

令和 4 年 6 月 6 日現在

機関番号：15301

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2019～2021

課題番号：19K06457

研究課題名(和文)オルガノイドと人工多能性幹細胞由来の肝胆膵がん幹細胞動物モデルの作製と創薬研究

研究課題名(英文)Preparation of and drug discovery studies by hepatobiliary pancreatic cancer stem cell models derived from organoid and induced pluripotent stem cells

研究代表者

岩崎 良章 (Iwasaki, Yoshiaki)

岡山大学・保健管理センター・教授

研究者番号：00314667

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)：マウス人工多能性幹細胞から胚体内胚葉を経て肝・胆管前駆細胞及び膵前駆細胞へと分化誘導し各段階の細胞についてがん幹細胞モデルを作製する手法を用いてがん化誘導した。また、各分化段階のオルガノイドを作製し同様にがん化誘導した。これらの細胞及びオルガノイドをマウスの皮下及び肝に移植して腫瘍を形成させた。オルガノイド及び腫瘍形成の効率は未分化な細胞で効率が良かったが、腫瘍形成効率はなお低く、分化及びがん化誘導条件の更なる検討を要した。一方、マウス肝・胆管系前駆細胞のオルガノイドを癌化誘導してマウスの肝臓に移植したが、安定的な腫瘍形成には各段階における条件の改善が必要である。

研究成果の学術的意義や社会的意義

遺伝的に明確かつ均一ながん幹細胞モデルの作成は、がんの生物学的な解析などの基礎的な研究に重要であり、その解析成果による臨床応用も期待される。さらに、がん幹細胞動物モデルの作成は、診断及び創薬などの臨床応用に直結する可能性を秘めている。本研究ではこれらががん幹細胞およびそのオルガノイドモデルの作成からがん幹細胞動物モデルの作成を試みたものであり、その過程に影響を及ぼす種々の要因が明らかになった。これらの要因の更なる究明によるより効率的ながん幹細胞モデルの作成が今後期待される。

研究成果の概要(英文)：We induced differentiation of mouse induced pluripotent stem cells into liver and bile duct progenitors and pancreatic progenitors via embryonic endoderm, and induced tumorigenesis of cells at each stage using a method to generate cancer stem cell models. Organoids at each stage of differentiation were also generated and induced to become cancerous in the same manner. These cells and organoids were transplanted subcutaneously and into the liver of mice to form masses. The efficiency of organoid and tumor formation was higher in undifferentiated cells, but the efficiency of tumor formation was still low, requiring further investigation of conditions for induction of differentiation and tumorigenesis. On the other hand, organoids of mouse liver and bile duct progenitor cells were induced to become cancerous and transplanted into mouse liver, but the conditions at each step need to be improved for stable tumor formation.

研究分野：腫瘍生物学

キーワード：肝胆膵がん がん幹細胞 オルガノイド 人工多能性幹細胞

## 1. 研究開始当初の背景

(1) 消化器がんは本邦のがん死亡の大半を占めており、社会的にも問題となっている。多発例や転移・再発をきたしたがん症例では局所制御が困難であり、薬物療法や放射線療法が中心となるが、しばしば治療抵抗性を示し再発は必至である。これらががん治療への抵抗性や再発・転移にはがん幹細胞が深く関わっている。しかしながら腫瘍組織におけるがん幹細胞の頻度は低い上に、それらががん幹細胞を分離・維持して解析に供することは困難であった。

(2) われわれは、多能性幹細胞をがんの微小環境に曝露してがん幹細胞へと誘導できることを見出し、がん幹細胞モデルを世界で初めて作製した(特許第 6161828 号、特願 2015-85851)。続いて、本法と多能性幹細胞の分化誘導技術を用いて、それまで樹立が困難で報告のなかった肝がん幹細胞モデルおよび動物モデル作製の可能性を示した。

(3) しかしながら、多能性幹細胞からの分化誘導効率、幹細胞モデルの安定的維持、動物モデル作製における移植効率において解決すべき問題が見出されていた。

## 2. 研究の目的

オルガノイド作製技術の応用により、幹細胞から分化誘導した前駆細胞の安定維持、移植効率の向上を図るとともに、人工多能性幹細胞よりがん幹細胞モデルを樹立するがん幹細胞モデル作製技術を組み合わせることにより、臨床検体由来のオルガノイドにおけるゲノム多様性などの様々な問題を回避し、肝胆膵がんを含む内胚葉系の分化系統的かつ組織的ながん幹細胞モデルをより効率的に作製することにより、その基礎的・生物学的解析と新規のがん治療法開発への応用を目的とした。

## 3. 研究の方法

(1) 人工多能性幹細胞から内胚葉系へと分化誘導した後に肝胆膵系細胞へと分化させる。また、人工多能性幹細胞から直接肝細胞様細胞への分化を誘導し、肝前駆細胞、肝細胞様細胞の段階の細胞を作製する。各分化段階の細胞を用いてオルガノイドを作製するとともにがん化誘導して肝胆膵がん幹細胞オルガノイドモデルを作製する。

(2) 作製されたがん幹細胞オルガノイドをマウスの皮下及に移植して腫瘍を形成させ、肝胆膵がん幹細胞動物モデルを作製する。この形成された腫瘍の初代培養細胞から再度オルガノイドを作製する。これを再びマウスにオルガノイドを移植して腫瘍を形成させる。

