

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成30年 6月25日現在

機関番号：82504

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2016～2017

課題番号：16K19380

研究課題名(和文) マウス初代培養細胞を用いた新規未分化型胃癌発がんモデルの確立

研究課題名(英文) Development of organoid-based carcinogenesis model of diffuse-type gastric cancer using murine primary gastric cells

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) 3,000,000円

研究成果の概要(和文)：マウス由来正常胃オルガノイドの継代成功率は当初低かったが、培地組成を変えることで安定的に培養可能となった。そこで、この培養条件で培養した胃オルガノイドにレンチウイルスを用いて遺伝子を導入し、発がん誘導を行った。具体的には、胃癌で変異頻度の高いTP53, CDH1, KRASに注目し、コンディショナルマウス由来の胃オルガノイドに、Cre遺伝子あるいはshRNAを導入してこれらの遺伝子異常を再現し、ヌードマウス皮下での腫瘍原性を評価した。特定の遺伝子異常の組み合わせにより組織学的に異なる腫瘍が誘導され、胃オルガノイドへのin vitro遺伝子導入で発がん誘導が可能であることを初めて示した。

研究成果の概要(英文)：While long-term culture of primary gastric organoids with serum-free media was difficult at first, we were finally able to conduct long-term culture by optimization of medium composition. We then conducted lentiviral gene transduction into these gastric organoids and inoculated transduced organoids into dorsal skin of nude mice to examine tumorigenicity of frequently mutated genes in human gastric cancer (TP53, CDH1 and KRAS). Specifically, we cultured gastric cells isolated from conditional knockout and knock-in mice for Trp53 and mutant Kras, respectively, and transduced gastric organoids with Cre-recombinase to induce Trp53 deletion and/or Kras activation. Furthermore, we induced Cdh1 suppression by shRNA. Reconstitution of certain combinations of genetic alterations induced histologically different tumors. In conclusion, we here demonstrated that gastric organoids can be transformed by in vitro gene transduction.

研究分野：分子腫瘍学

キーワード：胃癌 オルガノイド マウス

### 1. 研究開始当初の背景

(1) 未分化型 (びまん性) 胃癌は今後増加する難治がんである

胃癌は、組織学的には約 2/3 が分化型で約 1/3 が未分化型に分類される。分化型胃癌は現在でも予後が比較的良好であり、Wnt 経路活性化と TGF-β 経路不活性化により 100% の浸透率で胃癌を発症する Gan マウス (Oshima et al, Gastroenterology, 2006) などのマウスモデルも確立されるなど多方面で研究が進んでいる。ただし、その発症にピロリ菌の慢性感染が深く関与しており、今後除菌が普及することで患者数の減少が予想される。一方、未分化型胃癌はピロリ菌の関与は低いと想定され、浸潤性の強いスキルスがんなど内視鏡的に早期発見が困難な症例も多い。また既存の治療にも抵抗性のものが多く予後不良なため、革新的な診断・治療法の開発が喫緊の課題となっている。

(2) 未分化型 (びまん性) 胃癌の発症には不明な点が多い

これまでの研究から家族性未分化型胃癌で E-cadherin (CDH1) の生殖系列変異が高頻度に存在することが明らかにされ、弧発例でも E-cadherin の機能的失活の重要性が示唆されている。マウスモデルとしては、Cdh1 と Trp53 の胃特異的なダブルノックアウトマウスがあり (Shimada et al, Gut, 2011)、これまで唯一の報告となっている。ただし、このモデルでは未分化型胃癌の浸透率が 100% だが発症までに約 1 年と長期間を要する。そのため、他の遺伝子異常が協動的に働くことが強く示唆されるが、その実体は不明のままである。

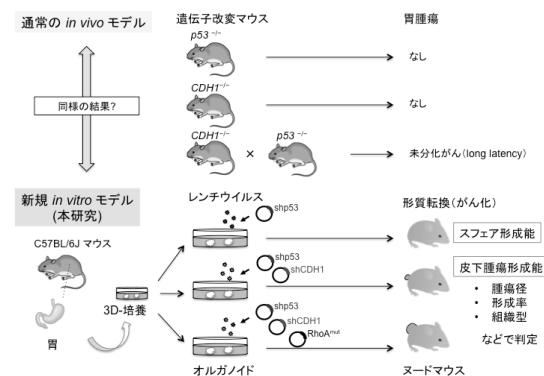
(3) 疾患モデルの必要性

多数のがん関連候補遺伝子や新規融合遺伝子の発がんへの関与を検証するためは、多くの疾患モデルが必要であるが、少ないのが現状である。その理由のひとつとして、これらの検証には、臓器特異的な遺伝子改変マウスを作成して個体レベルで発がん性を証明する手法が標準的だが、多大な労力と時間が必要であることが挙げられる。そのため、簡便かつ短期間で評価可能な疾患モデルが求められる。一方、申請者らはマウス正常腸管細胞を 3 次元で培養し、遺伝子導入を行うことで、オルガノイドレベルの大腸発がんモデルを開発した実績を有し、疾患モデルの短期間かつ簡便な作製に道を開いた (Onuma et al., PNAS, 2013)。

