

令和 6 年 6 月 24 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：21K09506

研究課題名(和文) マウス子宮内膜オルガノイドを用いた発がん転移を促進する遺伝学的相互作用の解明

研究課題名(英文) Elucidation of genetic interactions underlying tumor development and metastasis using murine endometrial organoids

研究代表者

丸 喜明 (Maru, Yoshiaki)

千葉県がんセンター(研究所)・がん予防センター 精密腫瘍モデル研究室・研究員

研究者番号：30742754

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,200,000円

研究成果の概要(和文)：マウス子宮内膜オルガノイド(OR)へレンチウイルスを用いてcDNAおよびshRNAを導入し、ヌードマウス皮下で腫瘍原性を評価した。Kras変異とCdkn2a発現抑制あるいはTrp53欠失で癌肉腫が誘導された。一方、これまでのin vivoの結果と異なりPten発現抑制はKras変異と組み合わせても腫瘍化しなかったが、長期培養ORでは転移性腺癌が誘導された。その後の解析でTgfbr2欠失の重要性が示唆され、検証実験を行った。Kras変異とTgfbr2欠失で発がんし、Cdkn2aあるいはPten発現抑制を追加すると転移性癌が誘導された。以上のように、子宮体がんの発がんや転移に関わる洞察が得られた。

研究成果の学術的意義や社会的意義

子宮体がんの発がんおよび転移機構を解明するために、一般的に利用される遺伝子改変マウスの作製とは異なる方法で発がんモデルの確立を試みた。具体的には、オルガノイド培養法でマウス正常子宮内膜細胞を培養し、遺伝子異常の導入後に免疫不全マウスに移植、腫瘍原性の有無を評価した。ヒト子宮体がんを高頻度の遺伝子異常やシグナル経路の異常をマウス子宮内膜オルガノイドに再現することで発がんだけでなく転移性腫瘍の誘導に成功した。本アプローチを利用することで、子宮体がんと同定された意義不明な遺伝子異常の発がんに与える影響の検証も可能となり、子宮体がんの本態解明や治療標的探索など様々な研究を促進することが期待される。

研究成果の概要(英文)：We reconstituted genetic aberrations in endometrial organoids (EmOR) from various genetically engineered mice by lentivirally introducing cDNA and shRNA, and examined their tumorigenicity by inoculation into dorsal skin of nude mice. We found that EmOR carrying mutant Kras and Cdkn2a knockdown or Trp53 loss developed carcinosarcoma. Unlike an earlier in vivo study, EmOR with mutant Kras and concomitant Pten knockdown never developed tumor, whereas late-passage EmOR exclusively gave rise to adenocarcinoma with lymph node metastasis. Through the analyses of the resultant tumor, we found that Tgfbr2 loss may be critically implicated in endometrial carcinogenesis. The validation experiments revealed that KrasG12D-expressing early-passage EmOR with Tgfbr2 loss indeed developed carcinoma, whereas additional knockdown of Cdkn2a or Pten almost invariably induced metastasis. Thus, we gained novel insights into the carcinogenesis and metastasis of endometrial cancer using organoid models.

研究分野：分子腫瘍学

キーワード：子宮体がん 癌肉腫 オルガノイド 発がん 転移

1. 研究開始当初の背景

(1) 子宮がんには多様なサブタイプが存在し高頻度の遺伝子変異や病態も異なる

子宮体がんは最も頻度の高い婦人科悪性腫瘍であり、近年増加傾向にある。組織学的には類内膜癌が約 80%を占め、残り 20%は漿液性癌や明細胞癌、癌肉腫など臨床的に悪性度が高いサブタイプが占める。近年、子宮体がんで共通にみられる多くの遺伝子異常が同定され、組織型ごとに遺伝子や変異頻度が大きく異なることが示された(Murali, et al, Lancet Oncol, 2014)。例えば類内膜癌では *PIK3CA*, *P TEN*, *ARID1A*, *KRAS*に、漿液性癌では TP53 に高頻度に変異を認める。また、ゲノム異常の特徴により子宮内膜癌が 4 つのサブタイプ (POLE 型、マイクロサテライト不安定型、低コピー数異常型、高コピー数異常型) に新たに分類することも提唱された (TCGA, Nature, 2013)。

