

令和 3 年 5 月 5 日現在

機関番号：17401

研究種目：挑戦的研究(萌芽)

研究期間：2018～2020

課題番号：18K19480

研究課題名(和文) マウス胎仔単離肺上皮器官培養による小細胞肺癌モデルの開発

研究課題名(英文) In vitro mouse small cell lung cancer model using isolated lung epithelium

研究代表者

伊藤 隆明 (ITO, Takaaki)

熊本大学・大学院生命科学研究部(医)・教授

研究者番号：70168392

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,900,000円

研究成果の概要(和文)：私達は、Tp53KO, Rb1KO, およびNotchシグナル不活化によるマウス小細胞肺癌in vivoモデルを確立し、そのマウス胎仔期気道上皮を単離し、Matrigel内に包埋し、器官培養を試み、オルガノイド肺癌モデルの作成を試みた。器官培養下で、おおよそ培養開始から100日頃、増殖性の上皮性変化を認めた。さらに200日以上培養すると、接着性を示す細胞から、浮遊系の細胞まで、様々な腫瘍細胞が、培地内で、増殖した。これら細胞を、免疫不全マウス皮下に投与し、組織像を解析した。これらの組織像は、腺癌、扁平上皮癌などとともに、小細胞肺癌も認められた。

研究成果の学術的意義や社会的意義

私達は、Tp53KO, Rb1KO, Notchシグナル不活化による新たな小細胞肺癌マウスモデルを作成し、さらに、このマウスの胎仔肺上皮から、in vitroでの小細胞肺癌発生モデルの開発にも成功した。このことは、この難治性の腫瘍の発生過程を試験管内で再現でき、この腫瘍の発生過程の研究、また、予防、治療、などへと発展できる研究モデルを開発したことになり、学術的にも社会的にも有意義な成果といえる。

研究成果の概要(英文)：We have established mouse small cell lung cancer (SCLC) model combining Tp53 KO, Rb1KO and inactivation of Notch signaling (Hes1 KO) mice, and isolated epithelia obtained from the mouse SCLC model, and cultured them within Matrigel. After about 100 days of cultivation, epithelial proliferative lesions occurred. After 200 days of cultivation, neoplastic cells grew out of the Matrigel with adhesive or floating pattern. These tumor cells were inoculated in the subcutaneous tissue of the immune-deficient mice, and histological features of the xenotransplanted tumors were examined. Various histological types of lung cancer including squamous cell carcinoma, adenocarcinoma and small cell carcinoma were detected.

研究分野：病理学

キーワード：小細胞肺癌 マウスモデル オルガノイド

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

小細胞肺癌は、高転移性、高薬剤耐性獲得性などを特徴とした、神経内分泌に分化した予後不良待されている(Bunn et al. 2016)。そのためには、小細胞肺癌の発癌の分子機構の解明とともに、この腫瘍の発生、進展にかかわる様々な受容体、シグナル経路、転写因子、epigenetics 機構、heterogeneity 獲得様式の分子機構解析、新規薬剤のスクリーニング、また、発生予防的な研究などが喫緊の課題であり、有用な研究モデルの作成が求められている。このための一つの実験モデルとして、in vitro 発癌モデルが、有意義と考えられる。私達は、小細胞肺癌が、Tp53,Rb1 両遺伝子の変異とともに、Notch シグナルの不活化が重要と考えていて(Ito et al, Transl Cancer Res 2016)、それに相応したモデルマウス(GEMM)の作成を試みている。また、一方で、マウス胎仔肺から末梢上皮を単離し、器官培養系で、肺胞の作成に成功していたので(Seiji et al. Hum Cell 2019)、器官培養系で、オルガノイド小細胞肺癌発生モデルの開発を試みる事が出来た。

