

令和 5 年 6 月 11 日現在

機関番号：32622

研究種目：若手研究

研究期間：2021～2022

課題番号：21K16954

研究課題名（和文）遺伝子改変ヒト唾液腺オルガノイドを用いた唾液腺腫瘍関連遺伝子変異の機能解析

研究課題名（英文）Functional analysis of salivary gland tumor-associated gene mutations using genetically modified human salivary gland organoids

研究代表者

石田 尚子 (ISHIDA, Shoko)

昭和大学・歯学部・助教

研究者番号：00882531

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）：オルガノイドとは特定臓器を模倣した三次元的な構造体である。当研究室ではごく最近ヒトiPS細胞から唾液腺オルガノイドの誘導に成功している。そこで、本研究では唾液腺導管癌の腫瘍関連遺伝子変異を導入した遺伝子改変唾液腺オルガノイドを作出することにより、in vitroにおける導入遺伝子を介した発癌過程の再現を試みた。得られたヒト唾液腺オルガノイドは形態学的にもタンパク発現レベルにおいても変化しており、実際の腫瘍との類似性が示唆された。このことから、当該遺伝子変異がヒトの唾液腺腫瘍発生に関与している可能性が示唆された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究によって、唾液腺導管癌に認められる遺伝子変異が直接的に腫瘍化に寄与している可能性が示唆された。更なる解析により腫瘍発生のメカニズムの解明が期待される。また、本研究で得られた遺伝子改変ヒト唾液腺オルガノイドは、新たな治療標的分子の発見や創薬研究の基盤的技術となり得ることが予想される。本遺伝子改変唾液腺オルガノイドは、疾患メカニズムの解析のみならず、治療法開発においても有用なモデルであると期待される。

研究成果の概要（英文）：Organoids are three-dimensional structures that mimic specific organs. We had recently succeeded in inducing salivary gland organoids from human iPS cells. In this study, we attempted to reproduce the carcinogenesis process in vitro by generating genetically modified salivary gland organoids with tumor-associated gene mutations of salivary duct carcinoma. The genetically modified human salivary gland organoids showed morphological and protein expression changes like human salivary gland tumors. These data suggested that this mutation may contribute to salivary gland tumorigenesis in patients.

研究分野：唾液腺腫瘍

キーワード：唾液腺腫瘍 オルガノイド TP53 iPS細胞

1. 研究開始当初の背景

正常細胞に段階的な遺伝子変異が蓄積することで癌化が生じる多段階発癌モデルが細胞の癌化モデルとして提唱されているが、特定の遺伝子変異の蓄積が真に癌化に寄与するか否かは適切な実験モデルがなく、長らく不明であった。一方で、3次元的なミニ臓器の作製法であるオルガノイド培養技術を応用して、大腸オルガノイドによる大腸癌の多段階発癌の再現実験が近年報告された。申請者の研究室ではマウス ES 細胞由来唾液腺オルガノイドの誘導方法を開発し (Tanaka, J. *et al.*, *Nat Commun.* 2018)、以前よりマウス唾液腺オルガノイドからの腫瘍発生モデルの構築にも取り組んでいた。さらに、ごく最近開発されたヒト iPS 細胞由来唾液腺オルガノイドは、よりヒト唾液腺に類似したモデルとして期待されている (Tanaka, J. *et al.*, *Nat Cell Biol.* 2022)。

2. 研究の目的

本研究の目的は、唾液腺腫瘍の発生と関連があるとされてきた遺伝子変異をヒト iPS 細胞に導入し、唾液腺オルガノイドへ分化・誘導することで、特定の遺伝子変異が直接的に腫瘍化に寄与するか否かを実験的に検証することにある。

3. 研究の方法

(1) ヒト iPS 細胞への遺伝子導入による遺伝子改変 iPS 細胞株の樹立

高悪性度の唾液腺腫瘍である唾液腺導管癌に認められる遺伝子変異 (*TP53* の c.626_627del、p.R209Kfs*6) を CRISPR-Cas9 技術を応用してヒト iPS 細胞へ導入した。遺伝子変異を導入した後、限界希釈法にて単一クローンに分離した。Sanger 法にて当該遺伝子変異が導入されているクローンを選出し、RT-PCR にて未分化マーカーの発現を保持していることを確認した。

(2) 遺伝子改変ヒト iPS 細胞からヒト唾液腺オルガノイドへの分化誘導

先行研究 (Tanaka, J. *et al.*, *Nat Cell Biol.* 2022) の手法に従って、遺伝子改変ヒト iPS 細胞を分化・誘導し、ヒト唾液腺オルガノイドを作出した。

