

令和 6 年 5 月 15 日現在

機関番号：82504

研究種目：基盤研究(C)（一般）

研究期間：2021～2023

課題番号：21K08019

研究課題名（和文）オルガノイドを用いた胃発がんモデルの確立と発がん機構の解明

研究課題名（英文）Organoid-based modeling of gastric carcinogenesis and elucidation of its mechanism

研究代表者

筆宝 義隆（Hippo, Yoshitaka）

千葉県がんセンター（研究所）・研究所・研究所長

研究者番号：30359632

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）：ヒト胃がんで高頻度な遺伝子異常をマウス腺胃由来正常オルガノイドに組み合わせて再現し、多様な組織像の腫瘍を作成した。同一の遺伝子異常でも腫瘍の多様性および腫瘍内不均一性が高いこと、活性型Kras変異が単独では培養中に排除されることを明らかにした。免疫不全マウス皮下における間質との相互作用が惹起するエピジェネティックな変化、およびクローン選択が重要であることを確認した。化学物質と遺伝子異常による発がんの協調作用について腫瘍原性の低いオルガノイドへの投与により充実性の腺がんが誘導される遺伝毒性物質を見出した。びまん型胃がんの特徴である印環細胞も誘導するなど、遺伝子改変マウスの結果を一部再現した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

遺伝子改変マウスを作成しなくても、同等の胃発がんがオルガノイドを用いた皮下移植モデルによりかなりの程度迅速に再現可能であることを示した。ただし、腫瘍の多様性および腫瘍内不均一性が高いことから、上皮と遺伝子変異に加えて間質との局所的な相互作用の重要性が示唆された。化学発がんモデルも確立できたことから、化学発がんに抵抗性とされる胃がんの新規モデルとしての有用性が期待される。

研究成果の概要（英文）：Tumors with diverse histology were generated by reconstituting genetic abnormalities that are frequently found in human gastric cancer in normal murine gastric organoids. We found high inter-tumor diversity and intratumor heterogeneity even with the same genetic aberrations, and that active Kras mutations alone are eliminated in culture. Epigenetic changes induced by stromal interactions in subcutaneous immunocompromised mice and the importance of clonal selection were confirmed. Genotoxic substances were found to induce enhanced adenocarcinoma when administered to organoids with low tumorigenicity. The results were partially replicated in genetically engineered mice, including the induction of signet-ring cells, a characteristic feature of diffuse-type gastric carcinoma.

研究分野：分子腫瘍学

キーワード：胃がん オルガノイド 発がん

1. 研究開始当初の背景

主にピロリ菌感染を背景として発症する胃がんは、世界のがん死亡原因の3番目を占めるなど人類に対する健康上の重大な脅威となっている。ゲノム解析の進展により胃がんで高頻度の遺伝子異常やシグナル経路異常の解明が進んだ。また、胃発がんには多数の遺伝・環境要因、それらの相互作用等が複雑に関与するが、発がん機構の全貌は未解明である。その原因として、対応する異常を個体レベルで再現する遺伝子改変マウス(GEM)による疾患モデルの作成が追いついていないことが挙げられる。そのため、発症機構の解明や前臨床モデルの確立には依然として多くの課題が残されている。一方、申請者はマウス正常オルガノイドへの遺伝子導入と免疫不全マウス皮下への接種を組み合わせ、迅速かつ簡便な「ex vivo 発がんモデル」を複数の臓器に対して構築してきた。そこで、本研究ではこの手法をマウス胃細胞に適用すると同時に、さらに発展させることで多様な遺伝子異常の発がん性検証や化学発がんモデルの確立を目指すこととした。

2. 研究の目的

「ex vivo 発がんモデル」により最小限の要素で胃発がん過程の再構成を試みることを通して、その発症機構の解明を行うことを本研究の目的とした。すなわち、マウスオルガノイドを用いた再構成実験系を利用することで、(1)胃発がんにおいて最も本質的な要素や要素間の協調作用は何か、(2)どこまで病態が再現可能か、の二点を問うこととする。

