

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 6 月 2 日現在

機関番号：82504

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2014～2015

課題番号：26670391

研究課題名(和文) マウス初代培養細胞を用いた膵管がんの遺伝的再構成

研究課題名(英文) Genetic reconstitution of pancreatic ductal carcinogenesis with murine primary cells

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) 2,800,000円

研究成果の概要(和文)：膵発がんにおいてはKrasの活性化変異が最も初期の変化であり、その後に様々ながん抑制遺伝子の機能的失活が起こる。我々は以前マウスの腸管オルガノイドでApcをノックダウンすることでは直接発がんが誘導可能であることを報告したが、今回同様の手法を膵臓オルガノイドに適用した。具体的にはLSL-KrasG12Dマウス由来の膵臓オルガノイドに対しレンチウイルスでCreを導入して組み換えによりKrasG12Dアレルの発現を誘導し、がん抑制遺伝子に対するshRNAを追加導入することで腺癌類似の組織像を呈する皮下腫瘍をヌードマウスに誘導することに成功した。本モデルは膵癌研究の様々な分野での有用性が期待される。

研究成果の概要(英文)：In the multistep carcinogenesis of pancreatic ductal adenocarcinoma (PDAC), activation of Kras is an initiating event in most cases, which is followed by inactivation of other highly mutated tumor suppressor genes (TSGs) such as p16, p53, or SMAD4. As we previously demonstrated that murine primary intestinal organoids could be transformed by suppression of Apc, we took a similar approach to model PDAC. We activated Kras by lentivirally introducing Cre in pancreatic organoids in 3-D culture, which resulted in development of small nodules containing a few atypical glands in nude mice. But solid tumors with invasive and dysplastic features were induced by transducing Kras-activated organoids with shRNAs against major TSGs, clearly indicating that in vivo microenvironment is indispensable for tumor development. This model would likely accelerate PDAC research in many aspects.

研究分野：分子腫瘍学

キーワード：膵臓癌 モデル 3次元培養 発がん

1. 研究開始当初の背景

膵がんは難治がんであり、発がん機構の解明および革新的な早期診断・治療法の確立が喫緊の課題である。膵がんで頻度の高い遺伝子異常を膵臓特異的に再現した遺伝子改変マウスが疾患モデルとしてこれまで汎用されてきており、これまでに、膵がんモデルとして膵臓特異的な Kras 変異マウスが多数作成されている。Kras 変異単独では先天的に誘導されたものでも腫瘍形成には時間を要すること、しかし p53 や p16 などの主要ながん抑制遺伝子のノックアウトマウスと交配することで腫瘍化が大幅に促進化されること、などが明らかにされてきた。しかし、これらは生理的な環境における発がんを忠実に再現する利点がある一方で、上皮と間質に含まれる複数の細胞腫間の複雑な相互作用を分離して解析することが技術的に困難な点、また作成に時間と労力を要する点などが問題とされてきていた。そのため、より簡便かつ迅速な発がんモデルの構築が求められていた。

2. 研究の目的

我々は最近、マウス初代培養細胞を用いたヒト大腸発がん *in vitro* 再構成モデルを確立し発がん機構の解析や大腸がんの発がん関連遺伝子・治療標的遺伝子の検証への応用可能性が高い新規モデルとして注目を集めている (Onuma et al., 110(27):11127-32, PNAS, 2013)。そこで、本研究では難治がんの一つである膵管がんに対しても、同様のアプローチにより細胞レベルの新規発がんモデルを確立することを目的とした。