2. 研究の目的

私達は、Tp53KO, Rb1KO, Notch シグナル不活化による in vivo 小細胞肺癌 GEMM を開発し、doxycycline 飲水投与 8 週間以内で、神経内分泌癌の作成に成功した(論文作成中)。本研究の目的は、この小細胞肺癌 GEMM 胎仔肺から気道上皮を単離し、オルガノイド小細胞肺癌モデルを作成することにある。この実験系が可能なら、この系を用いて、発癌分子機構の研究、発癌の予防や治療実験への一つの有用な研究ツールになると考えられる。本研究の目的は、小細胞肺癌 GEMM より胎仔肺上皮を単離し、Matrigel に包埋した状態で、長期培養し、肺癌の発生が起こる条件を検討し、小細胞肺癌の in vitro での発生モデルを作成することである。さらに、この実験系に、Cag-Cas9,-EGFP マウスを加えることにより、ゲノム編集可能な in vitro-Cas9 小細胞肺癌 GEMM の作成を試み、今後のこのモデルの発展性を示す。

3. 研究の方法

実験動物：Tp53 wild, (+/-) あるいは(-/-); Club cell secretory protein (CCSP)rtTA; tet0-Cre; floxed Rb1; floxed Hes1 マウスおよび Tp53 wild, (+/-) あるいは(-/-); CCSPrtTA; tet0Cre; floxed Rb1; floxed Hes1; tet0-mutant EGFR マウスを用いた。

胎仔肺の採取と培養：胎齢 12, 13, 16, 18 日の GEMM マウス肺を実体顕微鏡下で、肺を採取した。胎仔肺は、dispase および DNase で処理後、間充織を fine forceps を用いて除去し、気道上皮を単離した。フィルターカップ上に Matrigel を敷き、その上に単離上皮を置き、Matrigel を包埋し、doxycycline を添加し、様々な培地を用いて、培養した(図 1)。

embryonic mouse lung:

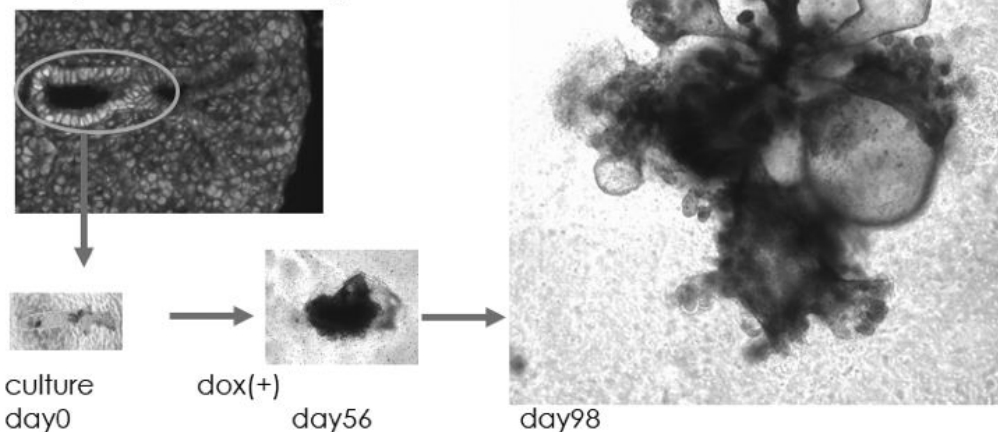


図 1. GEMMマウスを用いたオルガノイド腫瘍発生実験

観察期間：観察は、約 1 年間行った。また、培養終了時には、ホルマリン固定、パラフィン切片を行い、HE 染色を施行した。また、増殖してきた腫瘍細胞は、cell ブロックを作成し、免疫染色(Calcitonin-gene related peptide (CGRP), Acheate scute complex homolog 1 (ASCL1), Insulinoma-associated protein 1(INSM1))を施行した。また、培養細胞化した細胞を、免疫不全マウス(Rg2(-/-); Jak3(-/-)マウス)に移植し、皮下に形成された腫瘍をホルマリン固定し、組織学的に検討した。