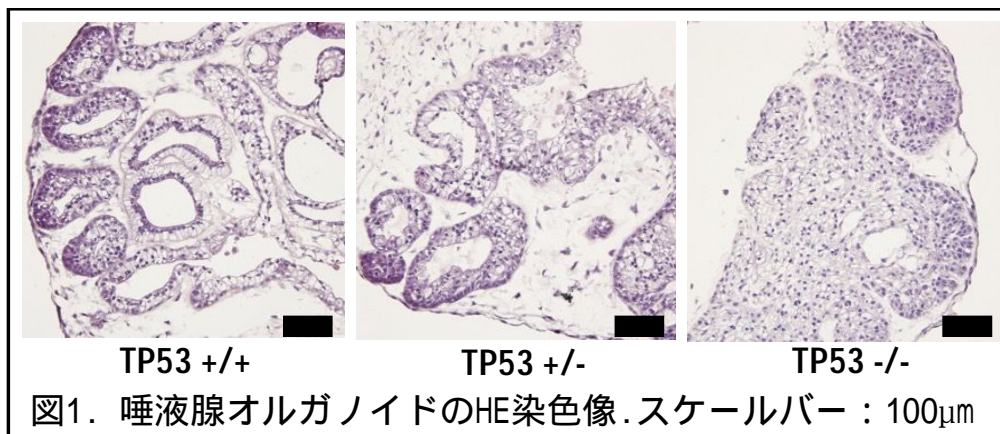
(3) 遺伝子改変ヒト唾液腺オルガノイドの解析

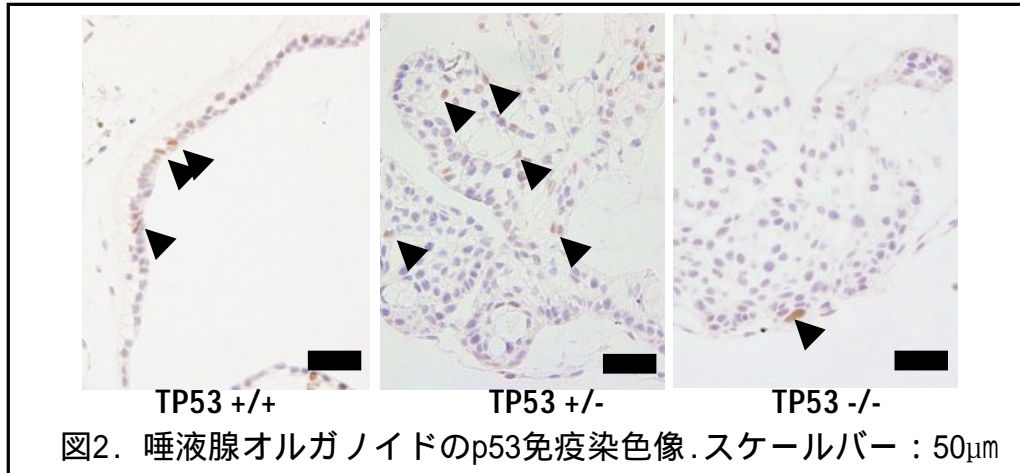
遺伝子改変による唾液腺オルガノイドの形態変化を組織学的な手法によって解析した。具体的には HE 染色で形態変化を分析し、免疫染色にて蛋白レベルでの発現変化を解析した。

4. 研究成果

(1) 研究の主な成果

ヒト唾液腺オルガノイドへの分化・誘導開始後 80 日時点で、野生型 (*TP53* +/+) および *TP53* 遺伝子の改変を片アレルに有するもの (*TP53* +/-) では多数の腺管形成がみられた一方で、両アレルに変異を有するもの (*TP53* -/-) では充実性の増殖が主体であり、腺管形成はわずかであった (図 1)。また、両アレルに変異を有するものは p53 免疫染色では極端に染色性が低下しており、実際の腫瘍における報告 (Simion I. *et al.* *Cancer.* 2016) と矛盾しない結果であった (図 2)。本研究で作出された遺伝子改変唾液腺オルガノイドは野生型に比べて形態および p53 タンパクの発現が変化していると考えられた。





(2) 得られた成果の国内外における位置づけとインパクト

腫瘍オルガノイドに関して、大腸癌では正常大腸オルガノイドに腫瘍関連遺伝子を複数導入することで人為的に腫瘍オルガノイドを作成した報告がある(Matano, M. *et al.*, *Nat Med.* 2015)。しかしながら、ヒト唾液腺オルガノイドを用いた同様な研究に関する報告は未だなされていない。本研究では唾液腺導管癌に認められる遺伝子変異を導入したヒト唾液腺オルガノイドを作成した。作成されたオルガノイドは充実性の増殖を示しており、腫瘍を彷彿とさせる形態変化を示した。また、p53 のタンパク発現にも実際の腫瘍と類似した変化がみられた。このことから、当該遺伝子変異がヒト唾液腺腫瘍発生に直接関与している可能性があることが実験的に検証されたと考えられる。

(3) 今後の展望

本研究により得られた遺伝子改変ヒト iPS 細胞由来唾液腺オルガノイドを更に解析することにより、唾液腺腫瘍発生メカニズムの解明につながることを期待される。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計1件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 石田尚子、大沼慎太郎、行森茜、鯨岡聡子、安原理佳、美島健二
2. 発表標題 遺伝子改変ヒトiPS細胞誘導唾液腺オルガノイドによる腫瘍モデルの開発
3. 学会等名 第112回日本病理学会総会
4. 発表年 2023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
---------------------------	-----------------------	----

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
---------	---------