

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 6 月 15 日現在

機関番号：82606

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2015～2016

課題番号：15K15074

研究課題名(和文)異種動物のin vivo環境を利用してヒト臓器を再構成する

研究課題名(英文)Reconstitution of human organs as Xenografts by using in vivo environment of animals

研究代表者

清野 透(Kiyono, Tohru)

国立研究開発法人国立がん研究センター・研究所・分野長

研究者番号：10186356

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,800,000円

研究成果の概要(和文)：ヒト正常膵管上皮細胞、胆管上皮細胞、胆嚢上皮細胞、肝実質細胞、肺胞上皮細胞、胃粘膜上皮細胞を単離培養後、HPV16 E6E7, MYC, RASの4遺伝子(EMR)をtetOffシステムを用いて導入する事でEMRの発現に依存して容易に培養可能な細胞株を得た。肝実質細胞を除いてEMRの発現に依存して1ヶ月以内にヌードマウス皮下移植により腫瘍を形成し、その後Doxを投与すると数日以内に退縮を開始した。腫瘍は病理学的に未分化腺がんを呈し、退縮後の組織にはいずれも、単層円柱上皮からなる腺管構造や腺管内粘液貯留など由来するヒトの臓器に類似する腺管構造を再現させることができた

研究成果の概要(英文)：Normal human epithelial cells from pancreas, bile duct, gall bladder, liver, alveoli, stomach were isolated and transduced with HPV16 E6E7, MYC and mutant RAS (EMR) which were regulated by tetOff system so that we obtained easily maintained stable cell lines. These cells except for liver cells formed tumors when transplanted subcutaneously in nude mice depending on EMR expression and the tumors started shrinking within a few days after doxycyclin administration. All the tumors pathologically showed undifferentiated adenocarcinoma. After the regression, remaining tissues showed simple columnar epithelia sometimes filled with mucin which histologically resemble glands of original organs. Thus we have succeeded to reconstruct human tissues resembling original organs in nude mice.

研究分野：ウイルス腫瘍学

キーワード：不死化 ヒト幹細胞 再生医療

## 1. 研究開始当初の背景

特に自己細胞由来の人工組織・器官を移植する再生医療は、臓器移植で問題となるドナー不足に加え組織適合性の不一致を克服できる革新的な医療として期待されている。目的となる組織に特異的な体性幹細胞が比較的容易に得られ、体外培養法と分化制御技術がほぼ確立されている皮膚・角膜・骨(軟骨)・造血系などを対象とした再生医療は実用化段階に進展している。

しかしながら、神経・膵臓・胆道・腸・肺といった多様な分化系列を含み複雑な高次構造をとる組織・臓器に対しては、組織特異的幹細胞の単離・培養を始め分化制御系が確立されておらず、未解明の基礎的課題が山積している。

申請者らは異なる複数のヒト正常上皮細胞の単離・不死化培養に成功しており、各種 *in vitro* 多段階発がんモデルを樹立してきた (Cancer Sci 2007, Cancer Res 2008, Carcinogenesis 2009, Am J Cancer Res 2011, Carcinogenesis 2012)。これまでの結果から、各種ヒト正常上皮細胞の不死化およびがん化には細胞種により特異性があることを明らかにする一方で、E6,E7 に c-MYC、活性型 RAS の 4 遺伝子 (EMR) が複数のヒト正常上皮細胞に共通してがん化ドライバーとなることを実験的に確認している。最近、ヒト正常膵管上皮細胞においてコンディショナルに上記 4 遺伝子 (cEMR) を発現制御できる細胞を樹立しマウス皮下に移植したところ、4 遺伝子の発現に依存して腫瘍が形成され、発現をシャットオフすることで腫瘍の完全退縮が認められた。腫瘍退縮後の組織を解析したところ、ヒト細胞に由来する単層円柱上皮からなる膵管様管腔組織が構築されることを見出した。この膵管様管腔を構成する細胞は正常膵管特異的な分化マーカーを発現していること、また一部の細胞は分泌顆粒を有する杯細胞様の分泌細胞の形態を示すことから、多分化能のある膵管幹細胞から再構成されたことが示唆される。

