

博士論文

マウス胆道系オルガノイドを用いた多段階発がん過程  
再構成モデルの確立

吉原 靖典

## 目次

要旨 .....	3
序文 .....	5
方法 .....	11
結果 .....	23
第 1 章  胆管オルガノイドに対するがん関連遺伝子導入	
第 1 節 <i>Kras</i> 活性化変異による腫瘍形成の検討	
第 2 節 <i>Kras</i> 活性化変異以外のがん遺伝子 ( <i>Pik3ca</i> , <i>FGFR2-AHCYL1</i> 融合遺伝子) による腫瘍形成の検討	
第 2 章  胆嚢オルガノイドに対するがん関連遺伝子導入	
総括	
考察 .....	66
結語 .....	73
謝辞 .....	74
引用文献 .....	75

## 要 旨

胆道癌に対する治療は、早期癌に対する手術療法を除いては根治的な治療法に乏しく、また進行癌に対する化学療法の有効性も十分とは言えない。新規の治療法の開発が強く望まれており、そのためには適切な疾患モデルが必要である。しかし、遺伝子改変マウスモデルの作製は費用と時間を要するものであり、胆道癌の遺伝子改変マウスモデルは限られている。さらに肝臓特異的な遺伝子改変マウスによる胆道癌モデルマウスでは、肝細胞癌等の胆道癌以外の発生もみられ、胆道癌特異的な解析は容易ではない。また、胆嚢特異的遺伝子ターゲティングは実現されていない。これらの課題を克服するため、本研究では近年発展のみられるオルガノイド培養技術を応用し、正常胆道上皮に癌関連遺伝子を導入することで *ex vivo* での胆道腫瘍誘導を試みた。すなわち、マウス正常胆管および胆嚢オルガノイドに対して、*Kras* 等の代表的な胆道癌関連変異遺伝子をレンチウイルスベクターによって導入し、免疫不全マウスの皮下に接種した。その結果、単一の変異遺伝子導入のみでは腫瘍は誘発されなかったが、変異型 *Kras* および *Trp53* 等の癌抑制遺伝子の不活化など複数の変異を組み合わせることで腫瘍の形成がみられた。この腫瘍は皮下という異所性環境であっても病理組織学的に胆道癌としての形態を示しており、正常、異形成、腺癌に至るまでの多段階発癌過程を示した。さらに肝内胆管癌のゲノム解析で変異が報告されている

*Pik3ca* および *FGFR2-AHCYL1* 融合遺伝子の胆道発癌における役割も評価したが、発癌作用は限定的なものであり、これら以外の遺伝子変異または肝微小環境も必要であると考えられた。結論として、胆道のオルガノイド初代培養細胞に癌関連遺伝子を導入して、マウス皮下に胆道腫瘍を形成させることが可能であることを示した。この手法は、胆道発癌モデルとして有用であると考えられる。

## 序 文

現在、本邦の平均寿命は男性 81.41 歳、女性 87.45 歳であり、それぞれ世界第 3 位、第 2 位であり代表的な長寿国である。その死因第 1 位は 1981 年以来、悪性新生物（がん）であり、年間 30 万人以上ががんで死亡している。

がんは、環境要因や生来の遺伝的要因により上皮細胞に遺伝子変異が蓄積されることで発生ならびに増大・促進される。そして、上皮細胞が存在する組織の微小環境中にある間質や免疫系細胞との相互作用を介して、エピジェネティックな変化による修飾も受ける[1][2]。従来、がん関連遺伝子による形質転換を評価するためにマウス線維芽細胞株である NIH3T3 細胞が広く使用されてきた[3][4][5]。すなわち、候補となる遺伝子断片を NIH3T3 細胞に導入、過剰発現させ、*in vitro* での ① focus formation assay による接触阻害の喪失（loss of contact inhibition）の評価、② 軟寒天培地を利用した soft agar assay による足場非依存性増殖能（anchorage-independent growth）の評価、あるいは *in vivo* での ③ 免疫不全マウスの皮下組織に候補遺伝子を導入した NIH3T3 細胞を移植し腫瘍形成性を評価することが一般的である。しかし、NIH3T3 細胞は胎児マウスの線維芽細胞由来であり、上皮細胞を含めた多様な細胞における発がんを評価するにあたり、その結果を一般化できるかどうかは不明確である。一方、その後開発された遺伝子ターゲティングアプローチにより、遺伝子改変マウ

ス (GEM, genetically engineered mouse) の作製が可能となった[6][7]。すなわち、特定の遺伝子を破壊 (ノックアウト) あるいは変異遺伝子で置換 (ノックイン) することで、がん関連の遺伝子変異を細胞レベルではなく個体レベルで評価することが可能となり、さらに複数の GEM を組み合わせることで多段階発がんの効率的な解明が可能となった。従来の胚性幹細胞 (ES 細胞) と相同組み換えを利用した GEM の作製には時間と労力を要していたが、近年 Crispr/Cas9 システムを用い、受精卵のゲノム編集を直接行う GEM 作製法が可能となり、GEM 作製の労力は少なからず低下した。しかしながら、何れにせよ GEM を用いた評価においては、個体での評価が可能であり、ヒトでの良いモデルとなりうることに引き換えに時間・コストの問題、上皮細胞以外との相互作用に起因する複雑性の問題、使用するマウス系統や実験条件に由来する再現性の問題、近年関心の高まっている動物福祉上の問題などを考慮する必要性が存在する。

細胞外基質 (ECM, extracellular matrix) である Matrigel® を用いた三次元オルガノイド培養は、生理的条件下で正常細胞の長期培養を可能にする新規の手法である[8]。Matrigel は、マウス肉腫細胞である Engelbreth-Holm-Swarm (EHS) mouse sarcoma cells が産生する ECM であり、基底膜の主成分であるラミニン、IV型コラーゲン、ヘパラン硫酸プロテオグリカン、エンタクチン (ニドゲン) のほか成長因子などを含む。従来の二次元平面細胞培養に比して、由来

となる組織の基本的形質をより保ちつつ、比較的簡便に行える非常に有用な手法のため、多くの研究分野に急速に拡大している。消化器がん分野においても、筆宝らはマウス腸オルガノイドを用いた発がん系について報告している[9][10]。すなわち、ヒト大腸がんを高頻度に認められる *Apc*, *Trp53* などの複数の遺伝子変異をレンチウイルスベクターにより正常なマウス腸オルガノイドへ導入し、それらをヌードマウスの皮下に接種することで、腫瘍形成を確認した。この実験系で評価した *Apc*, *Trp53*, *Pten* および *Kras* の遺伝子異常による腫瘍形成能は、単独あるいは複数の遺伝子変異の組み合わせにおいて GEM を用いた既報の結果と基本的に一致するものであった。さらに、免疫不全マウスの大腸(同所)ではなく、皮下(異所)であっても高頻度に腫瘍形成かつ組織学的に大腸がんと判定される腫瘍が形成されることが明らかとなり、オルガノイドを用いた発がん評価の有用性について示した[9][11]。これらの結果から同手法をより多くの他の臓器や遺伝子に適応することで、効率的な *ex vivo* 発がんモデルを作製できる可能性がある(表 1)。特に疾患モデルが少ない難治性がんにおいて、この手法が有用であると考えられた。

長所	短所
比較的短期間に低コストで発がんモデルを作製できること	腫瘍拒絶反応や臓器特異的な微小環境が存在しないこと
複数の遺伝子導入により、多段階発がん過程が簡便に再現できること	免疫不全マウスの皮下という異所性移植であること

表 1. 遺伝子改変マウスモデルと比較したオルガノイド発がんモデルの特徴

胆道がん (BTC, biliary tract cancer) は、消化液の一つである胆汁の分泌経路である胆道に生じるがんであり、解剖学的に肝内胆管がん (ICC, intrahepatic cholangiocarcinoma)、肝外胆管がん (ECC, extrahepatic cholangiocarcinoma) および胆嚢がん (GBC, gallbladder cancer) の 3 つのサブタイプに分類される。BTC の罹患率は世界的に増加しており、東南アジアと南アメリカで最も高い [12]。BTC の危険因子には、肝吸虫、胆道結石、ウイルス性肝炎、原発性硬化性胆管炎および膵・胆管合流異常などが挙げられる [13][14]。BTC の根治的治療は外科的切除であるが、早期発見は依然として困難である。さらに従来 of 化学療法の有効性は一般的に限られており、BTC に対する分子標的療法は確立されていない [14][15][16]。そのため、BTC 患者の予後は依然として不良である。最近のゲノム解析の進歩により BTC においてもヒト BTC ゲノム解析結果が報告されており、*TP53*, *KRAS*, *SMAD4*, *ARID1A* および *PIK3CA* のような既知の遺伝子変異の頻度が明らかになるとともに [17][18]、新規融合遺伝子が同定さ



れた（図 1）[4]。しかし、これらの遺伝子を標的として現在までに作製された ICC の GEM モデルはごくわずかである[14]。さらに、これらの GEM モデルのほとんどは胆道特異的ではなく主に肝細胞で発現しているアルブミン遺伝子のプロモーターと Cre リコンビナーゼを組み合わせた *Alb-Cre* によりがん関連遺伝子の誘導をしているため、ヒト ICC とは異なり、胎児の段階の肝臓でがん関連遺伝子が発現されることとなり、誘導された腫瘍は肝細胞癌（HCC, hepatocellular carcinoma）を高頻度に含んでいた[19][20][21][22][23]。また、GBC のモデルマウスに関しては、胆嚢以外に他臓器でも腫瘍または前癌病変の発生が観察されており[20][24][25]、これらが GBC 発症前の死因となる可能性がある。したがって、マウスモデルにおいて特定の方法で BTC を誘導することは依然として技術的課題である。