(2) 子宮体がんの発がん機構解明のための新規疾患モデルの必要性

発がん機構解明は個体レベルでの病態再現により行うことが従来一般的だったが、①多数の遺伝子異常の組み合わせを全て *in vivo* で再現するには多大な労力や時間を要する、②腫瘍発生に長期間を要する場合が多い、③選択する Cre-Tg マウスによっては必ずしも遺伝子改変の臓器・細胞特異性が高くない、などの問題点があった。子宮体がんの遺伝子改変マウスモデルも、大半は組織型や変異頻度を反映して *Pten* 欠失にその他の遺伝子異常を組み合わせることで作製されており、近年のゲノム解析の結果を反映した疾患モデルの包括的な作製には至っていない。また、上皮と間質の両方で遺伝子組み換えを起こすモデルが多く、ヒトでの病態とは厳密には異なる点も問題だった。そのため、これらの問題を回避可能な疾患モデル開発が求められていた。

2. 研究の目的

申請者らはマウス由来細胞のオルガノイド培養およびレンチウイルスを用いた遺伝子導入による発がん誘導に豊富な経験を有しており、消化器系がんを中心にハイブリッド型発がんモデルの開発を進めてきた (Maru, et al, Methods Mol Biol 2016, Maru et al, Cancer Sci 2019, Ochiai, et al, Carcinogenesis 2019, Matsuura, et al, Carcinogenesis 2020)。そこで本研究では、同手法を用いてマウス子宮内膜オルガノイドに子宮体がんで高頻度の遺伝子異常やシグナル経路の異常を単独あるいは組み合わせて再現し、その遺伝子改変オルガノイドの腫瘍原性を評価する。その後、誘導された腫瘍を多方面に解析することで、子宮体がんの発がんや転移を促進する遺伝学的相互作用を明らかにすることを目的とする。

3. 研究の方法

(1) マウス正常子宮内膜オルガノイドの樹立

野生型 C57BL/6J マウスおよび遺伝子改変マウス (*Kras*^{LSL-G12D/+}, *Kras*^{LSL-G12D/+}; *Trp53*^{flox/flox}, *Kras*^{LSL-G12D/+}; *Tgfbr2*^{flox/flox}, *Kras*^{LSL-G12D/+}; *Tgfbr2*^{flox/+}, *R26-Pik3ca*^{H1047R}) から子宮角を実体顕微鏡下で採取し、物理的および酵素的処理後にマトリゲル二層法 (Matrigel bilayer organoid culture: MBOC) を用いたオルガノイド培養を行った。オルガノイド培養に使用した培地は Advanced DMEM/F-12 (50 ng/ml mouse EGF, 250 ng/ml R-spondin 1, 100 ng/ml Noggin, 10 μM Y27632, 1 μM Jagged-1, 2.5 μM CHIR-99021, L-glutamine solution, penicillin/streptomycin, amphotericin B suspension) である。

(2) レンチウイルスを用いた *in vitro* 遺伝子導入による発がん誘導

種々のマウス由来子宮内膜オルガノイドに、レンチウイルスを用いて cDNA 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 で確認した。腫瘍原性は、 5×10^5 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や転移の有無を評価した。

(3) 誘導された皮下腫瘍の解析

皮下腫瘍を 10%中性緩衝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、ゲノム PCR、Western blotting およびアレイ CGH 解析を行い、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を比較した。

4. 研究成果

(1) 変異型 *Kras* および *Cdkn2a* 発現抑制あるいは *Trp53* 欠失の導入による癌肉腫の誘導

子宮体がんでは高頻度に Pten の異常を認めるため、子宮内膜オルガノイドに Pten の発現抑制を誘導したが、過去の遺伝子改変マウスモデルでの結果と異なり単独でも変異型 Kras と組み合わせても腫瘍化に至らなかった。一方で、変異型 Kras と Cdkn2a 発現抑制あるいは Trp53 欠失を組み合わせることで癌腫と肉腫成分で構成される癌肉腫が高率に誘導された。

