

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 6 月 13 日現在

機関番号：82504

研究種目：基盤研究(B) (一般)

研究期間：2014～2016

課題番号：26290044

研究課題名(和文) 大腸発がんの新規細胞モデルを用いた発がん分子機構解明と治療標的の同定の統合的研究

研究課題名(英文) Elucidation of molecular mechanisms underlying colon carcinogenesis and discovery of therapeutic targets by using a novel in vitro model

研究代表者

筆宝 義隆 (Hippo, Yoshitaka)

千葉県がんセンター(研究所)・発がん制御研究部・部長

研究者番号：30359632

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 12,900,000円

研究成果の概要(和文)：3次元培養下の野生型マウス腸管オルガノイドに対して、レンチウイルスで遺伝子導入を行うことで細胞レベルでも大腸多段階発がんが再現可能であることを以前報告した。そこで、本発がんモデルを利用して大腸発がんメカニズムの解明を目指した。具体的には、大腸がんでも最も変異頻度が高いApcやKrasのコンディショナルマウス由来のオルガノイドを用い、Cre遺伝子を導入することで遺伝子変異を再現した上で、大腸がんでも変異頻度が高い遺伝子の shRNAを導入して協調的に発がんを促進するか検討を行った。また、食事由来発癌物質などの環境要因との相互作用も検討に加え、段階的な発がん過程の進展が再現されることを確認した。

研究成果の概要(英文)：We have previously demonstrated that multi-step intestinal tumorigenesis can be recapitulated by lentivirally introducing genetic aberrations into murine intestinal organoids. By using this cell-based model, we aimed at elucidation of molecular mechanisms underlying colon carcinogenesis. Specifically, we isolated small intestines from conditional knockout or knock-in mice for Apc and mutant Kras, respectively, and transduced organoids with Cre-recombinase to achieve in vitro recombination. We investigated if RNAi-mediated inactivation of genes frequently mutated in colon cancer could cooperate towards tumorigenesis with Apc loss or Kras activation, by inoculating transduced organoids in dorsal skin of immunodeficient mice, and gained new insights into impacts of these genes. We also administered food-borne carcinogens to organoids, to see environmental factors could indeed affect tumorigenesis. These observations would likely highlight the relevance of this new model.

研究分野：分子腫瘍学

キーワード：発がん 大腸がん オルガノイド 3次元培養

1. 研究開始当初の背景

従来の大腸がん研究では特定の遺伝子の発がんおよびがん化の進展への関与は、がん細胞株・繊維芽細胞を用いた細胞レベルの解析、あるいは遺伝子改変マウスや発がん物質を用いた個体レベルの解析、のいずれかを通じて明らかにされることが一般的であった。しかし、こうした手法には多大な時間や労力を要する点や、厳密には遺伝性のがんのモデルに相当してしまうなどの難点があった。これに対し、申請者は野生型マウス正常腸管細胞を用いた細胞レベルの発がんモデルを世界で初めて開発し、APC 遺伝子の不活性化による大腸多段階発がん過程が細胞レベルでも短期間かつ簡便に再現可能であることを報告し (Onuma et al., *PNAS*, 2013) 「腸管発がんの in vitro 再構成法」と命名した。

2. 研究の目的

本研究では、本モデルの改良と応用可能性の検討を並行して行うことを目的とする。改良に関しては、APC の不活性化の代替法の開発、APC 非依存的な発がん過程の再構成、ヌードマウス皮下腫瘍以外の発がん性評価法の確立が挙げられる。応用に関しては、大腸発がん分子機構の解明、特に新規変異遺伝子の発がん性検証および実験系への環境要因の統合に焦点を当てて、本モデルの可能性を明らかにしていく。

3. 研究の方法

(1) 腸管発がんの in vitro 再構成法：野生型の C57BL/6J マウスおよび $Kras^{LSL-G12D/+}$ マウス、 $Apc^{flox/flox}$ マウス由来の小腸を実験に供した。5-10 週齢のマウスから小腸を採取した後にオルガノイド培養を行った。レンチウイルスを用いて種々のがん抑制遺伝子に対する shRNA や Cre 遺伝子を導入し、標的遺伝子のノックダウンや遺伝子組換えを誘導した。組換えはゲノム DNA の PCR により確認し、ノックダウン効率は Western Blotting で評価した。 5×10^5 個程度の細胞を含むオルガノイドを 50% マトリゲルに懸濁してヌードマウス皮下に接種し、6-8 週間後に解剖して腫瘍形成能を検討した。