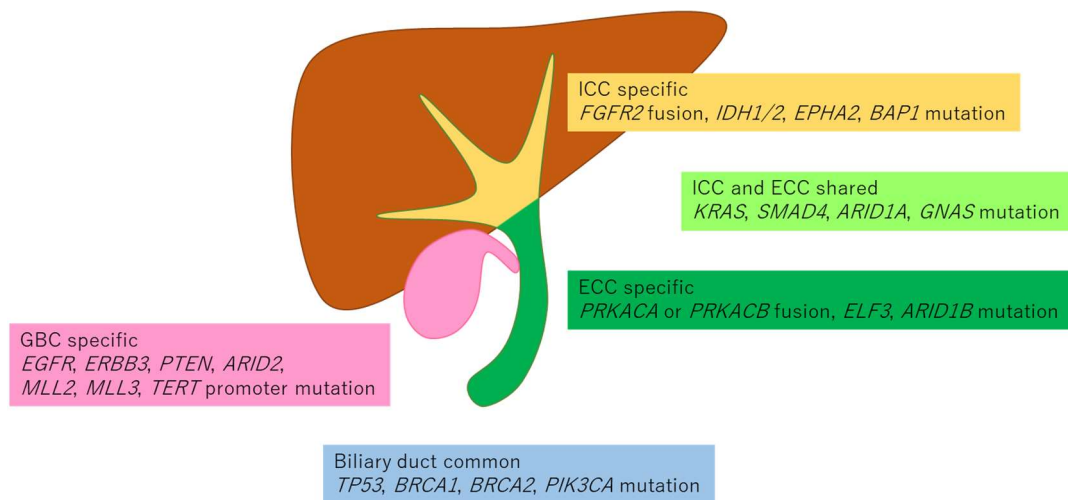


図 1. 胆道がんにおける主な遺伝子変異

肝内胆管がん (ICC)、肝外胆管がん (ECC)、胆嚢がん (GBC) のそれぞれに特異的な遺伝子変異および肝内・肝外胆管がん、胆道がん全般に共通する遺伝子変異を示す[17]。

本研究では、マウスから樹立した胆道オルガノイドへのがん関連遺伝子導入ならびに免疫不全マウスへの皮下（異所）移植を用いた手法により BTC の多段階発がんモデルの確立を目的とした[9]。本研究においては、マウス肝臓および胆嚢由来のオルガノイドに対して、変異型 *Kras* と主要ながん抑制遺伝子の不活化とが協調して、それぞれ ICC および GBC を急速かつ特異的に誘導し得ることを示した。しかし、*Pik3ca* などの *Kras* 以外のがん遺伝子ではそこまでの発がん作用は認められなかった。以上より、本研究は BTC の発がんメカニズムの解明およびその治療法開発において有意義な手法となりうると考えられる。

## 方 法

### 1. オルガノイド培養

3-5 週齢の野生型 C57BL/6J マウスより肝臓および胆嚢を摘出した。肝外胆管癌が生じる可能性がある総胆管を除去するため、肝臓の 1/4 を含む肝門部は除去した。摘出した組織は氷冷下で 2-3 mm の小片に刻み、氷冷した PBS で複数回洗浄した。組織から上皮細胞を回収するために、2 U/mL dispase II および 1 mg/mL collagenase P (Roche Diagnostics K.K., Tokyo, Japan) を用いて、37 °C で 30 分間酵素処理を行った。赤血球は低張緩衝液 (168 mM NH<sub>4</sub>Cl, 10 mM KHCO<sub>3</sub>, 81.8 μM EDTA-4Na) を加え、溶血させ除去した。得られたペレットに penicillin-streptomycin (Wako, Osaka, Japan)、Fungizone (Wako)、L-glutamine (Thermo Fisher Scientific)、50 ng/mL EGF (Peprotech, Rocky Hill, NJ)、100 ng/mL Noggin (Peprotech)、1 μM Jagged-1 (AnaSpec, Fremont, CA) および 10 μM Y27632 (Wako, Osaka, Japan) を含む Advanced DMEM/F12 (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA) を加え、再懸濁した。ピペット操作を繰り返し、単細胞になるように分離させた。事前に 12 ウェルプレートに 1 ウェルあたり 65 μL の Matrigel<sup>®</sup> (Corning Inc., Bedford, MA) をコーティング・重合しておき、その上に細胞懸濁液を播種し、37 °C, CO<sub>2</sub> 5%, 湿度 100% の条件で一晩インキュベートした。翌日、死細胞や debris を含む

上清を除去し、Matrigel 上に接着した細胞を 75  $\mu$ L の Matrigel で覆った。Matrigel が重合化した後に 800  $\mu$ L の培地を加え、37  $^{\circ}$ C, CO<sub>2</sub> 5% のインキュベーターで三次元培養を継続した (図 2)。一部の実験では Cell Matrix<sup>®</sup> Collagen Gel Kit (Nitta Gelatin Inc., Osaka, Japan) を付属のプロトコールに従い、使用した。継代は 5~10 日ごとに 1:3 希釈で行った。各継代において、オルガノイドをセルスクレーパーで 5 mL チューブに回収し、PBS で洗浄した。細胞分離のため、37  $^{\circ}$ C で 5 分間の Accutase<sup>®</sup> (Innovative Cell Technologies, San Diego, CA) 処理およびピペット操作を繰り返し、単一細胞に解離させた。解離した細胞を前述と同様に固化した Matrigel 上に播種し、一晚インキュベートした後に、Matrigel に接着した細胞のみを三次元培養した。

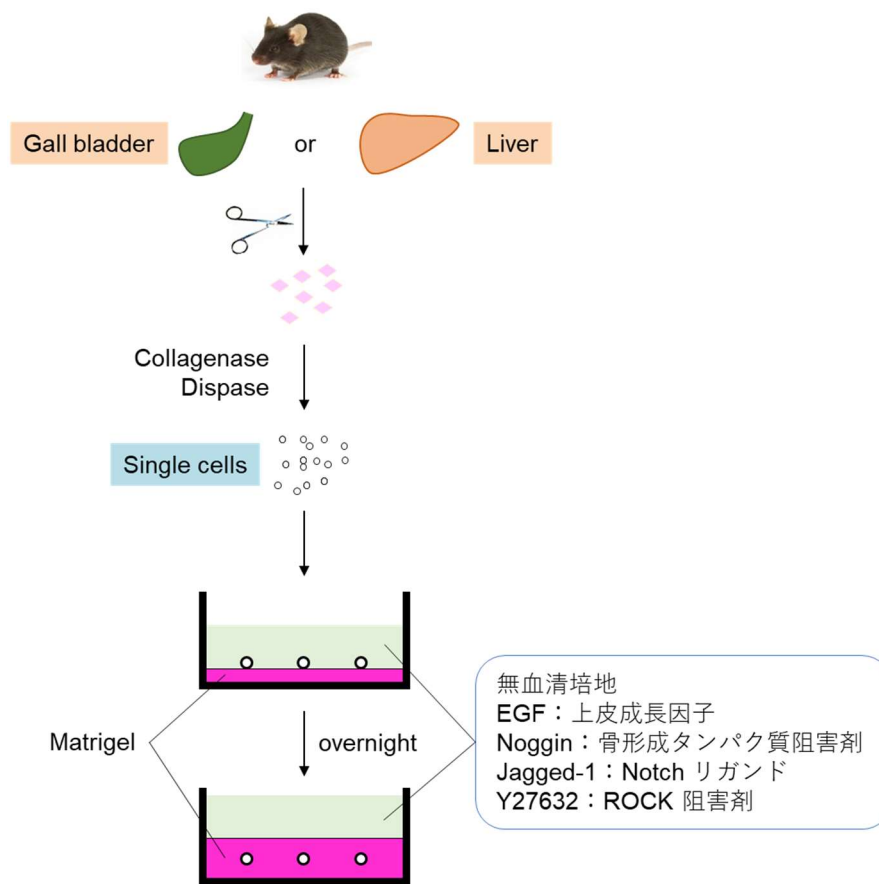


図 2. マウス肝臓および胆嚢由来オルガノイド培養

マウス肝臓または胆嚢を摘出し、氷冷下で 2-3mm の小片に刻んだ。酵素処理後に培地を加え、ピペット操作により単細胞に分離した。事前に Matrigel をコーティング・重合したプレートに細胞懸濁液を播種し、インキュベートした。翌日、死細胞や debris を含む上清を除去し、接着した細胞を Matrigel で覆った。Matrigel が重合した後に培地を加え、三次元培養を継続した。

## 2. ベクターとウイルス感染

shRNA の導入には、*Luc* (SHC007)、*Cdkn2a* (TRCN222731 および TRCN231227)、*Pten* (TRCN322421 および TRCN28992)、*Trp53* (TRCN12359 および TRCN310844)、*Apc* (TRCN42533, 42534, 42535,

42536, 42537) を標的とする pLKO.1-puro ベクター (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO) を使用した (TRCN は The RNAi Consortium の clone ID)。Apc の shRNA については高力価なクローン[9]のプールを作製するために、5 種類のクローンをトランスフェクションのために等量混合してウイルス粒子を生成した。

Cre リコンビナーゼをコードする LV-Cre pLKO.1 (Addgene plasmid 25997) を 2 つの LoxP 配列が隣接する DNA 配列を *in vitro* で除去するために使用した。形質導入の効率をモニターするため、感染実験の際には陽性コントロールとしてカイアシ (Copepod) 由来の緑色蛍光タンパク (GFP) を発現する pCDH-CMV-MCS-EF1-copGFP (System Biosciences, Mountain View, CA) を使用した。レンチウイルス粒子は、ViraPower Lentiviral Expression System (Invitrogen, Carlsbad, CA) を添付のプロトコールに従って使用し、生成した。すなわち、293FT 細胞に導入する遺伝子を含む発現コンストラクト、パッケージング用のプラスミド (pLP1, pLP2, pLP/pVSVG) を同時に Lipofectamine 2000 (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA) でトランスフェクションし、48-72 時間後に培養上清を回収した。回収したウイルス上清を 0.45  $\mu$ m フィルターに通し、PEG-it Virus Precipitation Solution (System Biosciences) で 10 倍濃縮し、-80  $^{\circ}$ C で保存した。