(3) マウス肝から肝・胆管前駆細胞を分離してオルガノイドを作製し、培養・維持する。これをがん化誘導してマウス肝に移植してマウス肝腫瘍モデルを作製する。

(4) 株化肝癌細胞培養系から胚様体を作製し、マトリゲルと各種培地を用いて 3 次元培養することによりオルガノイドを作製し株間での性状を比較検討する。

## 4. 研究成果

(1) マウス人工多能性幹細胞に増殖因子及びシグナル伝達阻害剤を用いて胚体内胚葉を誘導した。続いて胚体内胚葉から肝・胆管前駆細胞及び膵前駆細胞へと分化誘導した。また、マウス人工多能性幹細胞から直接肝細胞様細胞への分化を誘導し、肝前駆細胞、肝細胞様細胞の段階の細胞を得た。各種分化段階の細胞について人工多能性幹細胞からがん幹細胞モデルを作製する手法(特許第 6161828 号、特願 2015-85851)を用いてがん化誘導して肝胆膵がん幹細胞モデルを作製した。

各分化段階の細胞を用いてオルガノイドを作製し、同様にがん化誘導した。各分化段階に応じてオルガノイドの形成効率に違いが見られ、未分化な細胞において効率が良い傾向であった。さらに、癌化の誘導効率は培養上清の由来するがん細胞株(PLC/PRF/5, HepG2, Huh-7)による相違がみられた。また、人工多能性幹細胞あるいは胚体内胚葉からの分化誘導中と誘導後の分化した細胞ではがん化の誘導効率が異なり、誘導中の方が良好であった。

(2) 作製されたがん幹細胞モデル及びオルガノイドをマウスの皮下に移植して、腫瘍を形成させた。腫瘍形成についても分化段階ごとに効率が異なり、未分化な細胞の方が効率は良い傾向にあり、さらに、2次元培養細胞よりオルガノイドの方が腫瘍形成効率は良好であった。しかしながら、マウス皮下における腫瘍形成は不安定であった。

これらのことは、分化誘導時に含まれる各種因子とがん化誘導に用いられるがん細胞株培養上清の性質、さらにはそれらの混合比率に依存するものと考えられ、腫瘍形成効率の向上のための至適条件の設定が必要と考えられた。

(3) マウス肝由来のモデルとして、C57BL/6 マウスの肝より肝・胆管前駆細胞分離し、オルガノイドを作製した。この C57BL/6 マウス由来の肝・胆管系前駆細胞オルガノイドを、肝がん細胞株の培養上清を用いて同様にがん化誘導した。マウス肝・胆管系前駆細胞オルガノイドの維持および

びがん化誘導後の培養は安定していた。しかしながら、がん化誘導および未誘導のオルガノイドを C57BL/6NJc1 マウスの肝臓に移植して腫瘍形成を試みたが、安定的な腫瘍の形成には各段階における培養等の条件の更なる改善が必要である。

(4) 肝がん幹細胞由来モデルのアプローチとして、株化肝癌細胞培養系から非接着及び無血清培地の条件下に胚様体を作製し、マトリゲルと各種培地により 3 次元培養を行うことによりオルガノイドを作製した。各種株化細胞培養系 (PLC/PRF/5, HepG2, Huh-7, HLE, HUH-6) について培養条件を検討してオルガノイド作製を試みたが、株化細胞によりオルガノイドの形態、増殖能は相違を示した。また、オルガノイド形成効率は株化細胞間で大きく異なるとともに、安定してオルガノイド形成を得るには更なる条件の改善が必要である。

## 5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計6件（うち査読付論文 6件/うち国際共著 4件/うちオープンアクセス 5件）

1. 著者名 Afify SM, Sanchez Calle A, Hassan G, Kumon K, Nawara HM, Zahra MH, Mansour HM, Khayrani AC, Alam MJ, Du J, Seno A, Iwasaki Y, Seno M	4. 巻 122
2. 論文標題 A novel model of liver cancer stem cells developed from induced pluripotent stem cells	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Br J Cancer	6. 最初と最後の頁 1378-1390
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1038/s41416-020-0792-z. Epub 2020 Mar 17	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 該当する
1. 著者名 Afify SM, Hassan G, Osman A, Calle AS, Nawara HM, Zahra MH, El-Ghliban S, Mansour H, Alam MJ, Abu Quora HA, Du J, Seno A, Iwasaki Y, Seno M.	4. 巻 6
2. 論文標題 Metastasis of Cancer Stem Cells Developed in the Microenvironment of Hepatocellular Carcinoma	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Bioengineering	6. 最初と最後の頁 73
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.3390/bioengineering6030073	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 該当する
1. 著者名 Afify SM, Chen L, Yan T, Calle AS, Nair N, Murakami C, Zahra MH, Okada N, Iwasaki Y, Seno A, Seno M.	4. 巻 2
2. 論文標題 Method to Convert Stem Cells Into Cancer Stem Cells	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Methods Protoc	6. 最初と最後の頁 71
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.3390/mps2030071.	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 該当する
1. 著者名 Seno A, Murakami C, El-Aarag B, Iwasaki Y, Ohara T, Seno M.	4. 巻 18
2. 論文標題 Cancer Stem Cell Induction From Mouse Embryonic Stem Cells	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Oncol Lett	6. 最初と最後の頁 2756-2762
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.3892/ol.2019.10614	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 該当する

〔学会発表〕 計0件

〔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
研究分担者	笠井 智成  (Kasai Tomonari)  (30530191)	岡山大学・中性子医療研究センター・准教授    (15301)	

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
---------	---------