(2) 長期培養子宮内膜オルガノイドへの変異型 Kras および Pten 導入による転移性腺癌の誘導
通常の実験条件下では、変異型 Kras と Pten 発現抑制の組み合わせで腫瘍化が認められなかったが、子宮内膜オルガノイドの長期間培養(継代 20 回)後に全く同じ実験を行ったところ、両側に腺癌が誘導され、さらにリンパ節および肺にも転移巣を認めた。そこで発がん性・転移能の獲得機序を明らかにするために、遺伝子導入前のオルガノイド、皮下接種前の遺伝子導入オルガノイドおよび皮下腫瘍由来オルガノイドにおけるゲノムのコピー数変化をアレイ CGH で比較した。その結果、Tgfbr2 の遺伝子座に皮下接種前オルガノイドで 1 コピー、皮下腫瘍由来オルガノイドで 2 コピーとほぼ限局的な段階的欠失が生じていたことが確認されたため、Tgfbr2 の異常が発がんおよび転移能獲得に関与している可能性が強く示唆された。

(3) 変異型 Kras と TGF-β経路抑制による発がんの誘導

子宮体がんの発がんにおける TGF-β経路の不活性化の重要性を検証するために、変異型 Kras を発現させた子宮内膜オルガノイドに shLuc, shSmad4 および shTgfbr2 を導入した。変異型 Kras と shLuc の組み合わせでは、これまでと同様に基本的に腫瘍の発生には至らなかった。一方、変異型 Kras と shSmad4 あるいは shTgfbr2 の組み合わせでは充実性腫瘍を形成し、組織学的には腺癌で一部に扁平上皮への分化を伴う場合があった。

(4) 変異型 Kras と Tgfbr2 両アレル欠失および Cdkn2a 発現抑制による転移性がんの誘導

変異型 Kras と TGF-β経路の抑制で誘導された腫瘍では転移は確認されなかったため、直接転移性がんを誘導するには更なる遺伝子異常が必要であることが示唆された。そこで、Kras^{LSL-G12D/+}; Tgfbr2^{flox/flox} マウス由来の子宮内膜オルガノイドを用いて更なる検討を行った。まず変異型 Kras と Tgfbr2 両アレル欠失による腫瘍原性を評価したところ、(3)の結果と同様に扁平上皮への分化を伴う腺癌が誘導されたが、転移は確認されなかった。そこで Cdkn2a あるいは Pten の発現抑制をさらに追加したところ、充実性腫瘍を形成し組織学的には扁平上皮への分化を伴う腺癌であり、Cdkn2a 発現抑制を組み合わせた場合においても肉腫成分は確認されなかった。さらに、Cdkn2a あるいは Pten 発現抑制を追加した場合にはリンパ節や肺への転移がみられ、その頻度は Cdkn2a 発現抑制を追加した場合で、より高頻度であった。

さらに、Kras^{LSL-G12D/+}; Trp53^{flox/flox} マウス由来の子宮内膜オルガノイドに Cre を導入して、変異型 Kras の発現および Trp53 欠失を誘導し、そこに shTgfbr2 を導入して腫瘍原性を評価した。しかし、Tgfbr2 の発現抑制による明らかな変化は確認されなかった。

(5) 変異型 Kras と Tgfbr2 片側アレル欠失および Cdkn2a 発現抑制による転移性がんの誘導

子宮体がんの発がんおよび転移と Tgfbr2 との関連を更に検証するため、Kras^{LSL-G12D/+}; Tgfbr2^{flox/+} マウス由来の子宮内膜オルガノイドを用いて実験を行った。まず変異型 Kras と Tgfbr2 片側アレル欠失による腫瘍原性を評価したが、腫瘍形成は確認されなかった。そこでさらに Cdkn2a あるいは Pten の発現抑制を追加したところ、腫瘍形成が確認された。組織学的には(4)の結果と類似していたが、Cdkn2a を追加した場合には癌肉腫の場合が多かった。リンパ節や肺への転移についても(4)の結果と同様に Cdkn2a を追加した方が高頻度であった。また、腫瘍由来オルガノイドでは高頻度に野生型 Tgfbr2 アレルが欠失しており、Tgfbr2 両アレルを欠失した細胞が優位に選択されている可能性が示唆された。

以上のように、マウス子宮内膜オルガノイドを用いた発がんモデル開発において、変異型 Kras と Cdkn2a 発現抑制あるいは Trp53 欠失を組み合わせることで高頻度に癌肉腫が誘導されることを見出した (Maru, et al, Oncogenesis, 2021)。さらに、その後の解析で Tgfbr2, Cdkn2a および Pten が変異型 Kras を発現した子宮内膜細胞の発がんや転移において重要な役割を担っていることが明らかとなった (投稿中)。一方で、変異型 Kras を伴わずに安定的に発がん可能な遺伝子異常の組み合わせの同定には至らなかった。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計8件（うち査読付論文 8件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 5件）

