

## 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：82606

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2014～2016

課題番号：26430134

研究課題名(和文) マウス初代培養細胞を用いた肺腺がんの遺伝的再構成

研究課題名(英文) Lung carcinogenesis by genetic reconstitution using organoids derived from normal lung in mice

研究代表者

落合 雅子(Ochiai, Masako)

国立研究開発法人国立がん研究センター・研究所・主任研究員

研究者番号：90150200

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,000,000円

研究成果の概要(和文)：マウス肺由来正常3D培養細胞を用いた遺伝的再構成(レンチウイルスによるがん抑制遺伝子shRNA等の遺伝子導入)によるin vitro肺発がんモデルの構築を目指した。培養条件を検討し、シグナル伝達関連因子の阻害剤XとII型肺胞上皮細胞の誘導効果を持つ成長因子Yを添加した無血清培地に決定した。化学物質の肺発がん性のin vitro評価系への応用では、肺発がん性物質Cを陽性対象として、化学物質暴露と組合せた既存の細胞生存性試験による用量設定が可能だった。複数回暴露後に、ヌードマウス皮下腫瘍の異型性の進展を認め、異型性の変化が発がん性評価の指標となりうることを示した。

研究成果の概要(英文)：We aimed to establish the 3D-cultured cells (organoids) from normal lung tissues in mice and to construct an in vitro model of lung carcinogenesis using genetic reconstitution, which is transduction by shRNAs of tumor suppressor genes (TSG) using lentivirus. From the examination of culture conditions, it was suitable for lung organoids culture to the addition of inhibitor X related to a signal transduction and growth factor Y with proliferative effect for alveolar cells type II. These organoids with transduction of TSG shRNAs were injected to nude mice subcutaneously and developed tumors. In application to in vitro evaluation system of lung carcinogenesis by chemicals, lung carcinogen C as positive control is possible dose setting in the combination to chemical exposure. After multiple exposures, it was formed subcutaneous tumor in nude mice and it was shown to dysplastic features. It is indicated that dysplastic changes can be an marker for carcinogenic potentials of chemicals.

研究分野：環境発がん

キーワード：正常肺3D培養 in vitro肺発がんモデル

## 1. 研究開始当初の背景

### (1) ヒト肺がんの遺伝子変異について

肺がんは患者数が最も多いがんの一つで、肺がんの多くは腺がんである。ヒト肺腺がんの発生には、特定の遺伝子変異のドライバー変異が重要な働きをしており、中でも EGFR/RAS 経路の遺伝子変異は 35~55% と高い。この経路の主な遺伝子変異である KRAS 変異は、肺腺がんにおいて発がんの早期段階から重要な働きをしていると考えられている。

### (2) マウスを用いた肺発がんモデル

肺発がんの分子機構の解明のために、Kras 変異マウスとの交配マウスを中心に、種々の遺伝子改変動物を用いた肺発がんモデルが構築されている。しかし、肺腺がんに特徴的な多種類の遺伝子変化が報告されており、今後も多くの遺伝子候補が見つかることが予想される。これらの多様な遺伝子変異に対応した遺伝子改変動物を作成するには、多大な時間と労力が必要である。

### (3) マウス正常小腸の 3 次元培養法を用いた「*in vitro* 発がん再構成」

マウスの腸管細胞では、正常小腸 3 次元 (3D) 培養法が Sato T らにより報告された。これを応用し、レンチウイルスによる遺伝子導入 (遺伝的再構成) と組み合わせ、ヌードマウスでの皮下腫瘍形成能を確認する「*in vitro* 発がん再構成」の手法を確立した (Onuma K et al., 2013)。

### (4) 肺での 3D 培養の現況

腸管での培養条件を改変し、気道上皮細胞主体ではあるが、肺でも 3D 培養が可能であることを見出した。LSL-Kras<sup>G12D</sup> マウス由来正常肺 3D 培養細胞への Cre recombinase (Cre) 導入による変異 Kras のみでは、皮下腫瘍は過形成までしか誘導されないが、更に、複数の癌抑制遺伝子のノックダウンの追加により、1 種類 (shGeneA) で異形成、2 種類 (shGeneA + shGeneB) で腺がんが誘導された。

