

令和 5 年 5 月 14 日現在

機関番号：14401

研究種目：若手研究

研究期間：2021～2022

課題番号：21K16790

研究課題名（和文）マウス卵管オルガノイドを用いた、安価でスピーディな新規卵巣がんマウスモデルの樹立

研究課題名（英文）A novel ovarian cancer mouse model derived from genetically engineered organoid

研究代表者

中村 幸司（Nakamura, Koji）

大阪大学・大学院医学系研究科・助教

研究者番号：00900151

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,600,000円

研究成果の概要（和文）：本研究は正常免疫マウス卵管より作製したオルガノイドに発がん刺激を加えin vitroでマウス卵巣がんを発生させ、正常免疫マウスに同所移植する「オルガノイド由来卵巣がんマウスモデル」を樹立することを目標としている。研究期間で得られた成果として、まず正常免疫マウスより卵管を単離し、オルガノイドの安定的な培養法を確立した。また、オルガノイドが卵管由来であることを確認した。オルガノイドに発がん性の遺伝子改変を行うためのプラスミドを作製した。今後は卵巣がんオルガノイドを安定的に培養する手法を確立し、マウス卵巣へ同所移植し、オルガノイド由来卵巣がんマウスモデルを樹立する予定である。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究の成果は今後、ヒト卵巣がんの病態を再現しつつ、安価でスピーディな、かつ特別な設備がなくとも作製できる卵巣がんマウスモデルを樹立へと繋がるものである。そしてこのマウスモデルが樹立されれば卵巣がんの新規治療法の確立のみならず、進展機構の解明、早期診断法の確立など、卵巣がんの予後改善に向けた研究に広く役立てることが可能となる。本研究のマウスモデルが確立されれば、多くの研究者に応用されることが期待され、世界中の卵巣がん研究を加速させる可能性があると考えている。

研究成果の概要（英文）：The goal of this study is to establish an organoid-derived ovarian cancer mouse model in which mouse ovarian cancer is generated in vitro by applying oncogenic stimuli to organoids established from the oviducts of immunocompetent mice and transplanted orthotopically into mice. We first isolated oviducts from immunocompetent mice and established organoid culture. We also confirmed that the organoids are derived from the oviduct. CRISPR plasmids for oncogenic stimulation were successfully cloned. As a future plan, we aim to establish ovarian cancer organoids and further transplant them orthotopically into mice.

研究分野：産婦人科、卵巣がん

キーワード：卵巣がん オルガノイド モデルマウス 遺伝子改変 CRISPR/Cas9 卵巣癌 マウスモデル GEMM

## 1. 研究開始当初の背景

卵巣がんは標準治療である手術と化学療法を実施しても大部分の進行がんは再発し、致命的となる予後不良な疾患である。これまで多くの基礎・臨床研究が行われてきたが、この30年間で治療成績は殆ど向上していない。

卵巣がんの基礎研究の成果を臨床に直結させるには、適切な前臨床モデルが不可欠である。従来用いられてきたモデルの殆どはヒト卵巣がん細胞株を免疫不全マウスの腹腔内へ移植する Cell line-derived xenograft (CDX) であるが、CDX を用いた基礎研究に基づいて効果が期待された薬剤の95%はヒト臨床試験において卵巣がんへの有効性を認めなかった。また近年の研究で CDX に利用されてきた細胞株は実は卵巣がん固有の遺伝子変異を有していないことが明らかとなり (Nat Commun. 2013;4:2126.)、従来のモデルではヒト卵巣がん病態を十分に反映できていない可能性が指摘されている。

より忠実にヒト卵巣がんの病態を反映するモデルの樹立を目指して、高度免疫不全動物に患者由来のがん組織を同所移植することで Heterogeneity や微小環境を再現する Patient-derived xenograft (PDX) や、マウス体内で遺伝子変異を引き起こし、卵巣がんを自然発症する遺伝子改変マウスモデル (Genetically engineered mouse model (GEMM)) の開発が進行中である。しかしながら PDX は高度免疫不全動物を用いるため、免疫チェックポイント阻害薬の治療効果の判定は困難である。一方卵巣がん GEMM の樹立には長期間に渡りマウスの交配を要し、また目的の遺伝子変異を有する GEMM を得る効率は非常に低い。そこで「正常な免疫機構を持ち、ヒト卵巣がんの病態を忠実に再現する」卵巣がんマウスモデルを「安価で、スピーディに、効率よく」樹立できれば、今後の卵巣がん研究に大いに資するのではないかと考えた。近年、元の細胞の性質を保持できる3次元細胞培養法としてオルガノイドが注目されており、がん研究への応用が期待されている (Nat Rev Genet. 2018;19:671-687.)。また卵巣がんの中で最も頻度、悪性度が高い高異型度漿液性卵巣がんの主な発生源は卵巣ではなく卵管上皮であることが明らかとなった (Curr Opin Obstet Gynecol. 2017;29:26-34.)。