3. 研究の方法

(1)ex vivo 発がんモデルとして以下の手法で腫瘍を誘導する。すなわち、マウス腺胃より単離した正常オルガノイドに対し、ヒト胃がんで頻度の高い遺伝子異常を組み合わせ再現実後ヌードマウス皮下で腫瘍原性を確認する。遺伝子導入にはレンチウイルスベクターを用いて shRNA, cDNA, Cre (conditional GEM に対して) を組み合わせ導入する。組み替えはゲノム PCR および Western Blotting で確認を行う。

(2) ゲノム解析により胃がんで変異頻度が高い遺伝子として TP53 (50%), ARID1A (14%), PIK3CA (12%), CDH1 (11%), SMAD4 (8%), APC (7%), RHOA (6%), KRAS (6%) などが同定された(TCGA, Nature, 2014)。その結果、形態学に基づく従来の腸型・びまん型の2分類に代わり、OMICS 解析により明らかにされた遺伝子変異や活性化シグナル経路の情報を元に、(1)びまん性増殖と CDH1 および RHOA 変異を示すゲノム安定型(GS型)、(2) TP53 変異と RTK-RAS 経路の活性化および腸型分化を示す染色体不安定型(CIN型)、(3) PIK3CA 変異と CDKN2A 発現抑制を伴う EB ウイルス陽性型 (EBV型)、(4) MLH1 変異と高変異表現型を示すマイクロサテライト不安定型(MSI型)、などに細分化した分類が新たに提唱されている。基本的にこれらの遺伝子異常を組み合わせサブタイプごとに再現するものとする。また、すでに他臓器オルガノイドにおいて同一遺伝子異常を導入した際の発がん性と比較することで、臓器固有のエピジェネティックな状態が発がん機構に与える影響も解析する。

4. 研究成果

4-1. サブタイプごとの再現

(a) びまん型・GS型

p53 欠失または Cdh 1 発現抑制は単独では発がん性を示さないが、組み合わせ (C5) により腺癌が誘導された (100%)。CDH1 変異陽性びまん型胃がんの特徴である印環細胞を一部の腫瘍に認め

るなど、GEMの結果を一部再現したが、基本的に腺管優位の腸型であり、びまん型の誘導には胃微小環境が重要であり、皮下組織では完全に代償できないことが示唆された。びまん性胃がんで高発現の IHH (Fukaya et al, Gastroenterology, 2006) を C5 オルガノイドに導入することでびまん性増殖がどこまで再現可能か現在検証を継続している。

(b) 腸型・CIN 型

Kras^{G12D} 変異単独を発現する細胞は膵臓オルガノイドと同様に培養中に排除されたが、p53 欠失と組み合わせる (K5) ことで腺癌が誘導された (100%)。一方、胃特異的 K5 マウスに Cdh1 ヘテロ K0 を交配しても 20%の胃発がん率 (Till et al, Cancer Res, 217) に留まり、過去に報告もないことから K5 マウスの胃発がん性は *in vivo* では極めて低い可能性が高いと考えられた。Apc と p53 の二重欠失 (A5) ではβカテニンの蓄積にも関わらず嚢胞 (100%) の誘導に留まったことから、大腸がんと比較して胃がんでは発がん性が低いと考えられた。

(c) EBV 型

Pik3ca^{H1047R} 変異と p53 欠失の組み合わせでは腺癌 (80%) から嚢胞 (20%) まで幅広い悪制度の腫瘍が誘導された。皮下では EBV 感染に伴う激しい炎症が存在しないために発がん率が 100%に至らず、多様性が大きくなっている可能性が考えられた。また、EBV 型は CDKN2A 不活性化が高頻度であることから Pik3ca^{H1047R} 変異 Cdkn2a の発現抑制の組み合わせによる発がん性を検討したところ、多様な腫瘍が誘導された。

(d) MSI 型

MSI 型では Tgfbr2 と Kras の二重変異の症例が報告されていたことから、当該変異を再現したところ実際に発がんした。また、興味深いことにヒトでは稀な扁平上皮癌だった。

