

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 6 月 9 日現在

機関番号：12601

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2015～2016

課題番号：15K18400

研究課題名(和文) マウス胃初代培養系を用いたびまん性胃癌発癌モデル

研究課題名(英文) Modeling for gastric carcinogenesis using normal gastric organoids

研究代表者

垣内 美和子 (Kakiuchi, Miwako)

東京大学・先端科学技術研究センター・特任研究員

研究者番号：40750790

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,200,000円

研究成果の概要(和文)：胃癌における遺伝子変異プロファイルは明らかになってきたものの、その変異遺伝子の癌における役割はまだ解明が不十分であり、治療標的として有用な遺伝子の速やかな同定が望まれている。そこで、癌関連遺伝子の機能解析のために、マウスの正常な胃細胞を生体外で培養することに成功した(オルガノイド培養)。さらに作成したオルガノイドにおいて、遺伝子の発現制御を行うことで、正常な胃をもとにした発癌モデルを確立することができた。

研究成果の概要(英文)：Comprehensive genomic profiling of gastric cancer reveals various mutations and gene expression pattern in each cancer and several new genetic alterations for potentially therapeutic targets. It is important that we have to distinguish “driver mutations” from “passenger mutations” and combinations of genetic variation which contribute to carcinogenesis. We have succeeded in 3D culture, so called “organoid”, of normal gastric epithelial cells from a mouse pyloric-stomach. We could overexpress or silence the genes of interest using lentiviral vector on the organoids and assess for the functions and carcinogenesis by transplanting to nude mice.

研究分野：胃癌

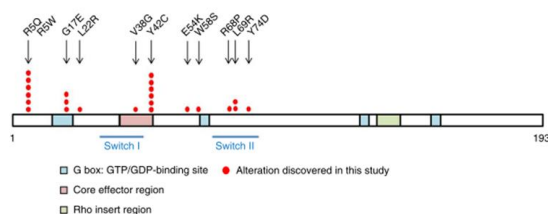
キーワード：胃癌 発癌モデル

1. 研究開始当初の背景

(1) 胃癌の発癌メカニズム・分子標的治療

胃癌は、全体の 30-50%を占めるびまん性胃癌(Diffuse-type gastric cancer, DGC)と、その他通常型 (腸型: Intestinal-type gastric cancer, IGC) という組織型によって 2 つのサブグループ(Lauren 分類)に大きく分けられる。特に DGC は IGC と比較して非常に進行が早く、手術可能な病期で発見されたとしても手術後の 5 年生存率が 10-20%と予後不良である。治療としては手術に加えて化学療法が施行されるが、分子標的治療としては HER2 陽性胃癌に対する Trastuzumab が使用可能であるが、DGC では HER2 陽性率は 10%程度でしかない。

これまでにびまん性胃癌の癌関連遺伝子として、E-Cadherin(CDH1 遺伝子)の変異およびプロモーター領域の高メチル化による機能喪失が報告されてきた。しかし、すべての DGC においてこの変化が認められるものではなく、新たな治療標的を見出すためにはゲノムプロファイルを明らかにする必要があった。そこで、我々は DGC の全エクソーム解析、ターゲット遺伝子変異解析を行い、既知の TP53 遺伝子、CDH1 遺伝子変異等に加え、新たに RHOA 遺伝子変異を同定した (図 1)。このように網羅的ゲノム解析を通じて、癌における遺伝子変異が明らかになるものの、それらが機能的なドライバー変異であるか、非機能的なパッセンジャー変異であるかを同定することが、治療標的として有用であるかを判断するにあたり、重要となってくる。



【図 1】DGC における RHOA 遺伝子変異

(2) マウス正常組織の初代培養

従来、癌関連遺伝子の機能解析には癌細胞株や不死化した細胞株が用いられてきた。しかし、癌細胞株にはすでに多くの遺伝子変異があり、着目したい遺伝子の機能だけを純粋に評価するのは難しく、また不死化した細胞株では組織固有のエピジェネティックな特徴を持っているため、調べたい組織由来でないものでは異なる反応を示す可能性がある。そこで、着目したい組織の正常細胞を生体外で培養し、着目する遺伝子の機能解析に用いることが望ましい。

比較的最近まで、正常細胞の培養は困難であるとされてきたが、3 次元培養という方法を用いて、組織幹細胞を培養することにより可能になってきている。それらは、生体外で

も分化能を有し、本来の組織と同様な反応を示すことが明らかとなっている。それら 3 次元培養により形成された細胞群はオルガノイド(organoid)と呼ばれ、組織分化や遺伝子の機能解析に用いられるようになってきた。

