

令和 2 年 6 月 20 日現在

機関番号：82504

研究種目：若手研究

研究期間：2018～2019

課題番号：18K16823

研究課題名（和文）オルガノイドを用いた卵巣漿液性癌発がん過程の再現

研究課題名（英文）Genetic reconstitution of tumorigenesis of ovarian serous carcinoma using organoid-based approach

研究代表者

丸 喜明（Maru, Yoshiaki）

千葉県がんセンター（研究所）・発がん研究グループ 発がん制御研究部・研究員

研究者番号：30742754

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,300,000円

研究成果の概要（和文）：マウス卵管オルガノイドへレンチウイルスを用いてcDNAおよびshRNAを導入し、ヌードマウス皮下での腫瘍原性を評価した。卵巣高異型度漿液性癌（HGSC）ではTP53変異を90%以上の症例で認めるため、Trp53欠失を軸に検討した。Trp53欠失単独の導入では腫瘍原性は確認されなかったが、さらにHGSCで高頻度に異常を認めるPI3K/RAS経路の異常を再現することで、組織学的に様々な皮下腫瘍が誘導された。一方、低頻度のWNT経路の活性化をApc欠失により再現しても悪性腫瘍は誘導されなかった。以上の結果から、マウス由来正常卵管オルガノイドを用いたex vivo発がんモデルを確立したと結論した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

卵巣がんの発がん機構を解明するため、一般的に利用される遺伝子改変マウスの作製とは異なる方法で発がんモデルの確立を試みた。具体的にはオルガノイド培養法で卵巣がんの起源のひとつである卵管細胞を培養し、遺伝子異常導入後に免疫不全マウスに移植、腫瘍原性の有無を評価した。ヒト卵巣がんを高頻度の遺伝子異常をマウス卵管オルガノイドに再現することで発がんに成功した。本成果により、卵巣がんでは報告されている意義不明な遺伝子異常や他の組織型の遺伝子異常が卵管上皮の発がんに与える影響の検証が可能になる。また、得られた腫瘍を卵巣がんの診断・治療標的探索などに利用することで、橋渡し研究の推進に貢献することが期待される。

研究成果の概要（英文）：We reconstituted genetic aberrations by lentivirally introducing cDNA and shRNA into murine fallopian tube organoids from various genetically engineered mice and investigated tumorigenicity by inoculation of these transduced organoids into dorsal skin of nude mice. Although Trp53 is the most frequently mutated gene in ovarian high-grade serous carcinoma (HGSC), Trp53 deletion alone in fallopian tube organoids was not sufficient for tumorigenesis. Additional induction of the activation of the PI3K/RAS pathways, which is frequently observed in HGSC, led to development of subcutaneous tumors with various histological types. In contrast, concurrent deletion of Apc only resulted in development of cystic lesion, in line with rare activation of the WNT pathway in HGSC. In conclusion, we established ex vivo carcinogenesis models with murine fallopian tube organoids.

研究分野：分子腫瘍学

キーワード：卵巣がん 漿液性癌 オルガノイド 発がん

様式 C-19、F-19-1、Z-19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

(1) HGSC と LGSC は遺伝子変異や起源細胞が異なる全く別の疾患概念である

卵巣がんは最も予後不良な婦人科悪性腫瘍で、その 90%以上が上皮性である。上皮性卵巣がんは主に 4 つの組織型 (漿液性、類内膜、明細胞、類内膜) に分類され、漿液性癌が最も多く 30~40%を占めている。漿液性癌は異型が強い予後不良な高異型度漿液性癌 (high-grade serous carcinoma: HGSC) と分化度が高く予後良好な低異型度漿液性癌 (low-grade serous carcinoma: LGSC) の 2 群に分けられ HGSC が多い。

近年の網羅的なゲノム解析の結果から、HGSC では TP53 変異が 90%以上に認められ、他の遺伝子変異 (BRCA1, BRCA2, RB1, NF1 など) は 10%未満である (TCGA, Nature, 2011)。一方、LGSC では TP53 の変異頻度が非常に低く、KRAS や BRAF 変異を高頻度に認めることが報告されている。起源細胞の点では、卵巣上皮性がんは卵巣表層上皮 (ovarian surface epithelium: OSE) を母体とすると従来信じられてきた。しかし、HGSC の 60%に卵管上皮内癌 (serous tubal intraepithelial carcinoma: STIC) が認められること (Przybycin CG et al, Am J Surg Pathol, 2010)、HGSC と STIC が同じ TP53 変異を有していたこと (Kuhn E et al, J Pathol, 2012) などから、HGSC の多くが卵管上皮由来とする説が近年有力となっている。