オルガノイドへのレンチウイルス遺伝子導入は、既報の通りに行った[10]。具体的には、37 °C で 10 分間の Accumax (Innovative Cell Technologies, San Diego, CA) による酵素処理で、オルガノイドを完全に単細胞に解離させた。250  $\mu$ L の 2 倍濃縮培地に再懸濁した  $1 \times 10^4$  個の細胞に、2.5  $\mu$ L の Transdux (System Biosciences) を加え、250  $\mu$ L の 10 倍濃縮ウイルス粒子と混合した。それらを 12 ウェルプレート上の重合化した Matrigel 上に播種し、37 °C で一晩インキュベートした。翌朝、死細胞およびウイルス粒子を含む上清を除去した。Matrigel 上に接着した細胞を 70  $\mu$ L の Matrigel で覆い、重合化した後に培地を加えて、三次元培養を継続した (図 3)。

オルガノイドに対するレンチウイルスベクターによる遺伝子導入効率を検証するために、*copGFP* 遺伝子を含むレンチウイルスベクターを導入した。感染後 2 日で大部分のオルガノイドにおいて GFP 陽性細胞がみられ、3 週間後においても高い陽性率がみられた (図 4)。すなわち、レンチウイルスベクターにより上皮細胞に対する効率的で安定した遺伝子導入が可能であると考えられた。

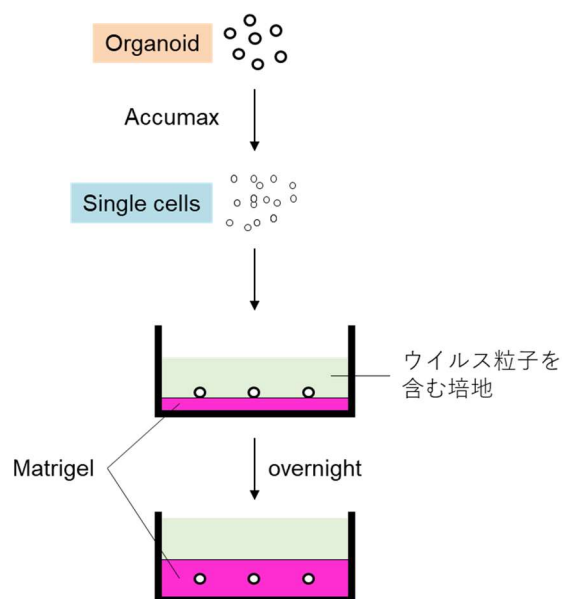


図 3. ウイルスベクターによる遺伝子導入

オルガノイドを Accumax による酵素処理で単細胞に解離させた後、ウイルス粒子を含む培地へ混合した。事前に Matrigel をコーティング・重合したプレートに播種し、インキュベートした。翌日、死細胞や debris を含む上清を除去し、接着した細胞を Matrigel で覆った。Matrigel が重合した後に培地を加え、三次元培養を継続した。

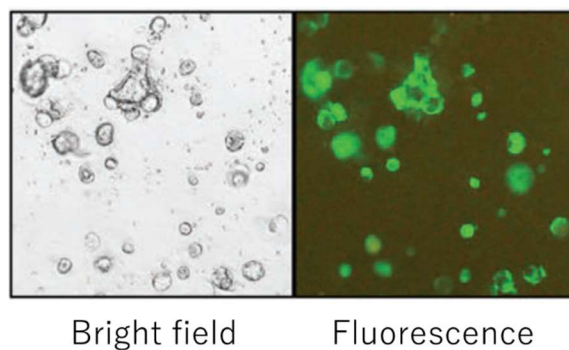


図 4. レンチウイルスベクターによるオルガノイドへの *GFP* 遺伝子導入

*GFP* 遺伝子導入 2 日後の位相差顕微鏡画像（左）および蛍光画像（右）を示す。大部分の細胞が緑色の蛍光を発しており、レンチウイルスベクターにより効率的で安定した遺伝子導入が可能であると考えられた[26]。



レトロウイルス産生のためには、293T 細胞に gag, pol, env 遺伝子を組み込みエコトロピックな（マウスまたはラットのみに感染する）ウイルスを産生する Platinum-E 細胞[27]にレトロウイルスベクター pMX-FGFR2-AHCYL1-neo [4] または pMX-GFP-neo をトランスフェクションした。トランスフェクションの 48 時間後に集めたウイルス上清を濾過し、40 倍濃縮した直後に使用した。

### 3. 免疫不全マウスにおける腫瘍形成能評価

$5 \times 10^5$  個の細胞に相当するオルガノイドを 200  $\mu$ L の培地に再懸濁し、等量の Matrigel と混合した。続いて免疫不全マウスの左右いずれかの背部皮下に接種した。8 週間後にマウスを安楽死させ、触知可能な結節または残存 Matrigel プラグを採取し、組織学的評価またはさらなる三次元培養を行った。触知可能な結節は、既報のように固形腫瘍と非腫瘍性結節に分類された[9]。8 週間未満においても、皮下結節が外観上または触診により嚢胞である場合を除いて、結節がマウスの体重の 10% 以上を占めると推定される場合あるいは全身状態が不良である場合にはマウスを安楽死させ、皮下結節を採取した。腫瘍由来の上皮細胞を回収するために、皮下結節を 1~2 mm の小片に刻み、2 U/mL の dispase II および 1 mg/mL の collagenase P を用いて、37 °C で 30 分間酵素処理した。解離した細胞を使用して、引き続きオルガノイド培養を行った。

#### 4. 抗体

本研究に使用した抗体は、RasG12D (# 14429, Cell Signaling Technology, 1 : 1,000)、p16<sup>Ink4a</sup> (sc-1207, Santa Cruz Biotechnology, 1 : 2,000)、p19<sup>Arf</sup> (NB200-174, Novus Biologicals, 1 : 1,000)、Pten (# 9559, Cell Signaling Technology, 1 : 2,000)、Apc (KT45, Abnova, Taipei City, Taiwan)、p53 (# 2524, Cell Signaling Technology, 1 : 2,000)、p-Akt<sup>S473</sup> (# 4060, Cell Signaling Technology, 1 : 2,000)、FLAG (clone 1E6, Wako, 1 : 500)、GFP (GTX113617, Gene Tex, 1 : 10,000)、Erk (# 4695, Cell Signaling Technology, 1 : 5,000)、pErk (# 4370, Cell Signaling Technology, 1 : 2,000) および  $\alpha$ -tubulin (T5168, Sigma-Aldrich, 1 : 10,000) である。対応するマウス用二次抗体 (NA931, GE Healthcare) またはウサギ用二次抗体 (7074, Cell Signaling Technology) をポリフッ化ビニリデン (PVDF) 膜に加え、室温で 45 分間インキュベートし、最後に検出試薬として ImmunoStar LD (Wako) を使用した。化学発光画像は、imageQuant LAS 4000 mini (GE Healthcare) を用いて撮影した。

#### 5. 病理組織学的評価

全ての皮下腫瘍および小結節をホルマリン固定後にパラフィン包埋し、厚さ 5  $\mu$ m で切片を作製した。オルガノイドに関しては、最初に Matrigel を Cell

Recovery Solution (Corning Inc.) で処理することにより脱重合し、次に細胞浮遊液ゼリー化試薬である iPGell (GenoStaff, Tokyo, Japan) に包埋し、ホルマリン固定した。ヘマトキシリン・エオシン染色を標準的な病理組織学的評価に使用した。免疫組織化学染色において、抗原賦活化は最初にオートクレーブを用いて行い、そして抗 CK19 抗体 (ab133496, Abcam) を 500 倍希釈で一次抗体として使用した。ビオチン化ヤギ抗ウサギ IgG 抗体 (Vector Laboratories, Burlingame, CA) を 200 倍希釈で二次抗体として使用した。特異的シグナルの検出には Vectastain Elite ABC system (Vector Laboratories) を用いた。

## 6. 動物実験

野生型 C57BL/6J マウスおよび免疫不全ヌードマウス BALB/cA<sup>nu/nu</sup> は、CLEA Japan (Tokyo, Japan) から購入した。*Kras*<sup>LSL-G12D/+</sup>, *Trp53*<sup>fllox/fllox</sup> および *R26-Pik3ca*<sup>H1047R</sup> マウスを Jackson Laboratory (Bar Harbor, ME) から輸入し、C57BL/6J バックグラウンドで維持した。これらのマウスを交配して複合変異マウスを作製した。マウスの PCR ベースのジェノタイピングは、既報のように行った[28][29][30]。動物実験は国立がん研究センター・千葉県がんセンターの動物実験倫理委員会が策定した動物実験ガイドラインに基づき実施されたものであり、本邦の実験動物に関するガイドラインを満たしている。

## 7. 細胞株

NIH3T3 線維芽細胞 (CRL-1658) は 2013 年に ATCC から購入した。受領直後に細胞を 10% ウシ胎児血清を添加したダルベッコ変法イーグル (DMEM) 培地中で増殖させ、継代 3 回で凍結ストックを作製した。また、継代数 5~7 回の細胞のみをレトロウイルス感染実験に使用した。

## 8. ウェスタンブロット法

Cell Recovery Solution (BD Biosciences) を用いて氷上で 1 時間 Matrigel を非酵素的に脱重合した後、オルガノイドを回収し、1 M NaF, 0.1 M Na<sub>3</sub>VO<sub>4</sub>, 1 M βGP およびプロテアーゼ阻害剤カクテル (Nacalai Tesque, Kyoto, Japan) を含む放射性免疫沈降法 (RIPA, radio-immunoprecipitation assay) 緩衝液に溶解した。還元条件のタンパク質をトリス-グリシン緩衝液中でグラジエントゲル Supersep Ace 5-20% (Wako) を用いて、SDS ポリアクリルアミドゲル電気泳動 (SDS-PAGE) により分離した。その後、セミドライ式ブロット法により PVDF 膜 (Millipore) に転写した。PVDF 膜を 5% 脱脂粉乳を含む PBS-Tween を用いて、4 °C で一晩ブロッキングし、一次抗体と共に室温で 90 分間インキュベートした。