ゲノム編集化マウス：Tp53 (-/-); CCSPrtTA; tet0-Cre; floxed Rb1; floxed Hes1; Cag-Cas9,-EGFP マウスより、胎齢 16 日の胎仔気道上皮を単離し、同様に、オルガノイド肺癌発生を試みた。

4. 研究成果

胎仔肺は、単離気道上皮の採取しやすさと、器官培養後の結果より、胎齢 16 日を用いた。また、Tp53 遺伝子は、野生型およびヘテロ(+/-)では、観察期間中には、腫瘍形成は見られず、腫瘍の

発生のためには、Tp53(-/-)であることが必要であることがわかった。Tp53(-/-)では、培養後約 100 日で、胎仔肺は増殖性変化を示し、Matrigel 内に上皮から成る分葉状、分芽状、管状、嚢胞状病変が出現した(図 1)。その後、培養を継続していくと、Matrigel 外へと培地中に増殖する腫瘍細胞が出現した。これらは、Filter cup 上に接着性に増殖する細胞が多かったが、浮遊状な形態も見られた。8 種類の腫瘍細胞を採取し、これらを免疫不全マウスに移植したところ、腺癌、扁平上皮癌など様々な組織型が出現した。また、小細胞肺癌の出現も見られ、これらは CGRP, ASCL1, INSM1 陽性像を示した(図 2)。さらに、ゲノム編集化マウスからも、腫瘍細胞の出現を認め、現在、mCherry 標識ガイド RNA を投与して、この実験系の有用性を検討している。

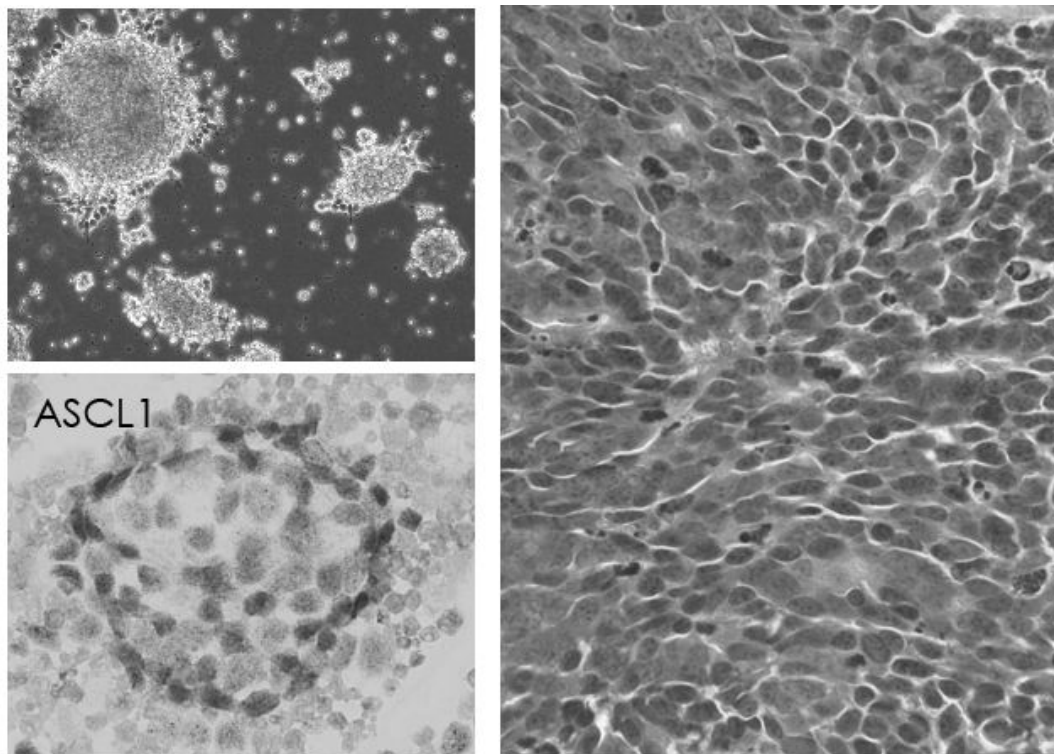


図 2. GEMMマウス由来のin vitro腫瘍細胞。腫瘍細胞はASCL1(+)
免疫不全マウス移植腫瘍は小細胞癌を呈する(右図)