## 2. 研究の目的

本研究は異種動物の体内環境を利用して、ヒト由来の正常上皮細胞から機能的

な高次組織を再構築する系の開発を行う。これまでの研究成果を基に、研究期間内に以下のことを明らかにする。

a) ヒト正常膵管上皮細胞の他に、胆管上皮細胞・胆嚢上皮細胞・大腸上皮細胞・肺胞上皮細胞を単離し、cEMR 遺伝子を導入後 *in vitro* で安定して培養が可能か、また遺伝子発現をシャットオフした際に分化能が保持されているか、正常染色体を維持しているかを明らかにする。

b) 樹立した細胞をマウス体内(皮下、腎被膜下、同所性)に移植し、EMR 遺伝子を発現誘導した後シャットオフすることで、それぞれの正常組織に対応した組織構造が形成されるか調べる。

## 3. 研究の方法

本研究では、マウス体内ニッチを利用して種々のヒト初代上皮細胞から高次組織を再構築する系を樹立するため、以下の研究項目を計画している。特に多様な分化系列を含み複雑な高次構造をとる組織を対象とし、膵管上皮細胞・胆管上皮細胞・胆嚢上皮細胞・大腸上皮細胞・肺胞上皮細胞、乳腺上皮細胞、前立腺上皮細胞を用いて研究を進めた。

種々のヒト初代上皮細胞の *in vitro* 安定培養およびゲノム安定性の確認  
F-medium に Wnt3A, RSp01 のコンディションメディウムと ROCK 阻害剤 Y-27632 を添加した培地を基本とし、手術で得られた正常組織より上皮細胞または市販のを分離した。各上皮細胞は安定に増殖し継代も可能であった。これらの細胞に、E6,E7 に c-MYC、活性型 RAS の 4 遺伝子 (EMR) を tetOff システムを用い、レンチウイルスベクターにより導入した。DOX+/-における 4 因子の発現の ON/OFF を確認する。

マウス体内移植後の一時的腫瘍形成と腫瘍退縮後の組織形成能の検討  
上記細胞をヌードマウス皮下にマトリゲルと混ぜて接種し、腫瘍が 200 mm<sup>3</sup> 程度になるまで観察を続け、その後飲水にドキシサイクリンを添加させることにより 4 因子の発現を止め、腫瘍を退縮させる。

*in vivo* で再構築されたヒト組織の性状解析  
腫瘍退縮後の残組織を取り出し、その組

織像を解析する。

#### 4. 研究成果

ヒト正常膵管上皮細胞の他に、胆管上皮細胞、胆嚢上皮細胞、肺胞上皮細胞、胃粘膜上皮細胞、肝実質細胞、子宮内膜上皮、大腸上皮、卵巣表層上皮を単離し安定培養後、HPV16 E6E7, MYC, RAS の4遺伝子(EMR)を tetOff システムを用いて導入することにより invitro で活発に増殖し容易に培養可能な細胞株を得ることができた。また Doxycyclin(Dox)添加により遺伝子発現をシャットオフできることを Western blot により確認した。

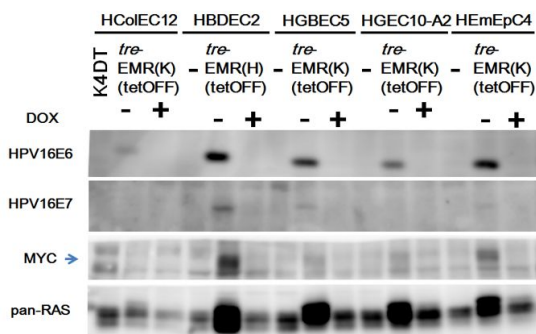


図1: 左から大腸上皮細胞(HCoIEC12), 胆管上皮細胞(HBDEC2), 胆のう上皮細胞(HGBEC5), 胃粘膜上皮細胞(HGEC10-A2), 子宮内膜上皮細胞(HEmEpC4)の結果を示す。