## 9. RNA 抽出と RT-PCR

Trizol (Invitrogen, Carlsbad, CA) を用いて、オルガノイド、肝組織、解離した単細胞、NIH3T3 細胞から全 RNA を抽出した。各サンプルについて、500 ng の全 RNA を、High-Capacity cDNA 逆転写キット (Applied Biosystems, Tokyo, Japan) を用いて逆転写した。標準的な RT-PCR 分析では、AmpliTa<sup>q</sup> Gold (Applied Biosystems) を用いて cDNA を増幅した。定量リアルタイム PCR 分析では、7300 リアルタイム PCR システム (Applied Biosystems) の Power SYBR Green PCR マスターミックスを用いて cDNA を増幅した。3 回の独立した実験結果を  $\beta$ -actin の発現レベルで補正した。使用したプライマー配列を表 2 に示す。

標的遺伝子		塩基配列 (5' - 3')
<i>FGFR2-AHCYL1</i>	forward	CGAATTCTCACTCTCACAACC
	reverse	CGAATTCTCACTCTCACAACC
<i>A/b</i>	forward	TCAACGTCAGAGCAGAGAAGC
	reverse	AGACTGCCTTGTGTGGAAGACT
<i>Ck19</i>	forward	TTACAACCACTACTTTAAGACCATCGA
	reverse	GTCTCAAACCTTGGTTCTGAAGTCATC
<i><math>\beta</math>-actin</i>	forward	CAGCTTCTTTGCAGCTCCTT
	reverse	GCAGCGATATCGTCATCCAT
<i>Afp</i>	forward	GTGAAACAGACTTCCTGGTCCT
	reverse	GCCACAGACCATGAAACAAG

表 2. プライマー配列

## 10. DNA 抽出とゲノム PCR

固化した Matrigel からオルガノイドを単離するために、最初に Cell Recovery Solution (BD Biosciences) による非酵素的な Matrigel の脱重合処理を行った。続いて PBS で洗浄した。回収した細胞ペレットよりゲノム DNA をシリカメンブレン法である NucleoSpin® Tissue (Macherey Nagel, Germany) で抽出した。*In vitro* での *Cre* リコンビナーゼを介した遺伝子組み換えや *FGFR2-AHCYL1* の cDNA のゲノム組み込みは、既報のように[28][29][30] AmpliTaq Gold (Applied Biosystems) によるゲノム PCR および h*FGFR2-AHCYL1* の特異的プライマーを用いて、それぞれ検証した。

## 結 果

### 第 1 章 胆管オルガノイドに対するがん関連遺伝子導入

#### 第 1 節 *Kras* 活性化変異による腫瘍形成の検討

##### 1. 1. 1 マウス胆管オルガノイドの作製

肝内胆管癌 (ICC) は、その起源が肝臓のいずれの細胞由来であるかは必ずしも明らかとはいえない。このため、オルガノイドを用いた手法によって ICC 発がんモデルを構築するために、三次元培養にあたっては肝臓の全ての種類の上皮細胞を含めることが適当と考えた。ゆえにコラゲナーゼ灌流によって末梢胆管を特異的に単離するのではなく、肝臓全体を採取した[31]。単離した肝細胞を固化した Matrigel 上に播種し、翌日 Matrigel に付着した細胞を Matrigel で覆い、上皮成長因子 (EGF)、Noggin (骨形成タンパク質インヒビター)、Jagged-1 (Notch リガンド)、Y27632 (ROCK 阻害剤) (ENJY) を含む培地で三次元培養を開始した。培養開始直後は、肝臓由来の免疫細胞や間葉系細胞など、さまざまな種類の細胞が存在していたが、1 回の継代の後は上皮成分の嚢胞性オルガノイドのみが増殖し、以後定期的な継代を繰り返すことで 3 か月以上にわたって増殖を続けた (図 5)。

この間におけるオルガノイドを構成する細胞系統の変化を評価するため、免疫組織化学染色を行った。その結果、胆管細胞マーカーである CK19 の均一な

発現が確認された (図 6)。さらにリアルタイム PCR による遺伝子発現解析により *Alb* (肝細胞マーカー) および *Ck19* (胆管細胞マーカー) の発現レベルを評価した。肝組織ならびに解離した肝細胞に比して、三次元培養下では *Alb* の発現低下ならびに *Ck19* 発現上昇が強く認められ、この培養環境下においては胆道上皮の形質を有する細胞の選択的な増殖が明らかとなった (図 7)。 *Afp* (胎児肝マーカー) の発現はいずれの場合も低く、成体の肝臓由来細胞の性質と一致していた。肝前駆細胞の胆管細胞への分化には *Noggin* および *Jagged-1* の関与が知られているが[32][33]、これら因子を除いた培地 (EY) での三次元培養においても、これらを含んだ培地 (ENJY) と同様の *Ck19/Alb* 遺伝子発現比が認められた。以上より肝臓由来オルガノイドは三次元培養下で *Noggin* や *Jagged-1* の存在に依存せず、胆管上皮に分化することを示していると考えられた。

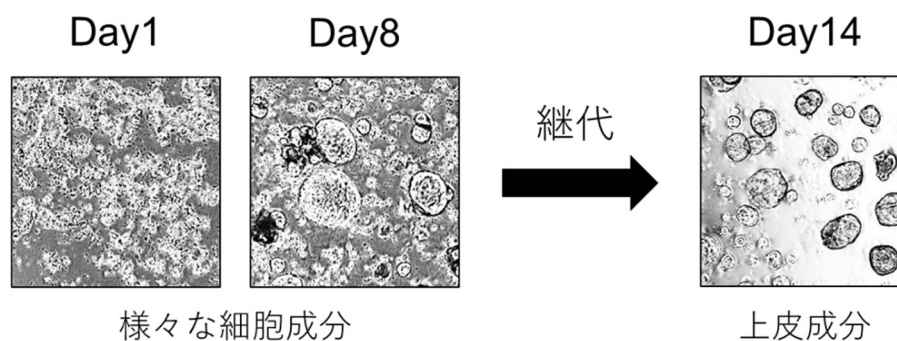


図 5. 三次元培養におけるマウス肝臓由来オルガノイドの位相差顕微鏡画像  
初代培養細胞 (Day 1) における不均一な細胞集団から次第に嚢胞性オルガノイドが増加したが、間質細胞の残存を認めた (Day 8)。1 回の継代後は上皮成分の嚢胞性オルガノイドが優勢となった (Day 14) [26]。



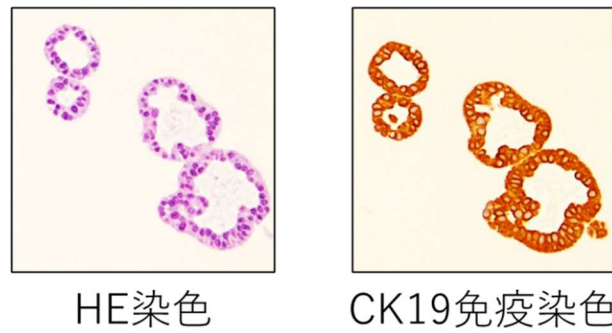


図 6. マウス肝臓由来オルガノイドの CK19 免疫組織化学染色像  
 左：ヘマトキシリン・エオシン染色像、右：CK19 免疫組織化学染色像  
 胆管細胞マーカーである CK19 の均一な発現が確認された[26]。

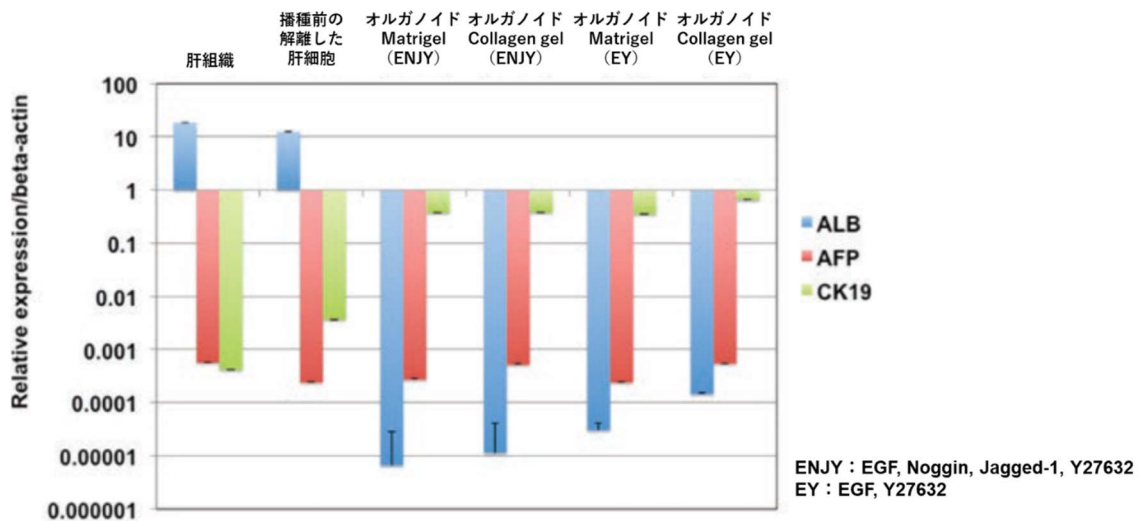


図 7. 肝臓由来オルガノイドのリアルタイム PCR による遺伝子発現解析  
 $\beta$ -actin に対する相対的発現レベルを *Albumin* (ALB)、*Alpha fetoprotein* (AFP) および *Cytokeratin 19* (CK19) について示した。肝組織、三次元培養前の解離した肝細胞、各種培養条件下におけるオルガノイドを解析した ( $n=3$ )。三次元培養下では培養条件によらず *Alb* の発現低下ならびに *Ck19* 発現上昇が強く認められ、胆道上皮の形質を有する細胞の選択的な増殖を認めた[26]。