## 2. 研究の目的

本研究では、「*in vitro* 発がん再構成」の手法をマウス肺に応用して、正常肺 3D 培養細胞を用いた遺伝的再構成による *in vitro* 肺発がんモデルを構築し、モデルとして確立することを目指す。確立したこのモデルを用いて、肺発がんの分子機構の解明のために、GWAS 等から抽出されたがん遺伝子候補の発がんへの影響の解析や、遺伝的再構成で誘導した発がん早期段階の細胞を用いた遺伝子発現解析から発がん関連要因の候補の探索を行う。また、細胞への化学物質の暴露と組み合わせ、化学物質の肺発がん性の *in vitro* 評価系の構築への応用を検討する。

## 3. 研究の方法

### (1) マウス肺正常組織を用いた 3 次元培養の培養条件の検討

マウス肺正常組織を用いた 3 次元培養及び遺伝的再構成

肺組織を摘出後に、コラゲナーゼ・ディスパーゼ処理を行い、組織を細分化し、マトリゲル上に播種して、培養を開始した。細胞が増殖したら、継代を行い、約 5 回継代を繰り返す。ほとんどが、球形構造のオルガノイドのみとなったものを用いた。

がん抑制遺伝子の shRNA をレンチウイルスにより 3D 培養細胞に導入し、その遺伝子発現を抑制した (遺伝的再構成)。遺伝的再構成を行った 3D 培養細胞は、ヌードマウス皮下に移植し、3~8 週間後に腫瘍を採取し、組織学的解析を行った。

LSL-Kras<sup>G12D</sup> マウスは、Jacks T らにより開発された、Kras 変異を持つマウスであるが、この変異遺伝子は通常は静的状態にいたるが、Cre recombinase (Cre) が作用すると、Kras 変異が活性化される。このマウスから、肺 3D 培養細胞を調製し、Cre を導入する遺伝的再構成により、Kras が活性化された 3D 培養細胞を得た。

### 3D 培養の培養条件の検討

3D 培養時に用いる培地に関して、多様な細胞種の培養を可能にする培養条件を検討した。EGF 添加の無血清培地を基本とし、種々のシグナル伝達関連因子及び増殖因子を添加して、細胞増殖への影響及びヌードマウスでの腫瘍形成能を検討した。

### (2) 化学物質の肺発がん性の *in vitro* 評価系への応用

陽性対象とした化学物質は、大気汚染物質であり、タバコ煙に含まれる肺発がん物質 C である。C は、変異原性試験で、代謝活性化のための S9 mix を必要としており、肺 3D 培養細胞と化学物質の暴露時にも、S9 mix を添加することにした。

### 化学物質の暴露用量の検討

既存の 96 穴プレートを用いる細胞生存性試験を用いた。この試験は、試薬添加後、少なくとも 3 日間は、測定可能な系である。

### 複数回暴露による解析

上記の試験で、暴露用量を決定後、C57BL/6J マウス由来の細胞もしくは、遺伝的再構成を行った細胞に、陽性対象物質 C を暴露させ、継代ごとに暴露を行った。計 3 回暴露後に、ヌードマウスでの腫瘍形成能を検討した。

## 4. 研究成果

### (1) マウス肺正常組織を用いた 3 次元培養の条件検討

あるシグナル伝達関連因子の阻害物質である低分子化合物 X を添加して培養し、遺伝的再構成を行った後に、ヌードマウス皮下での腫瘍形成能を解析した。Kras を活性化後に、癌抑制遺伝子の発現を抑制する遺伝的再構成を行うと、腫瘍が形成された。更に、低分子化合物 X の種々な濃度、及び II 型肺胞上皮細胞の誘導が報告されている成長因子 Y の有無で培養し、3D 培養細胞の形態の組織学的解析から、条件検討を行った。Y の添加により、細胞増殖が昂進するとともに、II 型肺胞

上皮細胞のマーカーが陽性の細胞数が増加した。X を低濃度で添加した条件で再検討した結果、ヌードマウス皮下での腫瘍形成能及び異型度に関して、Kras の活性化のみでは、異型性を獲得せず、Kras の活性化 + 癌抑制遺伝子 A の発現抑制(shRNA による)で、異型性を獲得することを見出し、この培養条件を用いることにした。