4-2 解剖学的位置による発がん性の違い

これまでは腺胃全体からオルガノイドを作成してきたが、胃底腺領域と幽門領域は肉眼的にも容易に区別可能であり、また上記サブタイプについても部位により発症頻度が異なることが知られている。そこで、両者を別々に採取して遺伝子異常を導入することで発がん性や組織像に差が生じるか検討したが、全体として有意な差は認められなかった。このことはピロリ感染や

4-3 *ex vivo* 発がんモデルと化学発がんの統合

In vivo モデルにおいて、マウス胃は何らかの理由により化学発がん抵抗性であることが知られている。一方、K5 オルガノイドは GEM とは異なり全例が腺癌を形成することから、本実験系では発がん性が増強される可能性がある。申請者は変異原と p53 欠失の組み合わせにより大腸や乳腺のオルガノイドから腫瘍形成が可能なことを最近報告しており、胃においても腺癌未満の弱い腫瘍原性しか持たない A5 および p53 欠失オルガノイドへの変異原投与により皮下腫瘍としてがん化誘導が可能か検証した。その結果 MNU の投与により A5 由来の嚢胞が固形癌まで悪性化することを確認した。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計12件（うち査読付論文 12件／うち国際共著 1件／うちオープンアクセス 12件）

| | |
|--|-------------------------|
| 1. 著者名 Yao Jihang, Takenaga Keizo, Koshikawa Nobuko, Kida Yuki, Lin Jason, Watanabe Takayoshi, Maru Yoshiaki, Hippo Yoshitaka, Yamamoto Seigi, Zhu Yuyan, Nagase Hiroki | 4. 巻 152 |
| 2. 論文標題 Anticancer effect of a pyrrole imidazole polyamide triphenylphosphonium conjugate selectively targeting a common mitochondrial DNA cancer risk variant in cervical cancer cells | 5. 発行年 2022年 |
| 3. 雑誌名 International Journal of Cancer | 6. 最初と最後の頁 962 ~ 976 |
| 掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1002/ijc.34319 | 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 Kusakabe M, Taguchi A, Tanikawa M, Hoshi D, Tsuchimochi S, Qian X, Toyohara Y, Kawata A, Wagatsuma R, Yamaguchi K, Yamamoto Y, Ikemura M, Sone K, Mori Uchino M, Matsunaga H, Tsuruga T, Nagamatsu T, Kukimoto I, Wada Hiraiki O, Kawazu M, Ushiku T, Takeyama H, Oda K, Kawana K, Hippo Y, Osuga Y | 4. 巻 - |
| 2. 論文標題 Application of organoid culture from HPV18 positive small cell carcinoma of the uterine cervix for precision medicine | 5. 発行年 2023年 |
| 3. 雑誌名 Cancer Medicine | 6. 最初と最後の頁 - |
| 掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1002/cam4.5588 | 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 Hoshi Daisuke, Kita Emiri, Maru Yoshiaki, Kogashi Hiroyuki, Nakamura Yuki, Tatsumi Yasutoshi, Shimozato Osamu, Nakamura Kazuyoshi, Sudo Kentaro, Tsujimoto Akiko, Yokoyama Ryo, Kato Atsushi, Ushiku Tetsuo, Fukayama Masashi, Itami Makiko, Yamaguchi Taketo, Hippo Yoshitaka | 4. 巻 114 |
| 2. 論文標題 Derivation of pancreatic acinar cell carcinoma cell line HS 1 as a patient derived tumor organoid | 5. 発行年 2022年 |
| 3. 雑誌名 Cancer Science | 6. 最初と最後の頁 1165 ~ 1179 |
| 掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1111/cas.15656 | 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 Imai Toshio, Hippo Yoshitaka | 4. 巻 13 |
| 2. 論文標題 Editorial: Development of in vitro toxicology methods using organoid systems and toxicogenomic approaches | 5. 発行年 2022年 |
| 3. 雑誌名 Frontiers in Genetics | 6. 最初と最後の頁 - |
| 掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3389/fgene.2022.1030580 | 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 Ishigamori Rikako, Naruse Mie, Hirata Akihiro, Maru Yoshiaki, Hippo Yoshitaka, Imai Toshio | 4. 巻 35 |
| 2. 論文標題 The potential of organoids in toxicologic pathology: Histopathological and immunohistochemical evaluation of a mouse normal tissue-derived organoid-based carcinogenesis model | 5. 発行年 2022年 |
| 3. 雑誌名 Journal of Toxicologic Pathology | 6. 最初と最後の頁 211 ~ 223 |