3. 研究の方法

Kras^{LSL-G12D/+}マウスより正常膵管細胞を単離、3次元培養を行った後にレンチウイルスで Cre

遺伝子を導入して *in vitro* で変異型 Kras の発現を誘導する。さらに、p53, p16, SMAD4 などの膵がんにおける主要ながん抑制遺伝子に対する shRNA を単独または組み合わせて追加導入し、ヌードマウス皮下での腫瘍形成が誘導可能か検討する。得られた皮下腫瘍は病理組織像より多段階発がんのどのステージに相当するか推定する。また、腺癌相当の病変を誘導する遺伝子変異の組み合わせを複数同定するために、膵がんで発現低下や変異頻度が高い他の遺伝子に対する shRNA の追加導入の効果も検証する。皮下腫瘍は再び 3 次元培養により上皮成分のみのオルガノイドとして精製し、浮遊培養でのスフェロイド形成能やヌードマウス皮下再移植による腫瘍形成能の評価を行う。

4. 研究成果

(1)膵管オルガノイドにおける Kras の活性化：レンチウイルスにより Cre-recombinase を導入し、組み換えを介した STOP コドンの除去により変異アレルの発現を誘導した。実際に恒常的活性化 Kras が発現していることをブルダウンアッセイにより確認した。しかし、このオルガノイドをヌードマウス皮下に移植してもほとんど腫瘍形成は認められず Kras 活性化のみでは発がんに不十分であることが示唆された。ただし、得られた腫瘍から回収した細胞を再び培養して Kras 遺伝子座の組み換え状態を調べたところ、STOP コドンに対応するバンドが完全に消失しており、腫瘍を形成しているすべての細胞で Kras 活性化が生じていることが判明した。この結果から、腫瘍形成には Kras 活性化が必要であること、また Kra 活性化細胞をあらかじめ濃縮して皮下移植することで腫瘍形成の促進が期待できることが示唆された。

(2) 恒常的活性化 Kras 発現オルガノイドの濃縮: Cre の導入による組み換えそのものは、オルガノイドのゲノム DNA に対する PCR において組み換え特異的バンドを検出することで確認可能だが、EGF 非含有メEDIUMで培養することにより STOP コドンに対応するバンドが消失し、Kras 活性化細胞が 100%まで濃縮可能であることが確認された。

(3) 活性化 Kras とがん抑制遺伝子の発現抑制による腫瘍誘導: 上記 Kras 活性化オルガノイドに対し、レンチウイルス shRNA を用いて膵癌で変異の頻度が高い p16, p53, SMAD4 などのノックダウンを行ったのちにヌードマウス皮下に移植したところ、高頻度で腫瘍が形成された。一方、Kras 活性化を行っていないオルガノイドはまったく腫瘍を形成しなかった。得られた腫瘍はしばしば嚢胞状の拡張を示し血性内容物を含んでいた。また、組織学的には腺癌に酷似しており、膵癌と同様の病変を誘導したと考えられた。ただし、shRNA の陰性コントロールである shLuc の追加でも Kras 活性化オルガノイドから腫瘍が形成される場合が多く、導入した遺伝子異常以外の変化が関与している可能性が示唆された。

(4) 膵発がん過程における野生型 Kras アレルの消失: Kras 活性化+ shLuc により誘導された皮下腫瘍を再び培養して純化したのちにゲノム PCR を施行したところ、高頻度で野生型 Kras アレルが消失していることが確認された。一方、微小の腫瘍由来のオルガノイドの場合にはこうした変化は認められなかった。野生型 Kras アレルの欠失は変異型 Kras を有する肺がんや膵癌で半数程度に生じることが報告されているが、これまでにこうした変化が自然に生じるモデルは皆無だった。また、数週間の短期間でこうした変化が生じるため、単なるゲノムの不安定性を反映している可能性

も低いと考えられる。したがって、野生型 Kras アレルの欠失に対する強い選択圧が作用する実験系として、本モデルはその分子機構の解析に有用である可能性が示唆された。