(2) 皮下腫瘍の解析：ホルマリン固定したのちに通常の H&E 染色や各種免疫染色等を行った。また、腫瘍の一部を採取して再び 3 次元培養を行い、各種解析に供した。

4. 研究成果

(1) $Apc^{flox/flox}$ マウス由来小腸を用いて作成した $Apc^{-/-}$ オルガノイドによる腫瘍形成：当初のモデルでは shApc の 5 つの独立したクローンをプールした上で小腸オルガノイドに導入し APC のノックダウンを達成していた。こ

れは、繊維芽細胞においては個々の shRNA を導入後も増殖が継続するのに対し、小腸オルガノイドではいずれも増殖が停止して培養の継続が困難となったためである。原因としては APC のノックダウンにより myc の発現が増加して、増殖と同時にアポトーシスのシグナルが増強したことが考えられた。しかし、プールした shRNA でのみ増殖が可能になる場合、厳密には off target 効果により生じている現象である可能性が否定できない。そこで、Apc コンディショナルノックアウトマウスを新たに導入し、再検討を行った。最初に導入したマウスは何らかの事情によりヘテロとホモが genotyping により区別不可能なマウスであることが判明したため、truncating mutation を再現する $Apc^{580S\ flox}$ マウスを別途導入した。小腸オルガノイドに Cre を導入後もオルガノイドは増殖を続け、shApc により完全長をノックダウンした場合は異なる結果となった。このオルガノイドをヌードマウス皮下に接種したところ、ごく小さな腫瘍を形成するのみであったが、shp16 や shPten を追加導入することで、充実性の小腫瘍が誘導された。組織学的には腺癌相当であり、かつ腺管の崩壊像や粘液貯留など、shApc の導入により得られた腫瘍と基本的に同様の組織像を呈することを見出した。従って、shApc のクローンをプールして得られた以前の腫瘍は遺伝子改変マウス由来の腫瘍とほぼ同等のものであり、off target 効果が関与している可能性は低いと考えられた。

(2) $Kras^{LSL-G12D/+}$ マウス由来小腸を用いて作成した $Kras^{G12D/+}$ オルガノイドによる腫瘍形成：すでに $Kras^{G12D/+}$ 小腸オルガノイド自体では腫瘍形成能はなく、前癌病変である aberrant crypt foci に類似した病変を一過性に誘導するのみであることを報告していたが、shp16 や shPten を追加導入することで、充実性の小腫瘍を形成することを確認した。組織学的には、一部 serrated polyp 類似の病変を認め、shApc により得られる腫瘍とは異なる組織像を呈することが判明した。このことから、Apc 不活性化に非依存的な発がん過程に関しても本実験系で再現可能であることが確認された。

(3) 新規大腸がん関連遺伝子の発がん性検証：近年の次世代シーケンシング技術の進歩により大腸がんにおける遺伝子異常の全貌が明らかになりつつある。変異頻度が高く、かつ遺伝子改変マウスによる解析が進んでいない遺伝子として WTX に着目し、shRNA を小腸オルガノイドに導入した。2 つの別々のクローンにおいて、いずれも導入直後に強い増殖抑制効果が認められた。また、こうした効果は NIH3T3 細胞や胃オルガノイドに対して

も認められたことから WTX 遺伝子の発現抑制は非腫瘍細胞には増殖抑制的に作用することが示唆された。一方で、WTX 遺伝子変異は Apc 遺伝子変異と共存することが多いことが知られていることから、両者の間には発がんへの協調作用が存在することが示唆されている。そこで、Apc^{-/-}小腸オルガノイドを用いて同様の実験を行ったが、やはり強い増殖抑制効果が見られるのみで、Apc 遺伝子変異と WTX 遺伝子変異が発がんへの協調作用を示すためには、第3の変異の存在が必要となる可能性が想定されたため、現在他の遺伝子の shRNA を系統的に導入し、発がん性への影響を検討している。