| 掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1293/tox.2022-0021 | 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 Maru Yoshiaki, Hippo Yoshitaka | 4. 巻 12 |
| 2. 論文標題 Two-Way Development of the Genetic Model for Endometrial Tumorigenesis in Mice: Current and Future Perspectives | 5. 発行年 2021年 |
| 3. 雑誌名 Frontiers in Genetics | 6. 最初と最後の頁 798628-798628 |
| 掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3389/fgene.2021.798628 | 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 Maru Yoshiaki, Hippo Yoshitaka | 4. 巻 13 |
| 2. 論文標題 Twists and turns in Kras-driven tumor initiation | 5. 発行年 2021年 |
| 3. 雑誌名 Aging | 6. 最初と最後の頁 24477 ~ 24479 |
| 掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.18632/aging.203726 | 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 Ono Hanako, Arai Yasuhito, Furukawa Eisaku, Narushima Daichi, Matsuura Tetsuya, Nakamura Hiromi, Shiokawa Daisuke, Nagai Momoko, Imai Toshio, Mimori Koshi, Okamoto Koji, Hippo Yoshitaka, Shibata Tatsuhiro, Kato Mamoru | 4. 巻 19 |
| 2. 論文標題 Single-cell DNA and RNA sequencing reveals the dynamics of intra-tumor heterogeneity in a colorectal cancer model | 5. 発行年 2021年 |
| 3. 雑誌名 BMC Biology | 6. 最初と最後の頁 207-207 |
| 掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1186/s12915-021-01147-5 | 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 Maru Yoshiaki, Tanaka Naotake, Tatsumi Yasutoshi, Nakamura Yuki, Yao Ryoji, Noda Tetsuo, Itami Makiko, Hippo Yoshitaka | 4. 巻 255 |
| 2. 論文標題 Probing the tumorigenic potential of genetic interactions reconstituted in murine fallopian tube organoids | 5. 発行年 2021年 |
| 3. 雑誌名 The Journal of Pathology | 6. 最初と最後の頁 177 ~ 189 |
| 掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1002/path.5752 | 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 Maru Yoshiaki, Tanaka Naotake, Tatsumi Yasutoshi, Nakamura Yuki, Itami Makiko, Hippo Yoshitaka | 4. 巻 10 |
| 2. 論文標題 Kras activation in endometrial organoids drives cellular transformation and epithelial-mesenchymal transition | 5. 発行年 2021年 |
| 3. 雑誌名 Oncogenesis | 6. 最初と最後の頁 46-46 |
| 掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1038/s41389-021-00337-8 | 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 Izumiya Masashi, Kato Shingo, Hippo Yoshitaka | 4. 巻 13 |
| 2. 論文標題 Recent Advances in Implantation-Based Genetic Modeling of Biliary Carcinogenesis in Mice | 5. 発行年 2021年 |
| 3. 雑誌名 Cancers | 6. 最初と最後の頁 2292 ~ 2292 |
| 掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3390/cancers13102292 | 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 Kato Shingo, Fushimi Kentaro, Yabuki Yuichiro, Maru Yoshiaki, Hasegawa Sho, Matsuura Tetsuya, Kurotaki Daisuke, Suzuki Akihiro, Kobayashi Noritoshi, Yoneda Masato, Higurashi Takuma, Enaka Makiko, Tamura Tomohiko, Hippo Yoshitaka, Nakajima Atsushi | 4. 巻 10 |
| 2. 論文標題 Precision modeling of gall bladder cancer patients in mice based on orthotopic implantation of organoid-derived tumor buds | 5. 発行年 2021年 |
| 3. 雑誌名 Oncogenesis | 6. 最初と最後の頁 33-33 |
| 掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1038/s41389-021-00322-1 | 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 - |