### 2. 研究の目的

本研究では、同様の手法をマウス由来正常胃細胞に適用し、オルガノイドレベルでの未分化型胃癌発がんモデルを確立し、未分化型胃癌の発がん分子機構解明に資する知見を取得することを目的とする (図 1)。

図 1 マウス胃初代培養を用いた *in vitro* 発がん再構成



### 3. 研究の方法

(1) マウス正常胃細胞の 3 次元マトリゲル培養法の最適化

野生型 C57BL/6J マウスおよび Trp53<sup>fllox/fllox</sup>、Kras<sup>LSL-G12D/+</sup> マウスから腺上皮で構成されている腺胃部のみを採取し、物理的および酵素処理後、3 次元マトリゲル培養を行った。培地の組成は腸管の時と同様の組成で行ったが、継代成功率が低かったため、培地の組成を検討した。

(2) *in vitro* 遺伝子導入による発がん誘導

培養した胃オルガノイドに、レンチウイルスを用いて Cre 遺伝子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 で評価した。腫瘍原性は、 $5 \times 10^5$  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

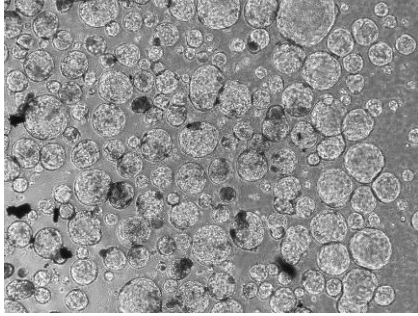
皮下腫瘍をホルマリンで固定し、H&E 染色や免疫組織化学染色による形態学的解析を行った。また一部の皮下腫瘍を 3 次元で再培養し、形態学的評価、ヌードマウス皮下への再移植、ゲノム PCR および Western blotting を行い、皮下接種前のオルガノイドと皮下腫瘍由来オルガノイドの比較を行った。

### 4. 研究成果

(1) 安定的なマウス正常胃細胞の 3 次元マトリゲル培養

マウス由来正常胃細胞を腸管と同様の培地組成で 3 次元マトリゲル培養を行ったところ、継代成功率は 20% 程度であったが、培地の組成を変えることで安定的に継代・維持が可能となった (~100%) (図 2)。研究室内の申請者以外の技術員が、同様の培養条件で胃細胞の培養を行っても、安定的に培養可能であったことから、手技的なレベルに無関係に培養可能となる適切な培養条件である可能性が高い。

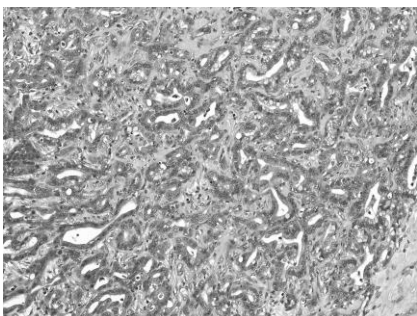
図2 マウス由来正常胃オルガノイド



(2) 胃オルガノイドの Trp53 欠失および Cdh1 発現抑制による発がん誘導

近年の胃がんのゲノム解析から、未分化型(びまん性)では TP53 および CDH1 の遺伝子異常を高頻度に認めることや Trp53, Cdh1 の遺伝子改変マウスによる未分化がんの発症も報告されている。そこで、同様の遺伝子異常を胃オルガノイドに再現することで発がん誘導が可能か検討した。当初は Cdh1 と Trp53 の shRNA による発現抑制により発がん誘導を行う計画であった。しかしながら、shTrp53 の抑制効率が低いことが比較的高頻度に確認された。そのため、新規に Trp53 のコンディショナルノックアウトマウスを導入し、Cre 遺伝子の cDNA 導入による Trp53 のノックアウトを試みた。ゲノム DNA の PCR により組換えが確認されたことから、以後 Trp53 のコンディショナルノックアウトマウスを用いることとした。Trp53 欠失単独および Cdh1 発現抑制単独では腫瘍形成に至らなかったが、両方の異常を組み合わせることで、ヌードマウス皮下で腫瘍形成を認めた。組織学的には腺管形成を認める腺癌主体で、一部にびまん性増殖を認めた(図3)。さらに、1度目の皮下腫瘍を再培養し、ヌードマウス皮下へ再移植するとより短期間で大きな腫瘍を形成し、びまん性増殖を示す腫瘍成分の増加および一部の症例で印環細胞様の腫瘍細胞を認めた。このことから、本モデルはびまん性胃がんの発がん過程を模倣している可能性がある。また、印環細胞の出現には上皮細胞と遺伝子異常 (Trp53, Cdh1) だけでなく、微小環境が影響していることが示唆された。

