbr2欠失などを単独または組み合わせて導入した後にヌードマウス皮下へ移植したところ、基本的に単一の遺伝子変異で腫瘍形成を認めることはなく、あくまで異型性の低い腺管を少数含む小腫瘍の形成を認めるのみだった。p53欠失にCdh1ノックダウン、Kras^{G12D}誘導、Pic3ca^{H1047R}誘導を組み合わせると腺癌が誘導された(論文投稿中)。

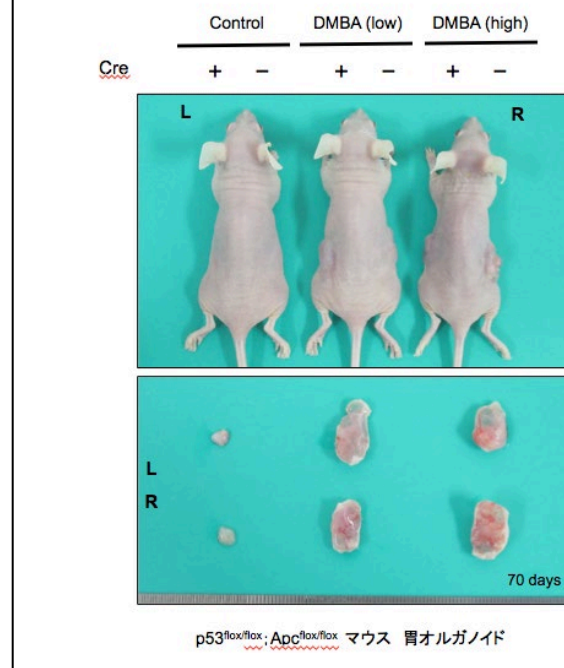
このように、基本的に腺癌またはその前癌状態が認められたが、Kras^{G12D}とTgfbr2欠失の組み合わせにより胃では稀な扁平上皮癌が誘導された。また、他の臓器には見られない胃オルガノイドの特徴として、陰性対照のオルガノイドでもヌードマウス皮下に小腫瘍が認められることが挙げられる。ただし、異型性は全くないため、発がん性の評価には組織像と腫瘍の大きさの両面からの評価が必要と考えられた。

(2) 遺伝子変異オルガノイドへの化学物質投与による発がん誘導

胃がん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

図1 Apc/p53 二重欠損胃オルガノイドに対するDMBA 化学発がん誘導



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カテニ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。

遺伝子変異の再構成のみでは発がんには十分ではないp53欠失およびp53/Apc二重欠失胃オルガノイドに対し、マトリゲル培養環境でMNUおよびDMBAをコントロール、低濃度、高濃度で間欠的に3回暴露した上でヌードマウス皮下に移植した。MNU投与では変化は生じなかったが、DMBAを投与した際にp53/Apc二重欠失でのみ明らかな発がん促進効果を認めた(図1)。

D. 考察

香料などの食由来物質は胃における発がん性の評価法の確立が急務だが、従来の動物モデルでは検出が困難だった。今回胃オルガノイド遺伝学的発がん再構成モデルと組み合わせることで初めて発がん性が評価可能な例を見出したことから、本手法の可能性を検討していくことは意義が大きいと考えられる。現在再現性の確認および症例数の追加を行っている。また、すでに毒性分野の専門家に呼びかけてFrontiers in genetics誌の特集号を企画し、こうした手法の宣伝を開始している。今後陽性例を多く蓄積することで政策提言の根拠としていきたいと考えている。

E. 研究発表

1. 論文発表

- (1) Ebisawa K, Sugiyama T, Itami M, Maru Y, **Hippo Y**, Tanaka N. A case of cervical clear cell carcinoma with serous component. *J Obstet Gynaecol Res*. 2021 doi: 10.1111/jog.14794. Epub ahead of print. PMID: 33870616.
- (2) Kato S*, Fushimi K, Yabuki Y, Maru Y, Hasegawa S, Matsuura T, Kurotaki D, Suzuki A, Kobayashi N, Yoneda M, Higurashi T, Enaka M, Tamura T, **Hippo Y***, Nakajima A. Precision modeling of gall bladder cancer patients in mice based on orthotopic implantation of organoid-derived tumor buds. *Oncogenesis* 10:33. 2021 (* corresponding author) doi: 10.1038/s41389-021-00322-1
- (3) Naruse M, Masui R, Ochiai M, Maru Y, **Hippo Y**, Imai T. An organoid-based carcinogenesis model induced by in vitro chemical treatment. *Carcinogenesis*. 41; 1444-1453. 2020 doi: 10.1093/carcin/bgaa011.
- (4) 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*. 41; 490-501. 2020 (*equal contribution) doi: 10.1093/carcin/bgz122.

2. 学会発表

- (1) 丸喜明、**筆宝義隆** (ポスター) 婦人科がん研究における患者由来オルガノイドの活用、第 24 回日本がん分子標的治療学会 (オンライン) 2020 年 10 月 6-8 日 【ベストポスター賞】
- (2) **筆宝義隆** (招待講演・シンポジウム) オルガノイド培養技術の婦人科がん領域への応用 第 21 回日本再生医療学会総会 (完全オンライン) 2021 年 3 月 11-13 日
- (3) **筆宝義隆**、丸喜明、田中尚武 (International session) 患者由来オルガノイドの婦人科正常組織および腫瘍性病変の研究への利用、第 79 回日本癌学会学術総会 (広島) 2020 年 10 月 1-3 日

- (4) 丸喜明、**筆宝義隆** (口演) オルガノイド発がんモデルが明らかにする子宮内膜の発がんおよび転移促進的な遺伝学的相互作用、第 79 回日本癌学会学術総会 (オンライン) 2020 年 10 月 1-3 日
- (5) **筆宝義隆** (招待講演・シンポジウム) オルガノイドを用いた ex vivo 発がんモデルの確立とがん予防への応用 第 27 回日本がん予防学会総会 (完全オンライン) 2020 年 9 月 15-16 日
- (6) **筆宝義隆** (招待講演) マウスおよび患者由来のがんオルガノイドモデル確立と創薬への応用、日本学術会議シンポジウム (完全オンライン) 「創薬を加速させる革新的な細胞・臓器・個体モデル」、2021 年 1 月 18 日
- (7) **筆宝義隆** (招待講演) (完全オンライン) 3次元オルガノイド培養を用いたがんの本態解明と個別化医療・創薬への応用、(株) 情報機構 細胞培養セミナー (東京) 2020 年 12 月 3 日
- (8) **筆宝義隆** (招待講演) 婦人科領域における患者由来オルガノイド研究の新展開、第 4 回患者由来がんモデル講演会 (完全オンライン) 2020 年 10 月 29-30 日
- (9) 星 大輔、喜多 絵美里、丸 喜明、**筆宝 義隆** (ポスター) ヒト膵腺房細胞癌株の樹立と解析患者由来がんモデル講演会 (オンライン) 2020 年 10 月 29-30 日

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