以上、研究期間内に、目的とした小細胞肺癌のオルガノイド発癌モデルの作成に成功することが出来た。今後、このモデルを用いて、ゲノム編集を始め、治療薬などの影響などを検討していく予定である。また、詳細な発現プロファイルの検索はまだ行っていないが、遺伝型が同一であるにもかかわらず、多くの腫瘍組織型が、必ずしも小細胞癌で無かった点が、小細胞肺癌の発生を考える上で、今後の興味ある課題と考えている。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計5件（うち査読付論文 4件／うち国際共著 0件／うちオープンアクセス 2件）

1. 著者名 Tenjin Y, Kudoh S, Yamada T, Matsuo A, Sato Y, Ichimura T, Kohroggi H, Sakagami T, Ito T	4. 巻 99
2. 論文標題 Achaete-scute complex-induced Wnt11 regulates neuroendocrine differentiation, proliferation and E-CADHERIN expression in small cell lung cancer and Wnt11 regulates small-cell lung cancer biology.	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Laboratory Investigation	6. 最初と最後の頁 1622-1635
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1038/s41374-019-0277-y	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 Kudoh S, Tenjin Y, Kameyama H, Ichimura T, Yamada T, Matsuo A, Kudo N, Sato Y, Ito T	4. 巻 153
2. 論文標題 Significance of Achaete-Scute Complex Homologue 1 (ASCL1) in pulmonary neuroendocrine carcinomas; RNA sequence analyses using small cell lung cancer cells and Ascl1-induced pulmonary neuroendocrine carcinoma cells.	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Histochemistry and Cell Biology	6. 最初と最後の頁 443-456
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1007/s00418-020-01863-z	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 Seiji Y, Ito T, Nakamura Y, Nakaishi-Fukuchi Y, Matsuo A, Sato N, Nogawa H	4. 巻 32
2. 論文標題 Alveolus-like organoid from isolated tip epithelium of embryonic mouse lung.	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Human Cell	6. 最初と最後の頁 103-113
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1007/s13577-019-00236-6	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 Tenjin Yuki, Matsuura Kumi, Kudoh Shinji, Usuki Shingo, Yamada Tatsuya, Matsuo Akira, Sato Younosuke, Saito Haruki, Fujino Kosuke, Wakimoto Joeji, Ichimura Takaya, Kohrogi Hirotsugu, Sakagami Takuro, Niwa Hitoshi, Ito Takaaki	4. 巻 100
2. 論文標題 Distinct transcriptional programs of SOX2 in different types of small cell lung cancers	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Laboratory Investigation	6. 最初と最後の頁 1575 ~ 1588
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1038/s41374-020-00479-0	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 Sato Younosuke, Okamoto Isamu, Kameyama Hiroki, Kudoh Shinji, Saito Haruki, Sanada Mune, Kudo Noritaka, Wakimoto Joeji, Fujino Kosuke, Ikematsu Yuki, Tanaka Kentaro, Nishikawa Ayako, Sakaguchi Ryo, Ito Takaaki	4. 巻 10
2. 論文標題 Integrated Immunohistochemical Study on Small-Cell Carcinoma of the Lung Focusing on Transcription and Co-Transcription Factors	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Diagnostics	6. 最初と最後の頁 949 ~ 949
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3390/diagnostics10110949	査読の有無 無
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 -

〔学会発表〕 計1件 (うち招待講演 1件/うち国際学会 0件)

1. 発表者名 伊藤隆明
2. 発表標題 小細胞肺癌の分子病理学：神経内分泌分化機構からの展開
3. 学会等名 第110日本病理学会総会 (招待講演)
4. 発表年 2021年

〔図書〕 計0件

〔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
---------	---------------------------	-----------------------	----

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8 . 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------