2. 研究の目的

我々は、胃癌の中でも予後の悪いサブグループであるびまん性胃癌のゲノム解析によって、RHOA 遺伝子の機能獲得性変異を 25%の症例に同定したが、RHOA 遺伝子変異の胃癌発癌への関与および既知の胃癌関連遺伝子との関連については未だ不明である。正常組織由来初代培養系は正常細胞からの分化誘導、癌化モデルとして、胃癌のドライバー変異候補遺伝子の機能検証においてその有用性が期待される。そこで、マウス正常胃粘膜組織からの胃癌発癌モデルを確立し、網羅的ゲノム解析から同定された変異遺伝子の機能解析を行い、シグナル経路を同定することを目的としている。

3. 研究の方法

(1) マウス胃オルガノイド作成

5-8 週齢マウスから後胃を採取し、コラゲナーゼ・ディスパーゼ処理により細胞を分離した。細胞懸濁液を EGF、R-spondin1 等を添加した培養液とともに、マトリゲル上で培養した。翌日、上清を取り除き再度マトリゲルで覆うことで、3 次元培養とした。5~7 日ごとに継代を行った。

(2) レンチウイルスベクターによる遺伝子発現制御

びまん性胃癌で認められる遺伝子変異を参考に、正常 RHOA 遺伝子および RHOA 遺伝子変異(G17E、Y42C)を発現するベクター、Cdh1 遺伝子・Trp53 遺伝子を shRNA でノックダウンするベクターを作成した。

作成したレンチウイルスを、胃オルガノイドの継代時に添加し、感染させた。薬剤選抜を行い、感染した細胞のみを純化した。

(3) ノードマウス移植による腫瘍形成能の評価

上記で作成したレンチウイルス感染マウス胃オルガノイドを、免疫不全マウス(ヌードマウス)皮下に移植した。

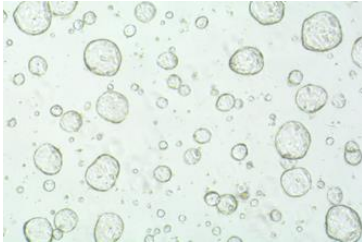
腫瘍形成が認められた場合には、腫瘍の組織学的評価、発現解析から特異的なシグナル伝達経路の同定を行うこととした。

4. 研究成果

(1) 胃オルガノイドの作成

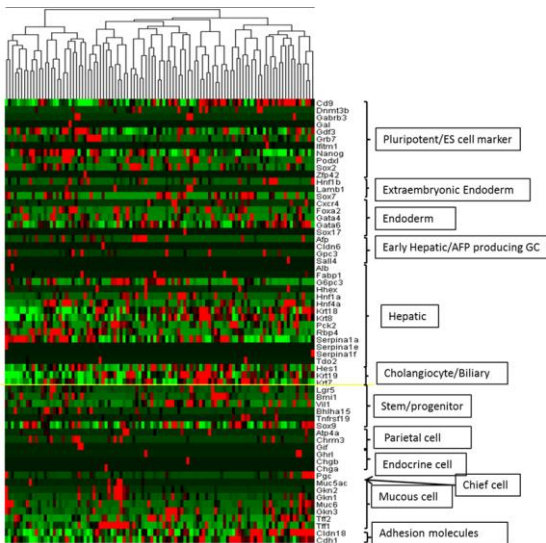
①マウスの正常な胃(後胃)より採取した上皮細胞から、生体外で持続的に培養可能な胃オルガノイドの作成に成功した(図 2)。

胃オルガノイドは、単層の細胞からなる球体で、球の外側が基底膜側となる細胞極性を持っていた。



[図 2] 胃オルガノイド

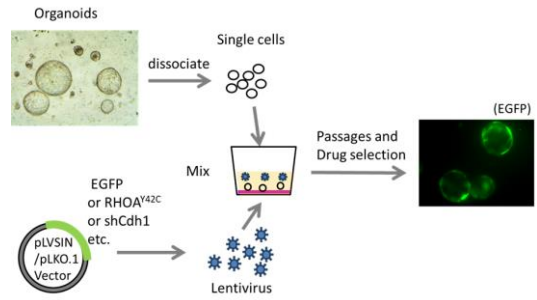
②胃オルガノイドを構成する細胞のプロファイルを調べるため、single cell RNA sequence を行った。その結果、各細胞は均一な発現パターンを持つことはなく、一部の細胞では分化した胃粘膜上皮で見られる遺伝子の発現も認められた。すなわち、オルガノイドの中でも、分化傾向を維持していると考えられた。(図 3)