### 1. 1. 2 胆管オルガノイドにおける変異 *Kras* の腫瘍形成能の評価

最初にヒト ICC の約 25% で変異がみられる *KRAS* 遺伝子について検討した。マウス胆管オルガノイドに変異 *Kras* 遺伝子を誘導し、マウス皮下における腫瘍形成能の評価を試みた。遺伝子導入については以下の方法を用いた[17]。すなわち、Cre リコンビナーゼにより変異 *Kras* (*Kras*<sup>G12D</sup>) を発現する遺伝子改変マウスである *Kras*<sup>LSL-G12D+</sup> マウス由来の胆管オルガノイドに対して、レンチウイルスベクターで Cre リコンビナーゼを導入し、変異 *Kras* を有するオルガノイドを *in vitro* で誘導した (図 8)。このオルガノイドを一定期間三次元培養したのちにヌードマウスの背部皮下に接種したが (図 9)、非腫瘍性結節のみを認めた (n = 3, 図 10)。

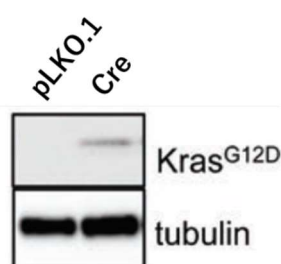


図 8. *Kras*<sup>LSL-G12D+</sup> マウス胆管オルガノイドにおける *Cre* を介した *Kras*<sup>G12D</sup> の誘導

*Kras*<sup>LSL-G12D+</sup> マウス胆管オルガノイドに *Cre* 発現ベクターを導入し、ウェスタンブロットを行った。*Kras*<sup>G12D</sup> の発現が確認された。pLKO.1 は *Cre* のバックボーンベクター。ローディングコントロールとして tubulin を使用した [26]。

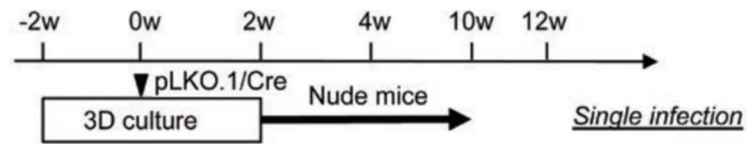


図 9. *Kras*<sup>LSL-G12D+</sup> マウス胆管オルガノイドに対する遺伝子導入プロトコール  
*Kras*<sup>LSL-G12D+</sup> マウス胆管オルガノイドに対して、単回のレンチウイルス感染により pLKO.1 または *Cre* を導入した（黒矢頭）。その後、ヌードマウスの背部皮下へ接種した[26]。

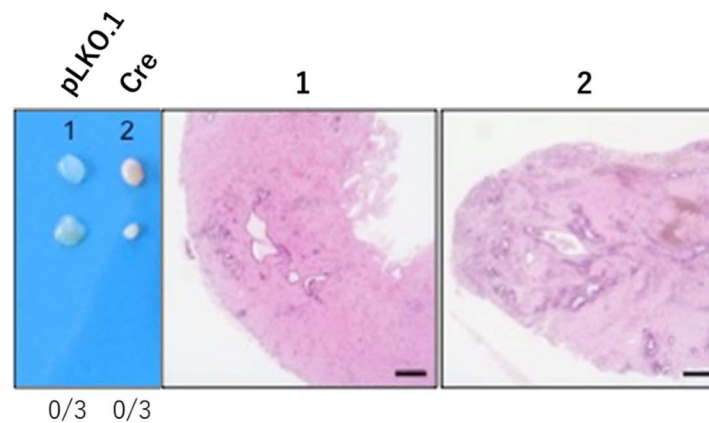


図 10. マウス胆管オルガノイドに *Kras* 活性化変異の導入によって生じた皮下結節および組織像

*Kras*<sup>LSL-G12D+</sup> マウス胆管オルガノイドに変異 *Kras* を発現させることで生じた皮下結節およびそのヘマトキシリン・エオシン染色像を示す。非腫瘍性結節のみを認め、腫瘍性病変は認められなかった。スケールバーは 0.3 mm。パネル下の数値は腫瘍発生率[26]。

### 1. 1. 3 変異 *Kras* ならびに *Cdkn2a* または *Pten* ノックダウンの組み合わせによる胆管オルガノイドからの腫瘍形成

*Kras* 変異単独での腫瘍形成は認められなかったため、次に ICC で変異していることの多い腫瘍抑制遺伝子である[17][18][34] *Pten* および *p16<sup>Ink4a</sup>* と *p19<sup>Arf</sup>* との両方をコードする *Cdkn2a* をノックダウンして腫瘍形成能を評価した。変異の導入には、最初に *Cre* またはそのバックボーンベクター pLKO.1 を *Kras<sup>LSL-G12D</sup>* マウス胆管オルガノイドに導入し（すなわち変異 *Kras* または野生型 *Kras* オルガノイドとし）、その後に shRNA を導入するというプロトコールを用いた（図 11）。shRNA による *Pten* および *Cdkn2a* のノックダウンにあたっては、2 つの独立したクローンを用いた（図 12）。puromycin による薬剤選択後、オルガノイドをヌードマウスの背部皮下に接種した。

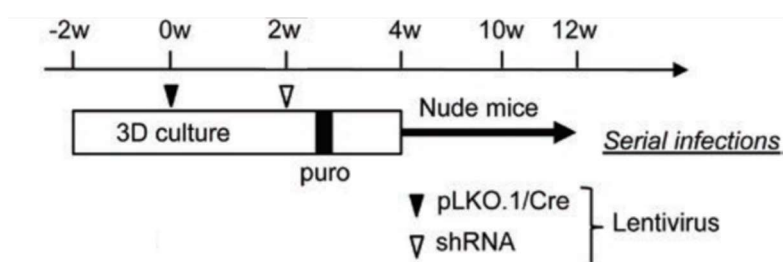


図 11. マウス胆管オルガノイドに対する遺伝子導入プロトコール

*Kras<sup>LSL-G12D</sup>* マウス胆管オルガノイドに対して、最初にレンチウイルス感染により pLKO.1 または *Cre* を導入した（黒矢頭）。次に shRNA による *Pten* および *Cdkn2a* のノックダウンを行った（白矢頭）。puro は shRNA ベクター導入後の 4 日間の puromycin による薬剤選択を示す。その後、ヌードマウスの背部皮下へ接種した[26]。

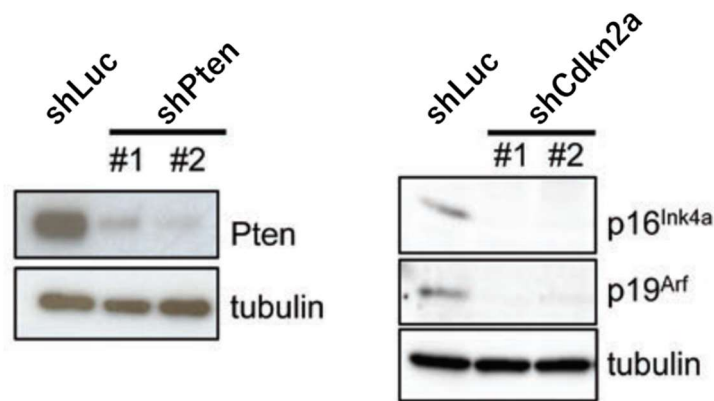


図 12. *Pten* および *Cdkn2a* を標的とする shRNA を導入したマウス胆管オルガノイドのウェスタンブロット

*Pten* および *Cdkn2a* を標的とする 2 つの独立した shRNA クローンをマウス胆管オルガノイドに導入した。*Pten* および *Cdkn2a* でコードされた p16<sup>Ink4a</sup> と p19<sup>Arf</sup> との発現が抑制された。ネガティブコントロールとして sh*Luc* を導入したオルガノイドでは、それぞれの発現抑制は認められなかった [26]。

*Kras* 活性化変異がない場合 (pLKO.1)、接種後数週間を経ても触知可能な腫瘍は発生せず、残存 Matrigel の平坦なプラグのみが接種部位にみられた (図 13)。組織学的には、正常な腺上皮であった (図 14 #2)。*Kras* 活性化と sh*Luc* (すなわち *Kras* 単独活性化) では、皮下結節は 4/12 で誘発され (図 13 #5)、組織学的には背の高い円柱細胞からなる過形成が主であった (図 14 #5)。他の 8 個の結節は、組織学的には正常な腺管ならびにオルガノイドと同時に皮下接種された Matrigel が残存して混在したものであった。これらの特徴は、既報における非腫瘍性結節と同様であった [9]。

一方、変異 *Kras* を有するオルガノイドに、sh*Cdkn2a* および/または

*shPten* による p16, *Pten* の発現抑制を組み合わせマウス皮下に移植すると、ほぼ全例において固形腫瘍が誘導された (図 13)。組織学的には、異形成や篩状構造を認めた (図 14 #6, 8)。オフターゲット効果の可能性を除外するため、*Cdkn2a* または *Pten* に対する異なる shRNA クローンでも実験したが、同様に腫瘍形成を認めた (図 15)。また、*Cre+ shCdkn2a* によって誘導された嚢胞においてさまざまな組織学的グレードの病変が確認された。嚢胞の内側を覆う上皮細胞は正常なものから軽度の乳頭状隆起 (図 16a)、分岐を伴う複数の乳頭状突起 (図 16b)、茎を有する乳頭状病変 (図 16c, d) まで様々であった。