〔学会発表〕 計10件（うち招待講演 7件 / うち国際学会 2件）

| |
|----------------------------------|
| 1. 発表者名 筆宝義隆 |
| 2. 発表標題 オルガノイド培養技術のがん研究への応用 |
| 3. 学会等名 第74回 日本電気泳動学会総会（招待講演） |
| 4. 発表年 2023年～2024年 |

| |
|--|
| 1. 発表者名 筆宝義隆 |
| 2. 発表標題 Organoid model for carcinogenesis in mouse and human |
| 3. 学会等名 the 8th International Conference on Pharmacy and Advanced Pharmaceutical Sciences（招待講演）（国際学会） |
| 4. 発表年 2023年～2024年 |

| |
|--|
| 1. 発表者名 筆宝義隆 |
| 2. 発表標題 希少癌研究に対するオルガノイド培養の応用 |
| 3. 学会等名 先端モデル動物支援プラットフォーム 2023年度成果発表会（招待講演） |
| 4. 発表年 2023年～2024年 |

| |
|--|
| 1. 発表者名 落合 頼業、泉谷 昌志、星 大輔、古樫 浩之、筆宝 義隆 |
| 2. 発表標題 マウスオルガノイド大腸発癌モデルを用いた薬剤スクリーニング |
| 3. 学会等名 第81回日本癌学会学術総会 |
| 4. 発表年 2022年～2023年 |

| |
|--|
| 1. 発表者名 丸喜明、筆宝義隆 |
| 2. 発表標題 Organoid-based hybrid carcinogenesis model to probe pro-tumorigenic genetic interactions in endometrium |
| 3. 学会等名 第81回日本癌学会学術総会 |
| 4. 発表年 2022年～2023年 |

| |
|--------------------------------------|
| 1. 発表者名 丸喜明、筆宝義隆 |
| 2. 発表標題 オルガノイド培養技術のがん予防研究への導入に向けて |
| 3. 学会等名 がん予防学術大会2022 KYOTO (招待講演) |
| 4. 発表年 2022年～2023年 |

| |
|---|
| 1. 発表者名 丸喜明、筆宝義隆 |
| 2. 発表標題 子宮内膜正常オルガノイドを用いた発がんおよび転移モデルの確立 |
| 3. 学会等名 第31回日本がん転移学会学術集会・総会 (招待講演) |
| 4. 発表年 2022年～2023年 |

| |
|--|
| 1. 発表者名 丸喜明 |
| 2. 発表標題 Translational research in gynecologic cancer using organoid culture technique |
| 3. 学会等名 第81回日本癌学会学術総会 (招待講演) |
| 4. 発表年 2022年～2023年 |

| |
|---|
| 1. 発表者名 筆宝義隆 |
| 2. 発表標題 がん特異的遺伝子異常を再構成したマウスオルガノイドによる発がん協調作用の検出 |
| 3. 学会等名 第39回ヒト細胞学会（招待講演） |
| 4. 発表年 2021年～2022年 |

| |
|---|
| 1. 発表者名 Yoshiaki Maru, Yoshitaka Hippo |
| 2. 発表標題 Banking of patient-derived gynecologic cancer organoids toward implementation of precision medicine. |
| 3. 学会等名 1ST JCA-AACR PRECISION CANCER MEDICINE INTERNATIONAL CONFERENCE（国際学会） |
| 4. 発表年 2021年～2022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 |
|---------------|---|--|----|
| 研究 分担 者 | 丸 喜明 (Maru Yoshiaki) (30742754) | 千葉県がんセンター（研究所）・精密腫瘍モデル研究室・研究員 (82504) | |

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 |
|---------|---------|