(4)大腸発がん物質 PhIP のマウス小腸オルガノイドを用いた発がん性検出：食事由来の大腸発がん物質として知られる PhIP amino-1-methyl-6-phenylimidazo [4,5-*b*]はこれまでにラットへの投与で大腸がんを誘発することが知られているが、マウスへの投与では先にリンパ腫を発症してしまうため、腸管発がんへの影響を検出することは困難だった。本実験系は臓器別に発がん性の検証が可能な利点を生かして、shApc あるいは shLuc を導入後のオルガノイドに対して PhIP を短期間暴露してヌードマウス皮下に接種したところ、shApc 導入オルガノイドの場合のみ腫瘍径の増大および組織像の悪性化が見られた。このことは、本実験系を用いることで、Apc 不活性化と PhIP による遺伝毒性の発がん協調性が高感度に検出可能であることを示しており、遺伝子異常以外の要因も統合可能であることを示唆すると考えられた。

(5)炎症細胞との共培養による発がん促進作用の検出：大腸発がんにおいては炎症が重要な働きをしていることはよく知られている。そこで、腹腔内で異物刺激により誘導された炎症細胞と共培養することで発がんが促進されるか検討を行った。shApc 導入小腸オルガノイドに対して、炎症細胞に数時間暴露した場合と無処理の場合について、ヌードマウス皮下に移植して比較したところ、炎症細胞暴露後のオルガノイドからのみ充実性の腫瘍が得られた。再び培養を行ったのちにオルガノイドを用いてマイクロアレイ解析を行ったところ、炎症関連の遺伝子の発現が上昇していることが確認され、特に Stat3 の下流の遺伝子が多数上昇していることを見出した。Western blotting を行ったところ、Stat3 の発現上昇およびリン酸化の亢進が認められた。Stat3 の転写は Stat3 のリン酸化そのものによって制御されていることから、ポジティブフィードバックによりさらに Stat3 の発現が上昇していると考えられた。また、こ

れらのオルガノイドの長期培養により、Stat3 の発現レベルは低下したことから、こうした変化は主にエピジェネティックな変化に基づくものであり、IL6 などのサイトカインの存在する皮下組織における間質との相互作用によりこうした変化が誘導されたと考えられた。このように、in vitro の実験系ではあるものの、環境要因も統合したかたちでの解析が可能であることが強く示唆された。

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7件)

- (1) Kangawa Y, Yoshida T, Maruyama K, Okamoto M, Kihara T, Nakamura M, Ochiai M, Hippo Y, Hayashi SM, Shibutani M. Cilostazol and enzymatically modified isoquercitrin attenuate experimental colitis and colon cancer in mice by inhibiting cell proliferation and inflammation. *Food Chem Toxicol.* 100:103-114. 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
- (3) Maru Y, Orihashi K, Hippo Y. Lentivirus-based stable gene delivery into intestinal organoids. *Methods Mol Biol*, 1422:13-21. 2016
- (4) Takahashi T, Ohnishi H, Sugiura Y, Honda K, Suematsu M, Kawasaki T, Deguchi T, Fujii T, Orihashi K, Hippo Y, Watanabe T, Yamagaki T, Yuba S. Non-neuronal acetylcholine as an endogenous regulator of proliferation and differentiation of Lgr5-positive stem cells in mice. *FEBS J.* 281(20): 4672-90.
- (5) Higurashi T, Endo H, Uchiyama T, Uchiyama S, Yamada E, Ohkubo H, Sakai E, Takahashi H, Maeda S, Wada K, Natsumeda Y, Hippo Y, Nakajima A, Nakagama H. Conditional knockout of the leptin receptor in the colonic epithelium revealed the local effects of leptin receptor signaling in the progression of colonic tumors in mice. *Carcinogenesis.* 35(9):2134-41. 2014
- (6) Ochiai M, Hippo Y*, Izumiya M, Watanabe M, Nakagama H. Newly Defined Aberrant Crypt Foci as a Marker for Dysplasia in

the Rat Colon. *Cancer Sci.* 105(8):943-50. 2014 (* corresponding author)

- (7) Igarashi M, Hippo Y*, Ochiai M, Fukuda H, Nakagama H. AKT is critically involved in cooperation between obesity and the dietary carcinogen amino-1-methyl-6-phenylimidazo [4,5-*b*] (PhIP) toward colon carcinogenesis in rats. *Biochem Biophys Res Commun.* 443(3):852-7. 2014 (* corresponding author)