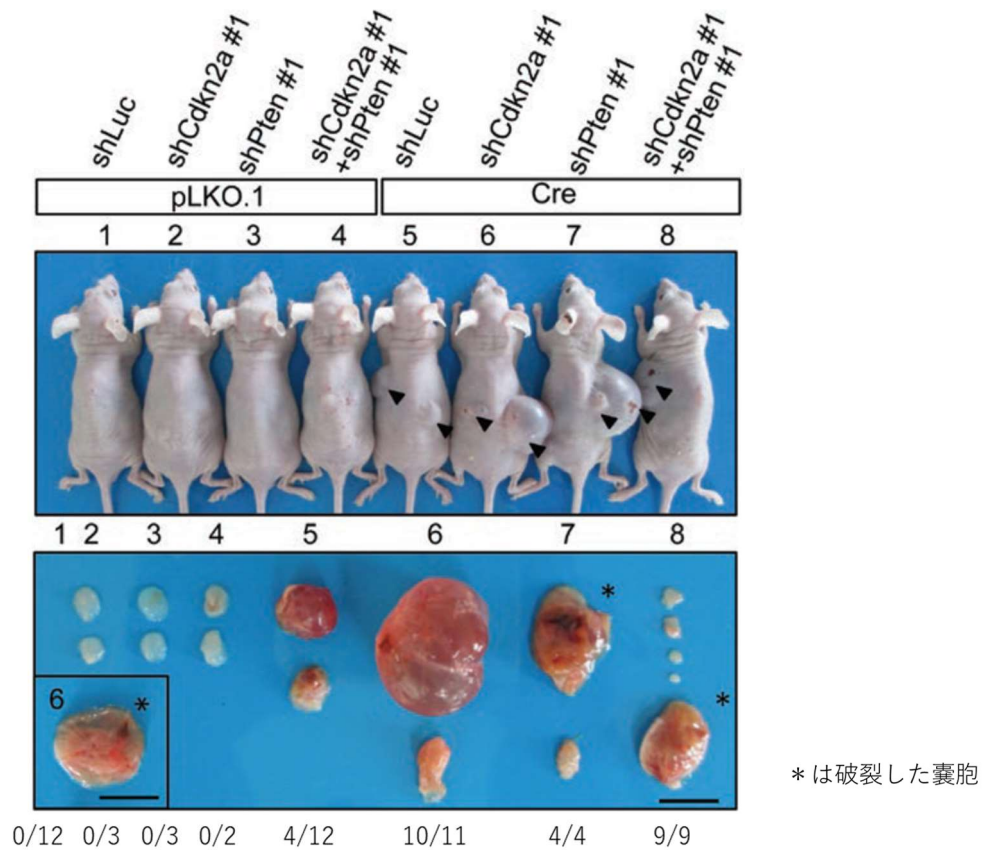


図 13. *Kras* 変異および *Cdkn2a* かつ/または *Pten* ノックダウンによる腫瘍形成

遺伝子導入した *Kras*<sup>LSL-G12D</sup> マウス胆管オルガノイドを皮下接種し、8 週間後の代表的な結果を示す。パネル上段はヌードマウスの皮下結節。Cre を導入したオルガノイド (5-8) を皮下接種したマウスで、主に触知可能な結節 (矢頭) を認めた。

パネル下段は摘出された皮下腫瘍。各結節または腫瘍 (1-8) は、上段のパネルの皮下結節に対応している。#1 結節なし、#2-4 Matrigel プラグ、#5-8 嚢胞を伴う固形腫瘍。#5-6 で著明な嚢胞の拡張を認めた。#7-8 はヌードマウスから腫瘍を摘出する際に破裂した。パネル左下の挿入図は #6 嚢胞の破裂後を示す [26]。スケールバーは 1 cm。パネル下の数値は腫瘍発生率。



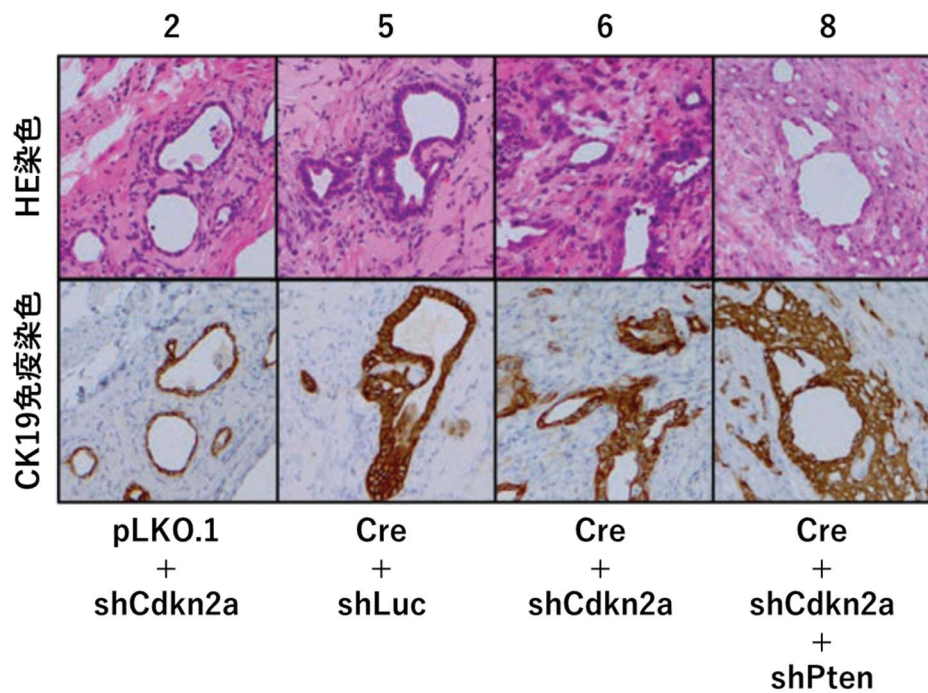


図 14. 皮下腫瘍の組織学的解析

パネル上段は、図 13. #2, #5, #6, #8 薄切切片のヘマトキシリン・エオシン染色像。パネル下段は、連続切片に対して胆管上皮マーカー CK19 の免疫染色像。#2 では少数の正常な腺上皮が観察されるのみであったが、#5 では過形成、#6-8 では異形成が観察された[26]。



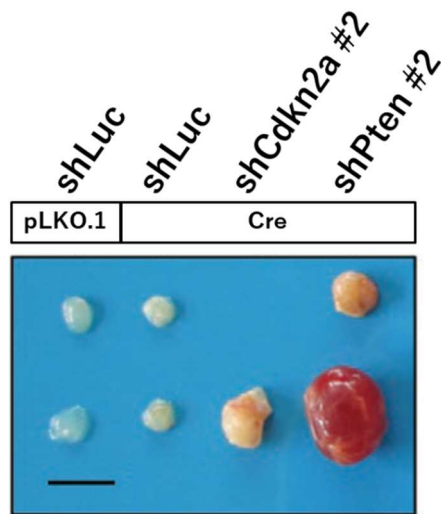


図 15. *Cdkn2a* または *Pten* の異なる配列を標的とした shRNA クローンによる腫瘍形成

オフターゲット効果の可能性を除外するため、*Cdkn2a* および *Pten* を標的とした異なる配列に対する shRNA クローンを導入した。#1 Matrigel プラグ、#2 非腫瘍性結節、#3-4 固形腫瘍を認め、図 13 と同様に腫瘍形成が確認された[26]。スケールバーは 1 cm。

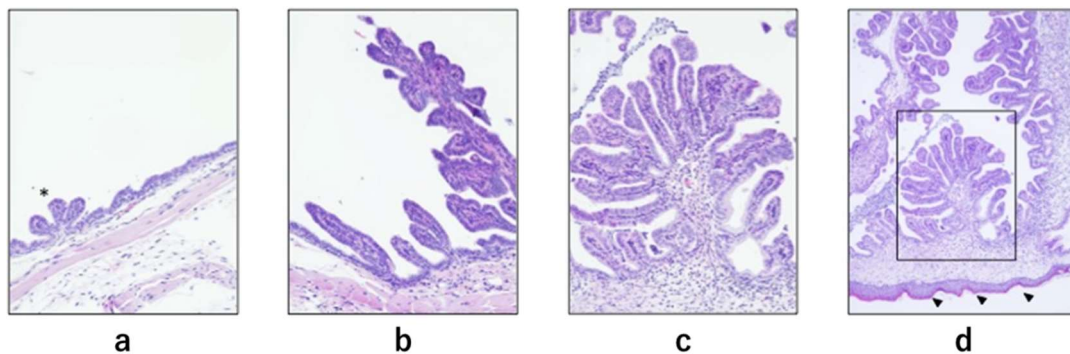


図 16. *Kras* 変異および *Cdkn2a* のノックダウンにより胆管オルガノイドから生じた乳頭状病変

(a) 嚢胞の内腔は正常な単層の上皮細胞で構成されている。内腔上皮は基本的に平坦だが、部分的に隆起を認めた (\*)。 (b) 分枝を有する複数の乳頭状構造。 (c) 茎を伴う著明な分枝を有する乳頭状病変。 (d) (c) のボックスの低倍率画像[26]。矢頭はヌードマウスの皮膚。

全般的に高い感染効率が達成されたにもかかわらず、*loxP-Stop-loxP* の増幅産物は *Cre* の導入後も皮下接種前では常に残存しており (図 17)、*Kras* 遺伝子座の組み換えの不完全な浸透を示した。一方、腫瘍由来オルガノイドでは *loxP-Stop-loxP* の増幅産物は検出されず、*Kras* 活性化細胞に対するポジティブセレクションが働いている可能性が示唆された。*Kras* の主要な下流経路である PI3K (Phosphoinositide 3-kinase) /mTOR (mechanistic target of rapamycin) 経路および ERK (extracellular signal-regulated kinase) 経路のいずれの経路がオルガノイドにおいて活性化されるかを明らかにするため、AKT および Erk それぞれのリン酸化を検証した (図 18)。皮下接種前のオルガノイドと比較して、腫瘍由来の *Kras* 活性化オルガノイドにおいて、Erk は高活性化された (図 19)。AKT のリン酸化については、*Kras* 活性化または腫瘍形成による影響を受けなかった (図 19)。*Cre* 導入後も皮下接種前では、Erk は活性化されておらず、Erk の活性化は *Kras* 活性化の直接の結果ではないかもしれないが、これらの観察結果は ERK 経路の高い活性を有する細胞が皮下において積極的に選択されたことを示唆した。以上の結果より変異 *Kras* とそれに続く *Cdkn2a* または *Pten* のノックダウンとは腫瘍形成において協調的に作用することが確認された。