(2)化学物質の肺発がん性の *in vitro* 評価系への応用

この応用には、用量設定が重要であり、簡便な試験法を検討した。

化学物質の暴露用量の検討

経時的変化も観察可能な、既存の 96 穴プレートを用いる細胞生存性試験が、マトリゲルを基材とする肺 3D 培養細胞にも応用可能なことを見出した。陽性対象物質 C に 24 時間暴露させ、培地交換後に測定用試薬を添加し、3~5 日間測定した。陰性対象と比較して、化学物質 C は、用量依存的に細胞生存性に影響を与えた。

複数回暴露による解析

上記の試験で、陽性対象物質 C の用量を決定し、今回は、遺伝的再構成を行っていないマウス肺 3D 培養細胞を用いた。陽性対象物質 C を、細胞に、継代ごとに暴露させ、計 3 回暴露させた後に、ヌードマウス皮下での腫瘍形成を解析した。未処理の肺 3D 培養細胞も、皮下に単層の円形腺管構造で残存するが、C を暴露させた場合には、構造が多層となり、また不定形となる。腺管周囲にも上皮由来細胞の浸潤が認められ、異型性の憎悪が認められた。*In vitro* 肺発がんモデルでの化学物質の発がん性評価の指標の一つとして、異型性の変化が有効であることが示された。

(3)考察及び今後の課題

*in vitro* 肺発がんモデルを構築し、化学物質の肺発がん性の *in vitro* 評価系の構築へと応用可能な可能性を示した。後者に関しては、遺伝的再構成を行った細胞は、発がん段階が進展していると考えられ、高感受性細胞として使用できる可能性がある。

しかし、「肺発がんの分子機構の解明のために、GWAS 等から抽出されたがん遺伝子候補の発がんへの影響の解析」や、「遺伝的再構成で誘導した発がん早期段階の細胞を用いた遺伝子発現解析から発がん関連要因の候補の探索」に関しては、着手することができなかった。この点では、課題の進行が遅れていたと

アデノウィルスを用いて肺への遺伝子導入を行うマウス動物モデルでは、より少ない遺伝子変化で、肺発がんすることが報告されているが、これらの系では、炎症を伴っている。動物個体を用いる発がんモデルにおいては、炎症等が影響すると考えられるが、この 3D 培養細胞系において、炎症等の影響を加えることは、まだ、成功していない。動物個体の発がんにおいては、炎症やストレスが多大な影響を与えられ、今後は、この 3D

培養細胞系への炎症等の影響を加える方法の開発が重要と考える。

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 0 件)

[学会発表](計 7 件)

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 2 日、名古屋大学(愛知県・名古屋市)

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、2016 年 10 月 7 日、パシフィコ横浜(神奈川県・横浜市)

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、がん予防学術大会 2015 さいたま、2015 年 6 月 5 日、ラフレさいたま(埼玉県・さいたま市)

落合雅子、松浦哲也、中釜 斉、筆宝義隆、今井俊夫、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 回発癌病理研究会、2015 年 8 月 28 日、ホテルオリビアン小豆島(香川県・土庄町)

落合雅子、中釜 斉、マウス正常上皮細胞の 3 次元培養法を用いる *in vitro* 発がんモデルの開発、日本環境変異原学会第 44 回大会、2015 年 11 月 27 日、九州大学(福岡県・福岡市)

落合雅子、折橋 郁、松浦哲也、今井俊夫、中釜 斉、筆宝義隆、マウス肝臓初代培養細胞を用いた新規肝内胆管モデルの確立、第 29 回発癌病理研究会、2014 年 9 月 1 日~3 日、スパリゾートハワイアンズ(福島県・いわき市)

落合雅子、折橋 郁、松浦哲也、今井俊夫、中釜 斉、筆宝義隆、マウス肝臓初代培養細胞を用いた新規肝内胆管モデルの確立、第 73 回日本癌学会学術総会、2014 年 9 月 26 日、パシフィコ横浜(神奈川県・横浜市)

[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]

ホームページ等

<https://www.nccri.ncc.go.jp/s029/010/010/20151216104229.html>

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

落合 雅子 (OCHIAI, Masako)  
国立研究開発法人 国立がん研究センター  
ー 研究所 主任研究員  
研究者番号：90150200

### (2) 研究分担者

筆宝 義隆 (HIPPO, Yoshitaka)  
国立研究開発法人 国立がん研究センター  
ー 研究所 客員研究員  
研究者番号：30359632