(2) 遺伝子改変マウスモデルによる個体レベルでの HGSC の再現には限界がある

漿液性癌の遺伝子改変マウスモデルの多くは OSE を標的としてきた (Garson K, et al, J Ovarian Res., 2012) が、近年では卵管を標的とした HGSC モデルも報告されている (Perets R, et al, Cancer Cell, 2013, Zhai Y, et al, J Pathol., 2017)。ただし、①多数の遺伝子異常の組合せを全て in vivo で検証するには多大な労力や時間を要する、②腫瘍発生に長期間を有する、③必ずしも標的組織や細胞に特異的な遺伝子改変ではない、④細胞レベルでの詳細な解析が困難、などの問題点があった。

2. 研究の目的

本研究では、上述の問題を回避するためにオルガノイド培養を用いた発がんモデルを確立することを目的とする。オルガノイド培養は近年登場した三次元培養技術で様々な正常細胞を生理的な状態のまま半永久的に増殖・維持可能とする手法である。具体的には、マウス卵管オルガノイドを樹立し、HGSC で頻度の高い遺伝子異常やシグナル経路の異常を単独あるいは組み合わせで導入することで、細胞レベルの新規漿液性癌モデルを確立する。

3. 研究の方法

(1) マウス正常卵管オルガノイドの樹立およびその評価

野生型 C57BL/6J マウスおよび Trp53^{flox/flox} マウスを軸とした遺伝子改変マウス (Trp53^{flox/flox}, Trp53^{flox/flox}; Kras^{LSL-G12D/+}, Trp53^{flox/flox}; R26-Pik3ca^{H1047R}, Trp53^{flox/flox}; Apc^{580s flox/flox}) から卵管を実体顕微鏡下で採取し、物理的および酵素的処理後にマトリゲル二層法を用いたオルガノイド培養 (Matrigel bilayer organoid culture: MBOC) を行った。また、樹立した卵管オルガノイドの病理組織学的評価 (H&E 染色および免疫組織化学染色) を行った。

(2) レンチウイルスを用いた in vitro 遺伝子導入による発がん誘導

種々のマウス由来卵管オルガノイドに、レンチウイルスを用いて cDNA やがん抑制遺伝子に対する shRNA を導入し、遺伝子組換えや標的遺伝子の発現抑制を行った。遺伝子組換えや shRNA による標的遺伝子の発現抑制は、ゲノム PCR および Western blotting で確認した。腫瘍原性は、 5×10^5 個程度の細胞をマトリゲルと混和した上でヌードマウス皮下に接種し、約 2 ヶ月後にヌードマウスを解剖して皮下腫瘍形成の有無を評価した。

(3) 誘導された皮下腫瘍の解析

皮下腫瘍を 10%中性緩衝ホルマリンで固定し、H&E 染色や免疫組織化学染色による形態学的解析を行った。また一部の皮下腫瘍を 3 次元で再培養し、形態学的評価、ゲノム PCR、Western blotting およびマイクロアレイ解析を行い、皮下接種前のオルガノイドと皮下腫瘍由来オルガノイドを比較した。

4. 研究成果

(1) マウス卵管細胞のオルガノイド培養

マウス由来卵管細胞を回収し MBOC を行ったところ、多くが球状のオルガノイドを形成して増殖し、安定的に培養可能だった。オルガノイドがどのような細胞で構成されているかを病理組織学的評価で確認したところ、基本的に円柱細胞が内腔を形成するように単層で並びオルガノイドを形成していた。免疫組織化学染色では Cytokeratin 陽性、Vimentin 陰性であり上皮細胞由来であることが示唆され、卵管上皮マーカー陽性、Ki-67 陽性細胞も多数確認された。このことからオルガノイドは卵管上皮細胞で構成され、高い増殖能を有していることが強く示唆された。また、これらの卵管オルガノイドは凍結融解後も安定的に再培養可能であった。

(2) マウス卵管オルガノイドからの Trp53 依存的な発がん誘導

卵管オルガノイドへの Trp53 欠失単独の導入ではヌードマウス皮下において腫瘍原性は確認されなかったが、さらに HGSC で高頻度に異常を認める PI3K/RAS 経路の異常を再現することで、皮下腫瘍を形成し、組織学的に上皮内腺癌、腺癌、癌肉腫が誘導された。癌肉腫については、卵管オルガノイドは上皮細胞で構成されているため、腫瘍を形成する過程で上皮間葉転換 (epithelial mesenchymal transition: EMT) を起こしたことが示唆された。一方、Trp53 欠失に HGSC では頻度の低い WNT 経路の活性化の追加では、嚢胞性病変が誘導され、悪性腫瘍は確認されなかった。このことから、ヒト HGSC で実際に異常を認めるシグナル経路の異常の再現でのみ、Trp53 欠失と協調して卵管上皮の発がんを誘導することが示唆された。オルガノイドのゲノム PCR を行ったところ、皮下接種前では Trp53 コンディショナルアレルの組換えを起こしていない細胞が残存していたが、皮下腫瘍および嚢胞由来オルガノイドでは組換えを起こした Trp53 欠失細胞のみであった。このことから、卵管上皮からの発がんには Trp53 欠失が重要な役割を担っていることが示唆された。また、オルガノイドの遺伝子発現解析を行ったところ、皮下接種前後および遺伝子異常の組み合わせによって遺伝子発現プロファイルが異なることが明らかとなった。