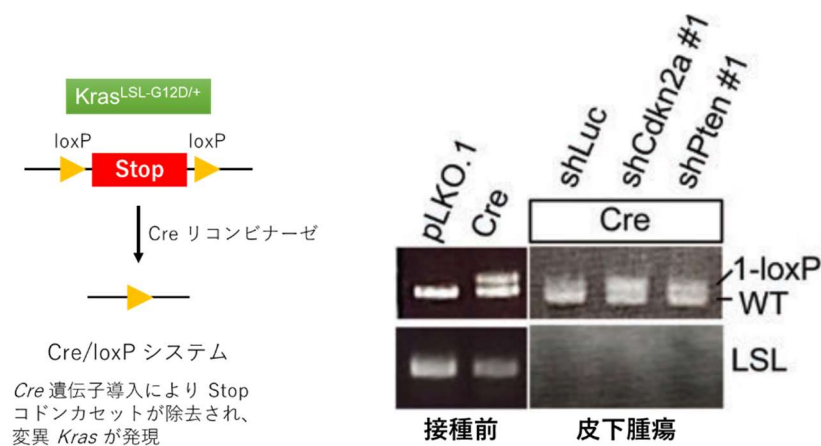


図 17. *Kras* 遺伝子座のゲノム PCR

ヌードマウスへの皮下接種前および皮下腫瘍由来の胆管オルガノイドを分析した。*Kras*<sup>LSL-G12D/+</sup> マウス胆管オルガノイドは Cre/loxP システムを用いており、*Cre* 遺伝子導入により変異 *Kras* を発現する。パネル上段は LSL (1-loxP) 配列除去後の変異型 *Kras* および *Kras* 野生型遺伝子 (WT) の検出。パネル下段は loxP-Stop-loxP (LSL) 配列の検出。LSL 配列は皮下接種前には残存していたが、皮下接種後には消失した[26]。

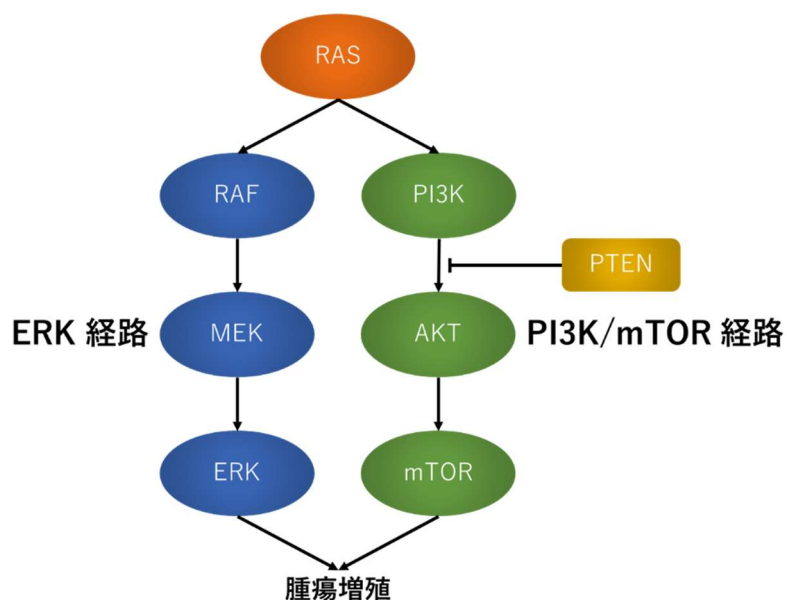


図 18. *Kras* 下流のシグナル伝達経路

*Kras* 下流の主要なシグナル伝達経路である PI3K/mTOR 経路および ERK 経路を示す[35]。

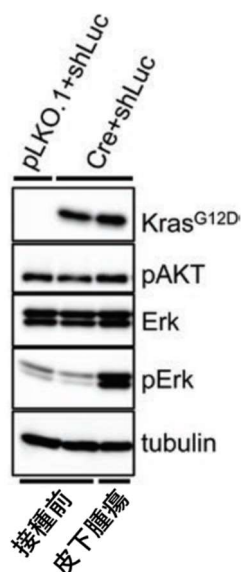


図 19. 皮下接種前および皮下腫瘍由来の胆管オルガノイドの PI3K/mTOR 経路および ERK 経路に関するウェスタンブロット

皮下接種前と比較して、皮下腫瘍由来の *Kras* 活性化オルガノイドにおいて、Erk は高活性化された。AKT のリン酸化については、*Kras* 活性化や腫瘍形成による変化は認められなかった[26]。

#### 1. 1. 4 変異 *Kras* ならびに *Apc* または *Trp53* ノックダウンの組み合わせによる胆管オルガノイドからの腫瘍形成

Wnt シグナル経路の活性化および p53 の不活性化は、ヒト ICC において高頻度に認められる[17][36]。腫瘍形成における *Kras* 活性化変異とがん抑制遺伝子との遺伝的相互作用をさらに検討するため、*Cre* を介した *Kras* 活性化オルガノイドに対して、shRNA によって *Apc* または p53 をノックダウンした

(図 20)。*Cre+shApc* または *Cre+shTrp53* を導入したオルガノイドは、検討した 3 症例すべてにおいて固形腫瘍が発生し (図 21)、これらは組織学的に

異形成を示した (図 22)。対照的に *Cre+shLuc* を導入した 3 症例では 1 症例のみで腫瘍が誘導された (図 21) が、他の 2 症例は非腫瘍性結節であった。

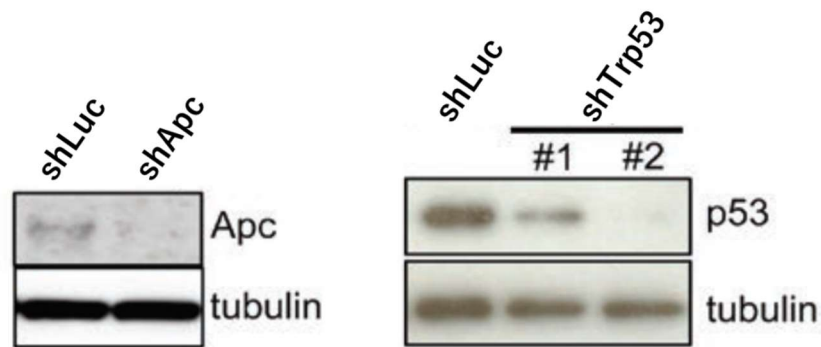


図 20. *shApc* または *shTrp53* を導入した胆管オルガノイドのウェスタンブロット

shRNA の導入により Apc および Trp53 それぞれの発現が抑制された。ネガティブコントロールとして *shLuc* を導入したオルガノイドでは、発現の抑制は認められなかった[26]。

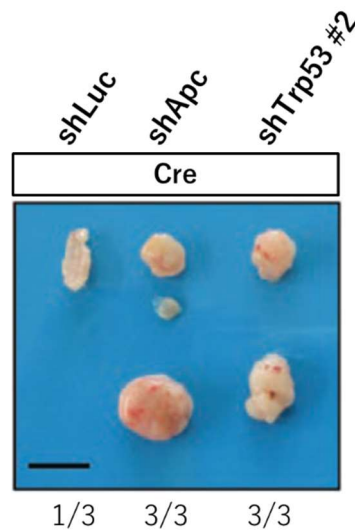


図 21. *Kras* 変異および *Apc* または *Trp53* ノックダウンによる皮下腫瘍

*Kras*<sup>LSL-G12D</sup> マウス胆管オルガノイドに最初に *Cre* を導入し、*Kras* 活性化変異を誘導した。続いて *shApc* または *shTrp53* を導入した。*Cre* + *shApc* または *Cre* + *shTrp53* を導入した 3 症例はすべて固形腫瘍が発生した。*shLuc* の導入では、3 症例中 1 症例で扁平な病変を認めた[26]。スケールバーは 1 cm。パネル下の数値は腫瘍発生率。

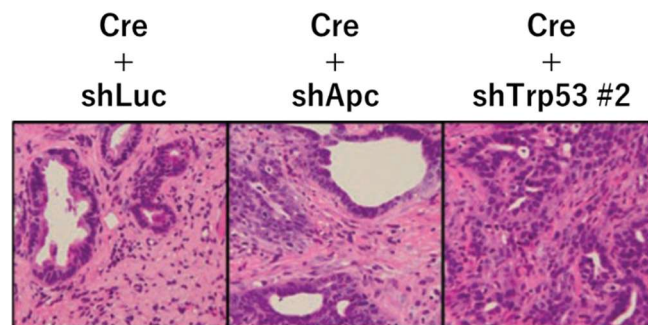


図 22. *Kras* 変異および *Apc* または *Trp53* ノックダウンによる皮下腫瘍の組織像

図 21 で認められた皮下腫瘍のヘマトキシリン・エオシン染色像を示す。*Cre* + *shLuc* では過形成、*Cre* + *shApc* および *Cre* + *shTrp53* では異形成を認めた[26]。

次に遺伝子導入の時間的順序が及ぼす影響を検証するために、*Kras<sup>LSL-G12D</sup>+* マウス胆管オルガノイドに対して、最初に *shApc* または *shTrp53* を導入し、続いて pLKO.1, *Cre* または *Cre + shPten* を導入した。検討した 2 症例では *shApc* または *shTrp53* 単独での腫瘍形成は認められなかったが、*Cre* を介した *Kras* 活性化を行うと、*shPten* の有無にかかわらず、腫瘍の発生が観察された (図 23, 図 24)。すなわち、*Apc* または *Trp53* の不活性化は、遺伝子導入の順序にかかわらず、*Kras* 活性化と協調して発がんに寄与した。