上記の知見に基づき、本研究では卵巣がんに高頻度に認める遺伝子変異をマウス卵管オルガノイドに導入し、正常免疫マウスに同所移植することでオルガノイド由来卵巣がんマウスモデルを作製し、既存のマウスモデルが抱える問題を解決し、卵巣がん研究に広く活用できるモデルの樹立を目指すこととした。

## 2. 研究の目的

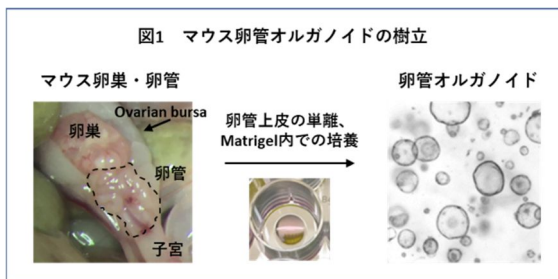
本研究の目的は、まずヒト卵巣がんの病態を再現しつつ、安価でスピーディな、かつ特別な設備がなくとも作製できる卵巣がんマウスモデルを樹立することである。そしてこのマウスモデルを用いて新規治療法の確立のみならず、卵巣がんの進展機構の解明、早期診断法の確立など、卵巣がんの予後改善に向けた研究に広く役立てることである。我々が提案する新しい卵巣がんマウスモデルは「正常な免疫機構を持ち、ヒト卵巣がんの病態を忠実に再現する」という GEMM の利点を残しながら、GEMM や PDX では実現が困難な「安価、スピーディ」という課題を解決できると考えている。またオルガノイドは新しい技術のため我々を含めごく一部の研究室でのみ培養手法が確立されているが、手技を習熟すれば特別な設備や技術を持たない研究室であっても同様の手法を再現できる。そのため本研究のマウスモデルが確立されれば、多くの研究者に利用されることが期待され、世界中の卵巣がん研究を加速させるインパクトを持つと考えている。

### 3. 研究の方法

- (1) 正常免疫マウスより卵管上皮を単離し、マウス卵管オルガノイドを樹立する。
- (2) レンチウイルスを用いてオルガノイドに目的の遺伝子発現を誘導する。
- (3) マウス卵管オルガノイドにヒト卵巣がんで高頻度に認める遺伝子変異を導入し、マウス卵巣がんオルガノイドを樹立する。

### 4. 研究成果

(1) 6-8 週齢のメスの正常免疫マウスを安楽死させ、卵管上皮細胞を単離し、Matrigel 内で培養し卵管オルガノイドを樹立した。培養液に添加する増殖因子を最適化し、オルガノイドを安定的に継代することに成功した(図 1)。



(2) レンチウイルスを用いてオルガノイドに安定的に目的の遺伝子を発現するため、腸管オルガノイドにレンチウイルスを導入するプロトコール(Methods Mol Biol. 2016;1422:13-21.)を参考に、マウス卵管オルガノイドに GFP を発現させることに成功した(図 2)。しかしレンチウイルス導入後の継代は困難なことも多く、現在プロトコールの最適化を図っている。



(3) 現在、別途クローニングした CRISPR プラスミドを用いて、マウス卵管オルガノイドに、ヒト卵巣がんで高頻度に発現しているがん抑制遺伝子の変異導入を行い卵巣がんオルガノイドの樹立を目指している。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計0件

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

|       | 氏名<br>(ローマ字氏名)<br>(研究者番号)    | 所属研究機関・部局・職<br>(機関番号) | 備考 |
|-------|------------------------------|-----------------------|----|
| 研究協力者 | 岡村 綾子<br><br>(Okamura Ayako) |                       |    |
| 研究協力者 | 石井 沙季<br><br>(Ishii Saki)    |                       |    |
| 研究協力者 | 蓬萊 愛実<br><br>(Horai Megumi)  |                       |    |

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