これらの細胞は Dox 添加により細胞増殖が遅くなり遺伝子導入前と同様の形態に戻った。これらの細胞をヌードマウス皮下に移植すると、胆管上皮細胞、胆嚢上皮細胞、肺胞上皮細胞、胃粘膜上皮細胞、卵巣表層上皮は EMR の発現に依存して1ヶ月以内に腫瘍を形成した。一方肝実質細胞についてはヌードマウス皮下、腎皮膜下とも移植を試みたが、今のところ腫瘍形成は観察されていない。腫瘍形成後のヌードマウスに Dox を投与するといずれの腫瘍も数日以内に退縮を開始した。できた腫瘍と退縮後の組織像を HE 染色にて評価した。胆管上皮細胞、胆嚢上皮細胞、胃粘膜上皮細胞から形成した腫瘍はいずれも腺管構造を一部残し腺がんと診断できるものの病理学的には未分化腺がんと診断されるべきものであった。退縮後の組織にはいずれも単層円柱上皮からなる腺管構造を示し、胆管、胆のう、胃粘膜、卵巣表層上皮とそれぞれの由来を思わせる構造や腺管内粘液貯留などを示した。

肺胞上皮細胞由来の腫瘍は腺管構造をほとんど認めず、未分化腺がんの像を呈した。腫瘍退縮後の組織は単層円柱上皮からなる腺管構造が多数認められ、一部は Club 細胞への分化を思わせる細胞も認め

られた。以上の結果より、ほぼ当初の計画通りコンディショナルにがん幹細胞と正常上皮細胞を Dox によりシャットできる細胞を樹立し、ヌードマウス皮下で由来するヒトの臓器に類似する腺管構造を再現させることができた。

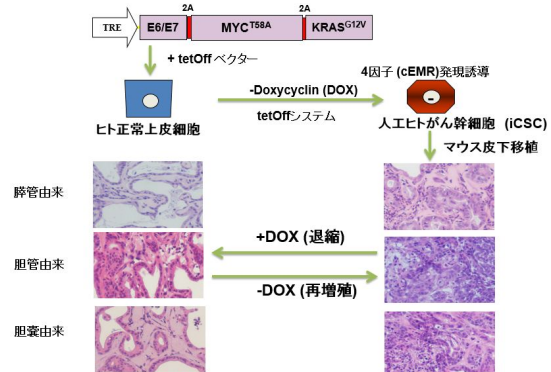


図2. 上から膵管上皮細胞、胆管上皮細胞、胆のう上皮細胞の結果を示す。

#### 5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

〔雑誌論文〕(計0件)

〔学会発表〕(計1件)

A novel primary culture condition for modeling human ovarian cancer  
Farhana Ishrat Ghani, Takashi Yugawa, Tomomi Nakahara, Reiko Watanabe, Hiroshi Yoshida, Masayuki Yoshida, Mitsuya Ishikawa, Tomoyasu Kato and Tohru Kiyono  
第75回 日本癌学会学術総会(横浜) 2016年10月8日。

〔図書〕(計0件)

〔産業財産権〕

出願状況(計1件)

名称: 肝細胞培養用培地組成物  
発明者: 清野 透、赤平 莉菜、稲村 充  
権利者: 国立研究開発法人国立がん研究センター、株式会社リプロセル  
種類: 特許  
番号: 特願 2015-241080  
出願年月日: 2015/12/10

取得状況(計0件)

名称:  
発明者:  
権利者:  
種類:  
番号:  
取得年月日:

国内外の別：

〔その他〕  
ホームページ等

<http://www.nccri.ncc.go.jp/s003/>

6．研究組織

(1)研究代表者

清野透 (KIYONO, Tohru)

国立がん研究センター・研究所・分野

長

研究者番号：10186356

(2)研究分担者 なし

( )

研究者番号：

(3)連携研究者

( )

研究者番号：

(4)研究協力者

温川恭至 (Yugawa, Takashi)

中原知美 (Tomomi Nakahara)