1. 著者名 Maru Yoshiaki, Kohno Mami, Suzuka Kiyomi, Odaka Akiko, Masuda Mari, Araki Akinobu, Itami Makiko, Tanaka Naotake, Hippo Yoshitaka	4. 巻 37
2. 論文標題 Establishment and characterization of multiple patient-derived organoids from a case of advanced endometrial cancer	5. 発行年 2024年
3. 雑誌名 Human Cell	6. 最初と最後の頁 840 ~ 853
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1007/s13577-024-01048-z	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 -

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 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 オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	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 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
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 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 オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	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
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 -

〔学会発表〕 計19件 (うち招待講演 8件 / うち国際学会 1件)

1. 発表者名 丸喜明、田中尚武、伊丹真紀子、筆宝義隆
2. 発表標題 オルガノイドを用いた子宮体部癌肉腫の空間的多様性の評価と治療薬候補の探索
3. 学会等名 第41回日本ヒト細胞学会学術集会
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 丸喜明、田中尚武、筆宝義隆
2. 発表標題 Organoid-based evaluation of spatial diversity in an advanced uterine carcinosarcoma case
3. 学会等名 第82回日本癌学会学術総会
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 丸喜明
2. 発表標題 子宮体・頸がんの治療戦略構築に向けた患者由来がんモデルの活用
3. 学会等名 日本患者由来がんモデル学会学術集会2023 (招待講演)
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 筆宝義隆、丸喜明
2. 発表標題 マウス子宮内膜細胞の発がん課程における運命決定機構の解明
3. 学会等名 第27回日本がん分子標的治療学会学術集会
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 筆宝義隆、丸喜明
2. 発表標題 マウス子宮内膜オルガノイドを用いた正常細胞の直接転換による転移性がん細胞の作出
3. 学会等名 第32回日本がん転移学会学術集会
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 丸喜明、田中尚武、伊丹真紀子、筆宝義隆
2. 発表標題 前臨床モデルとしての患者由来子宮頸がんオルガノイドの樹立
3. 学会等名 第113回日本病理学会総会
4. 発表年 2024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（招待講演）
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 丸喜明、筆宝義隆
2. 発表標題 Establishment of carcinogenesis and metastasis model using normal endometrial organoids
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

1. 発表者名 丸喜明、田中尚武、鈴鹿清美、伊丹真紀子、筆宝義隆
2. 発表標題 難治性子宮体がんの治療戦略構築に向けた患者由来オルガノイドの活用
3. 学会等名 第64回日本婦人科腫瘍学術講演会
4. 発表年 2022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（招待講演）
4. 発表年 2022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
4. 発表年 2022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開発
3. 学会等名 第35回発癌病理研究会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 丸喜明
2. 発表標題 病理検体からの患者由来オルガノイドの樹立とその利用
3. 学会等名 第62回日本臨床細胞学会総会春期大会（招待講演）
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 丸喜明、田中尚武
2. 発表標題 MET遺伝子のコピー数異常を伴う患者由来子宮頸部腺癌オルガノイドの樹立
3. 学会等名 第62回日本臨床細胞学会総会春期大会（招待講演）
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 丸喜明、筆宝義隆
2. 発表標題 子宮癌肉腫の発症機構解明と治療戦略構築に向けたマウスおよび患者由来オルガノイドの活用
3. 学会等名 第17回日本病理学会カンファレンス
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 丸喜明
2. 発表標題 マウスex vivo婦人科がんモデルを用いた発がん促進的な遺伝的相互作用の包括的検証
3. 学会等名 2021年度若手支援技術講習会（招待講演）
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 丸喜明、筆宝義隆
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

1. 発表者名 丸喜明、筆宝義隆
2. 発表標題 Probing pro-tumorigenic genetic interactions using murine fallopian tube organoids
3. 学会等名 第80回日本癌学会学術総会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 丸喜明
2. 発表標題 婦人科がんの克服を目指したオルガノイドの活用
3. 学会等名 患者由来がんモデル研究会2021（招待講演）
4. 発表年 2021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	筆宝 義隆 (Hippo Yoshitaka) (30359632)	千葉県がんセンター(研究所)・研究所・研究所長 (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
---------	---------