(3) マウス卵管オルガノイドからの Trp53 非依存的な発がん誘導

Trp53 欠失を伴わない発がん誘導として Kras 活性化および Pik3ca 活性化にそれぞれ Cdkn2a 発現抑制、Pten 発現抑制を組み合わせて卵管オルガノイドに導入し、発がん誘導を試みた。いずれも単独の異常ではヌードマウス皮下において腫瘍形成は認められなかったが、Kras 活性化と Cdkn2a 発現抑制を組み合わせることで高率に腫瘍を形成した。この皮下腫瘍は組織学的に肉腫であったが、皮下腫瘍由来オルガノイドのゲノム PCR で Kras コンディショナルアレルの組換えを示す Kras^{G12D} のアンプリコンが確認され、免疫組織化学染色においても一部の肉腫細胞が Cytokeratin 陽性であったため、腫瘍形成の過程で卵管オルガノイドが EMT を起こし肉腫となったことが示唆された。

以上の結果から、マウス由来正常卵管オルガノイドを用いた ex vivo 発がんモデルを確立したと結論した。現在、卵管上皮細胞における Trp53 変異と発がんとの関連を評価するため、変異型 Trp53 コンディショナルノックインマウス関連の卵管オルガノイドを用いた発がん誘導に取り組んでいる。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計8件（うち査読付論文 8件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 4件）

1. 著者名 Maru Yoshiaki, Onuma Kunishige, Ochiai Masako, Imai Toshio, Hippo Yoshitaka	4. 巻 110
2. 論文標題 Shortcuts to intestinal carcinogenesis by genetic engineering in organoids	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Cancer Science	6. 最初と最後の頁 858 ~ 866
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1111/cas.13938	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -
1. 著者名 Ochiai Masako, Yoshihara Yasunori, Maru Yoshiaki, Matsuura Tetsuya, Izumiya Masashi, Imai Toshio, Hippo Yoshitaka	4. 巻 40
2. 論文標題 Kras-driven heterotopic tumor development from hepatobiliary organoids	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Carcinogenesis	6. 最初と最後の頁 1142 ~ 1152
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1093/carcin/bgz024	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -
1. 著者名 Maru Yoshiaki, Tanaka Naotake, Itami Makiko, Hippo Yoshitaka	4. 巻 154
2. 論文標題 Efficient use of patient-derived organoids as a preclinical model for gynecologic tumors	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Gynecologic Oncology	6. 最初と最後の頁 189 ~ 198
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.ygyno.2019.05.005	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -
1. 著者名 Maru Yoshiaki, Hippo Yoshitaka	4. 巻 8
2. 論文標題 Current Status of Patient-Derived Ovarian Cancer Models	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Cells	6. 最初と最後の頁 505 ~ 505
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3390/cells8050505	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -

1. 著者名 Matsuura Tetsuya, Maru Yoshiaki, Izumiya Masashi, Hoshi Daisuke, Kato Shingo, Ochiai Masako, Hori Mika, Yamamoto Shogo, Tatsuno Kenji, Imai Toshio, Aburatani Hiroyuki, Nakajima Atsushi, Hippo Yoshitaka	4. 巻 41
2. 論文標題 Organoid-based ex vivo reconstitution of Kras-driven pancreatic ductal carcinogenesis	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Carcinogenesis	6. 最初と最後の頁 490 ~ 501
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1093/carcin/bgz122	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Maru Yoshiaki, Tanaka Naotake, Ebisawa Keiko, Odaka Akiko, Sugiyama Takahiro, Itami Makiko, Hippo Yoshitaka	4. 巻 110
2. 論文標題 Establishment and characterization of patient derived organoids from a young patient with cervical clear cell carcinoma	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Cancer Science	6. 最初と最後の頁 2992 ~ 3005
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1111/cas.14119	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -

1. 著者名 Naruse Mie, Masui Ryoichi, Ochiai Masako, Maru Yoshiaki, Hippo Yoshitaka, Imai Toshio	4. 巻 -
2. 論文標題 An organoid-based carcinogenesis model induced by in vitro chemical treatment	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Carcinogenesis	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1093/carcin/bgaa011	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Maru Yoshiaki, Kawata Akira, Taguchi Ayumi, Ishii Yoshiyuki, Baba Satoshi, Mori Mayuyo, Nagamatsu Takeshi, Oda Katsutoshi, Kukimoto Iwao, Osuga Yutaka, Fujii Tomoyuki, Hippo Yoshitaka	4. 巻 12
2. 論文標題 Establishment and Molecular Phenotyping of Organoids from the Squamocolumnar Junction Region of the Uterine Cervix	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Cancers	6. 最初と最後の頁 694 ~ 694
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3390/cancers12030694	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -

〔学会発表〕 計14件（うち招待講演 3件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 丸 喜明、筆宝 義隆
2. 発表標題 子宮内膜オルガノイドへのin vitro遺伝子導入による癌肉腫の誘導
3. 学会等名 第22回日本がん分子標的治療学会学術集会
4. 発表年 2018年～2019年

1. 発表者名 丸 喜明、田中 尚武、伊丹 真紀子、筆宝 義隆
2. 発表標題 卵巣腫瘍に対する3次元培養法の最適化
3. 学会等名 第107回日本病理学会総会
4. 発表年 2018年～2019年

1. 発表者名 丸 喜明、筆宝 義隆
2. 発表標題 婦人科腫瘍のオルガノイド培養
3. 学会等名 新しい治療法の開発を目指す患者由来がんモデル講演会
4. 発表年 2018年～2019年

1. 発表者名 丸 喜明、田中 尚武、伊丹 真紀子、筆宝 義隆
2. 発表標題 卵巣腫瘍からの3次元培養法の確立とその臨床応用へ向けた検討
3. 学会等名 第36回日本ヒト細胞学会学術集会（招待講演）
4. 発表年 2018年～2019年

1. 発表者名 丸 喜明、筆宝 義隆
2. 発表標題 マウス卵管由来オルガノイドを用いた高異型度漿液性卵巣癌に対する包括的な疾患モデル作製
3. 学会等名 第77回日本癌学会学術総会
4. 発表年 2018年～2019年

1. 発表者名 丸 喜明、田中 尚武、鈴鹿 清美、伊丹 真紀子、筆宝 義隆
2. 発表標題 卵巣腫瘍からの3次元培養法の確立とその臨床応用の検討
3. 学会等名 第56回日本癌学治療学会学術集会
4. 発表年 2018年～2019年

1. 発表者名 丸 喜明、田中 尚武、伊丹 真紀子
2. 発表標題 患者由来卵巣腫瘍からの3次元初代培養とその臨床応用へ向けた検討
3. 学会等名 第57回日本臨床細胞学会秋期大会
4. 発表年 2018年～2019年

1. 発表者名 丸 喜明、田中 尚武、伊丹 真紀子、筆宝 義隆
2. 発表標題 オルガノイド培養を用いた婦人科腫瘍の統合的研究
3. 学会等名 第108回日本病理学会総会
4. 発表年 2019年～2020年

1. 発表者名 丸 喜明、田中 尚武、小高 亜紀子、伊丹 真紀子、筆宝 義隆
2. 発表標題 細胞診検体からのオルガノイド培養
3. 学会等名 第60回日本臨床細胞学会総会（招待講演）
4. 発表年 2019年～2020年

1. 発表者名 丸 喜明、田中 尚武、伊丹 真紀子、筆宝 義隆
2. 発表標題 患者由来卵巣がんからのオルガノイド培養
3. 学会等名 第61回日本婦人科腫瘍学会学術講演会
4. 発表年 2019年～2020年

1. 発表者名 丸 喜明、筆宝 義隆
2. 発表標題 オルガノイドを用いた婦人科がんの統合的研究
3. 学会等名 第78回日本癌学会学術総会
4. 発表年 2019年～2020年

1. 発表者名 丸 喜明、田中 尚武、伊丹 真紀子、筆宝 義隆
2. 発表標題 患者由来婦人科がん検体からのオルガノイド培養
3. 学会等名 第37回日本ヒト細胞学会学術集会
4. 発表年 2019年～2020年

1. 発表者名 丸 喜明
2. 発表標題 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
3. 学会等名 第7回細胞凝集研究会（招待講演）
4. 発表年 2019年～2020年

1. 発表者名 丸 喜明、筆宝 義隆
2. 発表標題 オルガノイドを用いた婦人科がんの統合的研究
3. 学会等名 第1回日本癌学会若手の会
4. 発表年 2019年～2020年

〔図書〕 計1件

1. 著者名 佐々木 博己編集（丸 喜明、筆宝 義隆分担執筆）	4. 発行年 2019年
2. 出版社 羊土社	5. 総ページ数 294
3. 書名 患者由来がんモデルを用いたがん研究実践ガイド	

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
---------	---------------------------	-----------------------	----