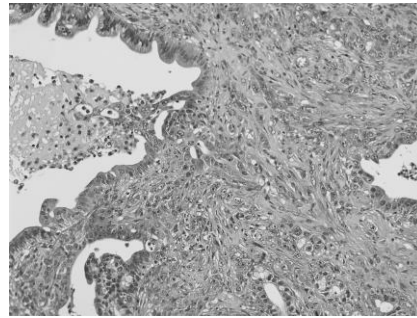
図3 Trp53 欠失および Cdh1 発現抑制で誘導された皮下腫瘍



(3) 胃オルガノイドの Trp53 欠失および Kras 活性化による発がん誘導

分化型(腸型)胃がんでは TP53 および Kras の遺伝子異常を高頻度に認めることが報告されている。Trp53 欠失と Kras 活性化を組み合わせた場合においても、ヌードマウス皮下で充実性腫瘍を形成し、Cdh1 を組み合わせた場合に比べて腫瘍が大きく、組織学的には高~低分化腺癌で多彩な組織像を呈していたが、印環細胞様の変化は認められなかった(図4)。さらに、誘導された皮下腫瘍由来オルガノイドをヌードマウス皮下に再移植したところ、組織学的に悪性度の増加を認めたが、再移植においても印環細胞様の変化は認められなかった。このことから、(2)とは異なる経路による発がん過程が再現されていることが示唆された。

図4 Trp53 欠失および Kras 活性化で誘導された皮下腫瘍



以上のように、マウス由来正常胃オルガノイドへの in vitro 遺伝子導入で、胃以外の環境においても発がん誘導が可能なことを示した。現在、本モデルの妥当性を検証するため、誘導された皮下腫瘍の詳細な解析を進めている。

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2件)

- (1) Noguchi R, Yamaguchi K, Ikenoue T, Terakado Y, Ohta Y, Yamashita N, Kainuma O, Yokoi S, Maru Y, Nagase H, Furukawa Y. Genetic alterations in Japanese extrahepatic biliary tract cancer. *Oncol Lett.*, 14(1): 877-884. 2017
- (2) Maru Y, Tanaka N, Ohira M, Itami M, Hippo Y, Nagase H. Identification of novel mutations in Japanese ovarian clear cell carcinoma patients using optimized targeted NGS for clinical diagnosis. *Gynecol Oncol.*, 144(2): 377-383. 2017

〔学会発表〕（計 6 件）

- (1) 丸喜明、田中尚武、伊丹真紀子、筆宝義隆. 卵巣腫瘍からの3次元培養法の確立に向けた取り組み. 第35回日本ヒト細部学会学術集会（鹿児島）. 2017年10月
- (2) 丸喜明、筆宝義隆. Organoid-based endometrial tumorigenesis by in vitro genetic manipulation. 第76回日本癌学会学術総会（横浜）. 2017年9月
- (3) 丸喜明、筆宝義隆. オルガノイドを用いた婦人科がん発がんモデルの開発. 先端モデル動物支援プラットフォーム平成29年度若手技術支援技術講習会（長野）. 2017年9月
- (4) 丸喜明、筆宝義隆. マウスオルガノイドを用いた子宮内膜がん過程の再現. 第32回発癌病理研究会（滋賀）. 2017年8月
- (5) 丸喜明、田中尚武、筆宝義隆. オルガノイド培養を用いた卵巣がん発がんモデルの開発. 第106回日本病理学会総会（東京）2017年4月
- (6) 丸喜明、松浦哲也、落合雅子、筆宝義隆. 3次元培養を用いたがん研究の展開－基礎研究から臨床応用に向けて－. 第25回日本癌病態治療研究会（千葉）2016年6月

〔図書〕（計 0 件）

〔産業財産権〕

○出願状況（計 0 件）

名称：  
発明者：  
権利者：  
種類：  
番号：  
出願年月日：  
国内外の別：

○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

6. 研究組織

(1) 研究代表者

丸 喜明 (MARU, Yoshiaki)

千葉県癌センター研究所・発がん制御研究部・研究員

研究者番号：30742754

(2) 研究分担者

( )

研究者番号：

(3) 連携研究者

松浦 哲也 (MATSUURA, Tetsuya)

横浜市立大学附属病院・消化器内科

研究者番号：10784845

(4) 研究協力者

( )