〔学会発表〕(計 13 件)

- (1) 加藤護、新井康仁、小野華子、宮本文、古川英作、成島大智、中村浩美、アスマエルザワハリ、筆宝義隆、柴田龍弘(英語口演)。一細胞シークエンスが明らかにする、マウスモデルの腫瘍進展におけるゲノムおよびトランスクリプトームのダイナミクス。第 75 回日本癌学会学術総会(横浜) 2016 年 10 月
- (2) 落合雅子、松浦哲也、中釜斉、筆宝義隆、今井俊夫。マウス正常大腸上皮細胞の 3 次元培養による *in vitro* 発がんモデルの開発。第 75 回日本癌学会学術総会(横浜) 2016 年 10 月
- (3) 落合雅子、松浦哲也、筆宝義隆、今井俊夫。マウス正常大腸上皮細胞の 3 次元培養による *in vitro* 発がんモデルの開発-化学発がん・予防研究への応用に向けてがん予防学術大会 2016 (名古屋) 2016 年 7 月
- (4) 丸 喜明、松浦 哲也、落合 雅子、筆宝 義隆。3 次元培養法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
- (5) 落合雅子、松浦哲也、中釜 斉、今井俊夫、筆宝義隆。マウス正常腸管上皮細胞の 3 次元培養系を用いる発がん再構成系に対する PhIP の修飾作用。第 74 回日本癌学会総会(名古屋) 2015 年 10 月
- (6) 落合雅子、松浦哲也、中釜 斉、筆宝義隆、今井俊夫(口演)マウス正常腸管上皮の 3 次元培養法を用いる発がん再構成系に対する PhIP の修飾作用。第 30 回発がん病理研究会(小豆島) 2015 年 8 月
- (7) 落合雅子、松浦哲也、中釜 斉、筆宝義隆、今井俊夫。正常上皮細胞の 3 次元培養による *in vitro* 発がんモデルの開発 - 化学発がん・予防研究への応用に向けて。第 22 回日本がん予防学会(さいたま) 2015 年 6 月
- (8) 筆宝義隆。マウス初代培養細胞を用いた発がんの *in vitro* 再構成」第 2 回細胞凝集研

究会(福岡) 2014 年 12 月

- (9) 筆宝義隆。3 次元初代培養を用いた発がん過程の再現と個別化医療への応用。平成 26 年度千葉県がんセンター臨床研究総合センターシンポジウム(千葉) 2014 年 12 月
- (10) Masashi Izumiya, Masako Ochiai, Masatoshi Watanabe, Hitoshi Nakagama, Yoshitaka Hippo. Newly Defined Aberrant Crypt Foci as a Marker for Dysplasia in the Rat Colon. 第 73 回日本癌学会総会(横浜) 2014 年 9 月
- (11) Kaoru Orihashi, Tetsuya Matsuura, Masako Ochiai, Toshio Imai, Hitoshi Nakagama, Yoshitaka Hippo. In vitro reconstitution of Kras-dependent tumorigenesis in the intestine and the stomach. 第 73 回日本癌学会総会(横浜) 2014 年 9 月
- (12) Yoshitaka Hippo. (招待講演:がん研究入門コース) Three-dimensional Cell Culture for Cancer Research. 第 73 回日本癌学会総会(横浜) 2014 年 9 月
- (13) 筆宝義隆。マウス初代培養細胞での遺伝子異常再構成による多段階発がん過程の再現。第 18 回日本がん分子標的治療学会学術集会(仙台) 2014 年 6 月

〔図書〕(計 0 件)

〔産業財産権〕

出願状況(計 0 件)

取得状況(計 0 件)

〔その他〕

【研究所ホームページ】

<http://www.pref.chiba.lg.jp/gan/kenkyujo/index.html>

【がん研究分野の特性等を踏まえた支援活動による研究紹介】

<http://ganshien.umin.jp/research/spotlight/hippo/>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

筆宝 義隆 (HIPPO, Yoshitaka)

千葉県がんセンター研究所・発がん制御研究部・部長

研究者番号: 30359632

(2) 研究分担者

落合 雅子 (OCHIAI, Masako)

国立がん研究センター研究所・動物実験部門・主任研究員

研究者番号: 90150200