

# マウスおよび患者由来オルガノイドを用いたモデルによる発がん分子機構の解明と治療戦略の構築

Yoshitaka Hippo

Chiba Cancer Center Research Institute

がんは基本的に遺伝子の病気であり、正常細胞に変異が蓄積することで段階的に進展していく。こうしたがん化過程は従来個体レベルでの解析でのみ再現可能であり、実際に臓器特異的な遺伝子改変マウスの作成により発がん分子機構に関して多数の知見が蓄積されてきた。しかし、マウスモデルは生理的な環境での発がん過程が再現可能という大きな利点がある一方で、多数要素の相互作用のため解析が複雑になる、遺伝子改変マウスの作成に多大な時間と労力を要する、臓器および細胞種の特異性が必ずしも厳密ではない、などいくつかの問題点も指摘されていた。より簡便な細胞レベルの実験系としては、線維芽細胞 NIH3T3 細胞を用いた形質転換アッセイが発がん遺伝子の検出に汎用されているが、得られた結果が個々の臓器の上皮細胞における発がん性に外挿可能かは明らかではない。

一方、オルガノイド培養の登場により in vitro での正常幹細胞の長期間維持が可能となった。そこで、我々は「上皮細胞」と「遺伝子異常」という最小限の要素のみでも、臓器特異的微小環境に非依存的に発がん過程を再構成することが可能か検討した。まずレンチウイルスによるオルガノイドへの高効率な遺伝子導入法を確立し、次にそれを用いて野生型マウス腸管細胞への Apc 遺伝子および複数のがん抑制遺伝子に対する shRNA を組み合わせて導入した。その結果、ヒト大腸がんの多段階発がん過程がヌードマウス皮下腫瘍として短期間で再現可能であることを確認した。Kras 変異や Pik3ca 変異のコンディショナルアレルを持つマウス由来オルガノイドに対しても Cre 遺伝子の導入などにより同様の実験が可能だった。同じ遺伝子変異の改変マウスを用いた過去の発がんに関する研究結果が概ね再現されるなど新規発がんモデルとしての有用性が示唆されたことから、以後消化器系、婦人科系などの臓器に対して同様の手法で発がんモデルの作成を進めている。マウスモデルでの結果と比較することで遺伝子変異や臓器ごとに微小環境の関与がどの程度重要か洞察が得られ、また同一遺伝子異常でも臓器により腫瘍の組織型や発がん性が異なるなどエピゲノムの違いが発がん性に及ぼす影響も見出している。

こうした研究の過程で蓄積した技術的ノウハウをもとに、最近では患者由来検体のオルガノイド培養を進めている。特に、手術不能な胆膵領域進行がんで生じる胆管閉塞に対する内視鏡治療で得られた胆汁検体や、研究があまり進んでいない婦人科がんの手術検体についてもオルガノイド培養法の最適化を行った。得られたオルガノイドは基本的に元の腫瘍の多様性や様々な性質が保持されていることを確認し、オルガノイドに対する各種抗がん剤の効果と臨床データの比較を現在進めている。また、多数検体の培養を行う過程で偶然遭遇した膵臓や子宮の希少がん症例についても世界初のオルガノイド培養に成功しており、今後様々な研究への利用が期待される。今回患者由来オルガノイドをヌードマウス皮下に移植した場合、ゼノグラフト形成率はいずれのがん種でも 20-40% 程度だったことから、PDX を最初から作成しようとした場合には失っていた可能性が高い腫瘍検体の多くが、オルガノイド培養では増殖可能だったことになると推定される。

同一臓器に関してマウス正常細胞から作成した腫瘍オルガノイドと患者由来腫瘍オルガノイドは、ゲノム配列の個体差、環境への暴露歴、変異の蓄積量などで差が大きいもののいずれも相互に比較可能な優れた疾患モデルであり、これらのがん種の発症機構の解明や治療戦略の構築に有用なリソースとなることが期待される。

## 研究助成

- 2005年 上原記念財団海外留学助成金 リサーチフェローシップ
- 2013年 日本膵臓病研究財団 膵臓病研究奨励賞
- 2013年 高松宮妃癌研究基金 研究助成金
- 2014年 日本対がん協会 リレー・フォー・ライフ プロジェクト未来研究助成金
- 2014年 がん研究振興財団 研究助成金
- 2015年 内藤記念科学振興財団 内藤記念科学奨励金・研究助成

## 文献

1. Maru Y, Tanaka N, Ebisawa K, Odaka A, Sugiyama T, Itami M, Hippo Y. Establishment and characterization of patient-derived organoids from a young patient with cervical clear cell carcinoma. *Cancer Sci.* in press
2. Matsuura T, Maru Y, Izumiya M, Hoshi D, Kato S, Ochiai M, Hori M, Yamamoto S, Tatsuno K, Imai T, Aburatani H, Nakajima A, Hippo Y. Organoid-based ex vivo reconstitution of Kras-driven pancreatic ductal carcinogenesis. *Carcinogenesis.* in press
3. Maru Y, Hippo Y. Current Status of Patient-Derived Ovarian Cancer Models. *Cells.* 8(5). 2019
4. Maru Y, Tanaka N, Itami M, Hippo Y. Efficient use of patient-derived organoids as a preclinical model for gynecologic tumors. *Gynecol Oncol.* 154(1): 189-198. 2019
5. Ochiai M, Yoshihara Y, Maru Y, Tetsuya M, Izumiya M, Imai T, Hippo Y. Kras-driven heterotopic tumor development from hepatobiliary organoids. *Carcinogenesis.* in press
6. Maru Y, Onuma K, Ochiai M, Imai T, Hippo Y. Shortcuts to intestinal carcinogenesis by genetic engineering in organoid. *Cancer Sci.* 110(3):858-866. 2019
7. Sato T, Morita M, Tanaka R, Inoue Y, Nomura M, Sakamoto Y, Miura K, Ito S, Sato I, Tanaka N, Abe, Takahashi S, Kawai M, Sato M, Hippo Y, Shima H, Okada Y and Tanuma N. Ex vivo model of non-small cell lung cancer using mouse lung epithelial cells. *Oncology Lett.* 14: 6863-6868. 2017
8. 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
9. Maru Y, Orihashi K, Hippo Y. Lentivirus-based stable gene delivery into intestinal organoids. *Methods Mol Biol.* 1422:13-21. 2016
10. Onuma K, Ochiai M, Orihashi K, Takahashi M, Imai T, Nakagama H, Hippo Y. Genetic reconstitution of tumorigenesis in primary intestinal cells. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 110(27):11127-32. 2013



## 筆宝 義隆

千葉県がんセンター研究所 発がん制御研究部 部長

- 1994 東京大学医学部卒
- 1996 東京大学第三内科入局 (消化器グループ)
- 2000 東京大学大学院医学系研究科修了、医学博士
- 2002 東京大学先端科学技術研究センター 助手
- 2005 コールドスプリングハーバー研究所 博士研究員
- 2009 国立がん研究センター研究所 ユニット長
- 2014 千葉県がんセンター研究所 部長