(5) Cre-recombinase による組み換えの効果の in vivo/in vitro の比較: 従来の膵癌モデルと我々のモデルの大きな違いは、Cre の発現による Kras の活性化とがん抑制遺伝子の欠失が in vivo の発生過程で生じるか、それとも成体由来の上皮細胞のみに対して in vitro で生じるかということにある。こうした Cre の効果を比較するために、膵癌モデルの中で最も進行が速く悪性度も高いとされる Ptf1a-Cre; Kras^{LSL-G12D/+}; TGFBR11^{f/f} マウスに自然発症した膵癌と、Kras^{LSL-G12D/+}; TGFBR11^{f/f} 由来膵臓オルガノイドに対して in vitro で Cre を導入して得られた皮下腫瘍について両者とも再び 3 次元培養を行いヌードマウスに皮下移植を行った。その結果、in vitro で Cre を導入した場合の方がより腫瘍径も大きく、増殖速度が速かった。このことは、従来モデルの膵癌は膵臓微小環境に大きく依存していることを示唆しており、本実験系を用いることで上皮と微小環境の協調作用がどの程度がん化に貢献しているか推定することが可能と考えられた。

(6) 考察: 本研究では、より単純な方法、すなわちマウスの膵管上皮初代培養細胞とレンチウイルスによる遺伝子導入のみにより、短期間で発がん過程が再現可能であることを示した。上皮細胞への体細胞変異を in vitro で模倣した本研究においても、発がん性に関しては個体レベルでの解析と同様の結果が得られたことから、上皮細胞における遺伝子変異の蓄積が膵臓がんの発がん過程を促進する主要な要素であることが強く示唆されると同時に、細胞レベルの簡便かつ迅速な膵管発がんモデ

ルとして有用な実験系になると考えられる。本研究で作成された細胞レベルの膵発がんモデルは、従来技術的に困難とされた早期病変の詳細な解析に道を開くものであり、発がん機構の解明のみならず早期診断マーカーの開発にも資する成果と考えられる。また、任意の遺伝子異常を擁する膵がん細胞株を短期間で作成可能なことから、治療標的の探索や分子標的治療薬候補物質の評価系としての利用にも応用が期待される。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計 1 件)

(1) Maru Y, Orihashi K, Hippo Y. Lentivirus-based stable gene delivery into intestinal organoids. *Methods Mol Biol*, in Gastrointestinal Physiology and Diseases, Methods and Protocols, in press

〔学会発表〕(計 7 件)

(1) Tetsuya Matsuura, Masako Ochiai, Toshio Imai, Yoshitaka Hippo. Induction of Pancreatic Ductal Adenocarcinoma from Primary Murine Pancreatic Cells 「個体レベルでのがん研究支援活動」ワークショップ(大津)2016年2月

(2) Tetsuya Matsuura, Kaoru Orihashi, Masako Ochiai, Hitoshi Nakagama, Toshio Imai, Yoshitaka Hippo. Direct transformation of primary murine pancreatic ductal cells in vitro (口演). 第74回日本癌学会総会(名古屋)2015年10月

(3) 筆宝義隆, 松浦哲也, 落合雅子, 今井俊夫, 折橋郁, 丸喜明(口演)「3次元初代培養を用いた膵管・胆道発がんモデルの確立」第30回発がん病理研究会(小豆島)2015年8月

(4) 松浦哲也, 筆宝義隆「マウス初代培養細胞による膵管がん発がん過程の再現」第19回日

本がん分子標的治療学会学術集会(松山)2015年6月

(5) Tetsuya Matsuura, Masako Ochiai, Kaoru Orihashi, Toshio Imai, Yoshitaka Hippo. Induction of Pancreatic Ductal Adenocarcinoma from Primary Murine Pancreatic Cells 「個体レベルでのがん研究支援活動」ワークショップ(大津)2015年2月

(6) Tetsuya Matsuura, Kaoru Orihashi, Masako Ochiai, Toshio Imai, Hitoshi Nakagama and Yoshitaka Hippo. Induction of Pancreatic Ductal Adenocarcinoma from Primary Murine Pancreatic Cells. 第73回日本癌学会総会(横浜)2014年9月

(7) 松浦哲也, 筆宝義隆. マウス初代培養細胞による膵管がん発がん過程の再現. 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〕

ホームページ等

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

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・発がん制御研究室・部長

研究者番号: 30359632

(2)研究分担者

なし

(3)連携研究者

なし