[図 3] 胃および肝分化マーカー発現

(2) レンチウイルスベクターによる遺伝子発現制御

まず、レンチウイルスがオルガノイドに感染するかどうか、EGFP(蛍光タンパク)を発現するベクターを感染させたところ、オルガノイドにおいてEGFPの発現が確認できた(図4)。



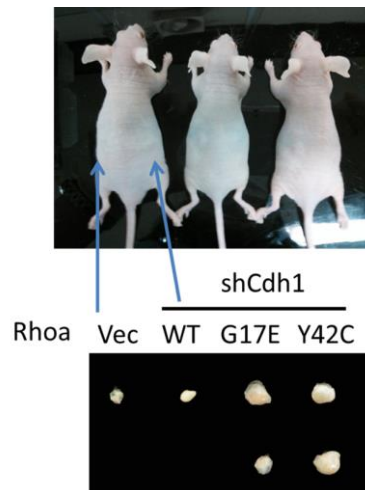
[図 4] オルガノイドへのレンチウイルス感染

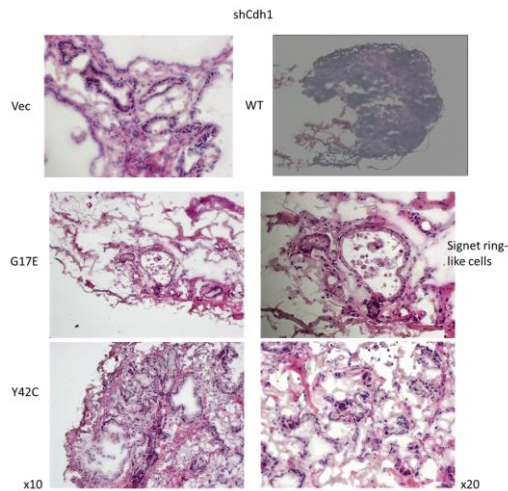
そこで、RHOA 遺伝子 (V5 タグ付) の発現、Cdh1 遺伝子、Trp53 遺伝子のノックダウンを行ったところ、mRNA およびタンパクレベルでの発現制御ができていることを確認できた。しかし、その際、Cdh1 遺伝子のノックダウン効率は 40%程度と、完全ではないことが明らかとなった。おそらく、効率の高い細胞はオルガノイドとしても形態を取れなくなる可能性が高く、結果としてオルガノイドとして維持される細胞では E-cadherin の発現が完全には抑制されないと考えられる。

(3) ノードマウス移植による腫瘍形成能の評価

変異 RHOA 遺伝子 (G17E, Y42C) と、Cdh1 遺伝子、Trp53 遺伝子のノックダウンを組み合わせ発現制御した胃オルガノイドを、ノードマウスの皮下に移植した。8 週間後、皮下腫瘍を採取した。

その結果、いずれの組み合わせでも、顕著な腫瘍形成は認められなかった。しかし、変異 RHOA 遺伝子発現と Cdh1 遺伝子のノックダウンの組み合わせでは、組織学上に印環細胞様 (signet ring-like) の細胞からなる腺管構造が認められた。In vitro での遺伝子発現操作により、in vivo での組織形成に変化が認められたことから、遺伝子機能解析の手段として有用であると示唆された。(図 5)





[図 5] Rhoa (変異) 遺伝子と Cdh1 遺伝子のノックダウンによる、胃オルガノイドからの腫瘍形成能

今回は、明らかな癌化は認めなかったが、今後も種々の任意の遺伝子を組み合わせることが可能であるこの系は、遺伝子機能解析に非常に有用である。さらに、発癌過程を模倣することが可能となれば、それに対して阻害剤の効果判定にも用いることができ、より臨床に即した応用も可能となる。

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)

① 垣内 美和子、「マウス正常胃由来のオルガノイドを用いた胃発がんモデル」、第 75 回日本癌学会学術総会、2016 年 10 月 7 日、パシフィコ横浜 (神奈川県)

6. 研究組織

(1) 研究代表者

垣内 美和子 (KAKIUCHI, Miwako)

東京大学・先端科学技術研究センター・特任研究員

研究者番号：40750790

(4) 研究協力者

筆宝 義隆 (HIPPO, Yoshitaka)