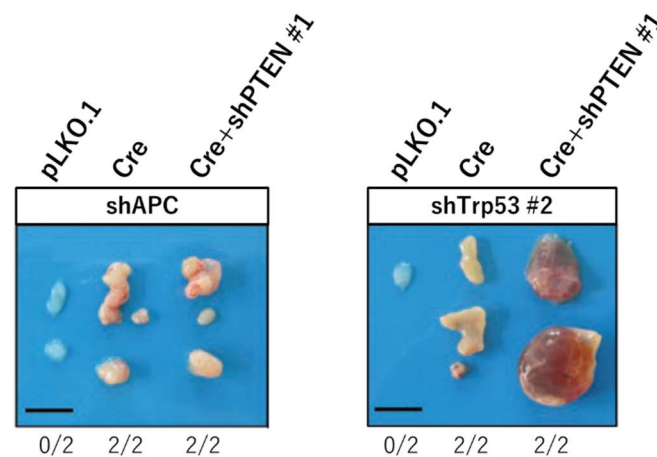


図 23. *Apc* または *Trp53* ノックダウン後に *Kras* 変異導入により生じた皮下腫瘍

*Kras<sup>LSL-G12D</sup>+* マウス胆管オルガノイドに対して、最初にボックス内に示した shRNA を導入した。続いて pLKO.1, *Cre* または *Cre + shPten* を導入した。*Apc* または *Trp53* ノックダウン単独での腫瘍形成は認められなかったが、*Cre* を介して変異 *Kras* を発現させると、*shPten* の有無にかかわらず、腫瘍形成を認めた[26]。スケールバーは 1 cm。パネル下の数値は腫瘍発生率。



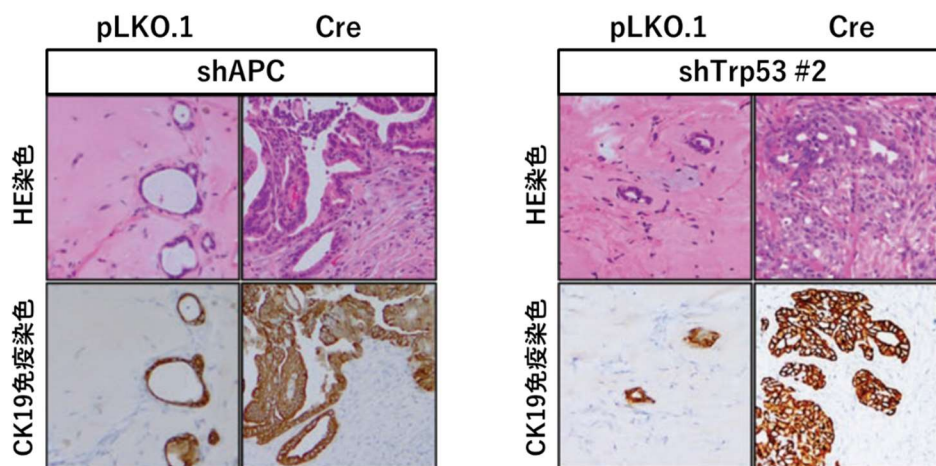


図 24. *Apc* または *Trp53* ノックダウン後に *Kras* 変異導入により生じた皮下腫瘍の組織像

図 23 で認められた皮下腫瘍の組織像。パネル上段はヘマトキシリン・エオシン染色像、パネル下段は CK19 免疫染色像を示す。shRNA および *Cre* の両方を導入したオルガノイドのみで異形成を認めた[26]。

さらに *Cre* の導入により変異 *Kras* の発現および p53 欠失を同時に生じるマウス (*Kras*<sup>LSL-G12D/+</sup>; *Trp53*<sup>flax/flax</sup>) の胆管オルガノイド用いて、同様に検討した。*Cre* 遺伝子導入によって変異 *Kras* の発現と p53 欠失とが同時に生じた場合 (図 25)、これらのオルガノイドからは低分化な大型の固形腫瘍が発生した (図 26、図 27)。皮下接種前のオルガノイドにおける *Erk* のリン酸化は、変異 *Kras* の発現および p53 欠失によって抑制されたが、腫瘍由来オルガノイドにおいては *Erk* の活性化が部分的に回復した (図 28)。これは *Kras*, p53 および *Erk* 間の相互作用を示唆している。



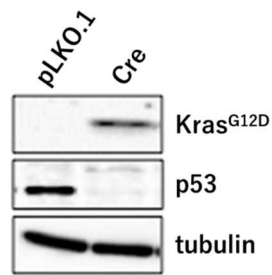


図 25. *Kras*<sup>LSL-G12D/+</sup>; *Trp53*<sup>flox/flox</sup> マウス胆管オルガノイドへの *Cre* 導入後のウェスタンプロット

*Cre* を介した変異 *Kras* の発現および p53 の欠失が確認された[26]。

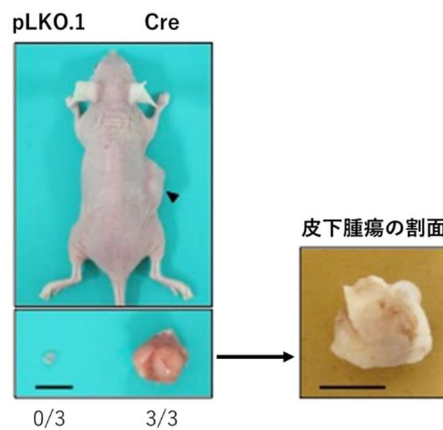


図 26. *Kras*<sup>LSL-G12D/+</sup>; *Trp53*<sup>flox/flox</sup> マウス胆管オルガノイドより生じた皮下腫瘍

左パネル上段はヌードマウスの皮下腫瘍を示す。*Cre* を導入されたオルガノイド（右）のみが、触知可能な結節（矢頭）を生じた。左パネル下段は摘出した病変を示す。Matrigel プラグ（左）と皮下腫瘍（右）を認めた。左パネル下の数値は腫瘍発生率。右パネルは摘出した皮下腫瘍の断面を示す。皮下腫瘍は嚢胞成分のない固形腫瘍だった[26]。スケールバーは 1 cm。

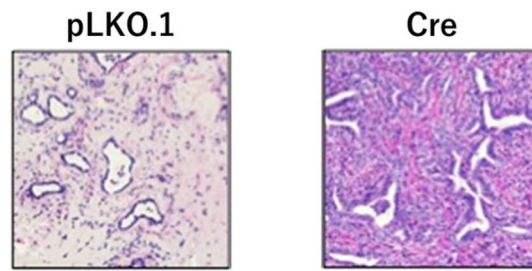


図 27. *Kras*<sup>LSL-G12D/+</sup>; *Trp53*<sup>flax/flax</sup> マウス胆管オルガノイドより生じた皮下腫瘍の組織像

図 26 の皮下腫瘍のヘマトキシリン・エオシン染色像。 *Cre* を導入されたオルガノイドは異形成の特徴を有し、広範な間質反応を伴う腫瘍を生じた[26]。

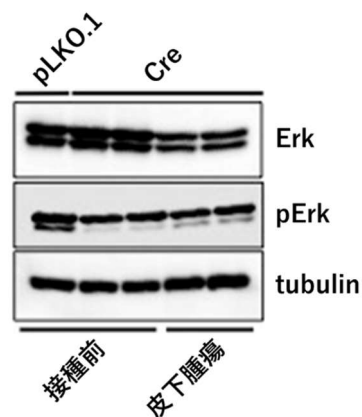


図 28. *Kras*<sup>LSL-G12D/+</sup>; *Trp53*<sup>flax/flax</sup> マウス胆管オルガノイドの ERK 経路に関するウェスタンプロット

ヌードマウスへの接種前と皮下腫瘍由来（接種後）のオルガノイドにおける ERK 経路を解析した。皮下接種前のオルガノイドにおける **Erk** のリン酸化は、 *Cre* を介した変異 *Kras* の発現および *p53* 欠失によって抑制された。一方、皮下腫瘍由来のオルガノイドにおいては **Erk** のリン酸化が部分的に回復した[26]。

## 第 2 節 *Kras* 活性化変異以外のがん遺伝子 (*Pik3ca*, *FGFR2-AHCYL1* 融合遺伝子) による腫瘍形成の検討

### 1. 2. 1 *Pik3ca* 変異による胆管オルガノイドからの非腫瘍性嚢胞形成

次に腫瘍形成が他のがん遺伝子によっても起こり得るかを検討した。*Pik3ca* は PI3K のアルファサブユニットをコードする。PI3K 経路の恒常的活性化は ICC において頻繁に観察され[17][18]、最も典型的には H1047R のような活性化点突然変異によるものである。そこで *R26-Pik3ca<sup>H1047R</sup>* マウス由来のオルガノイドを使用した。これは loxP に隣接する TpA リプレッサーが Cre を介して除去されることで、*Rosa26* 遺伝子座にノックインされた *Pik3ca<sup>H1047R</sup>* が転写される[28]。レンチウイルスを用いて *Cre* を導入して、遺伝子組み換えが成功し (図 29)、PI3K の重要な下流エフェクターである AKT のリン酸化が増強されていることを確認した (図 30)。sh*Pten* と sh*Cdkn2a* を導入した後、*Pten* のノックダウンならびに AKT の過剰リン酸化、および p16<sup>Ink4a</sup> のノックダウンをそれぞれ確認した (図 30)。しかしながら、ヌードマウスへ接種すると、検討した 3 症例すべてにおいて非腫瘍性の単純嚢胞または多房性嚢胞のみが誘発され、固形腫瘍は認められなかった (図 31)。組織学的には、嚢胞の内腔は単層上皮または乳頭状突起によって覆われていたが、どちらの shRNA の導入によっても異形成は誘導されなかった (図 32)。

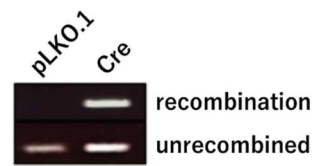


図 29. *R26-Pik3ca<sup>H1047R</sup>* マウス胆管オルガノイドのゲノム PCR

上段のバンドは遺伝子組み換え後に現れる PCR 増幅産物。下段のバンドは *Rosa26* 遺伝子座およびノックインされた *Pik3ca<sup>H1047R</sup>* 遺伝子にまたがる PCR 増幅産物。 *Cre* 導入による遺伝子組み換えが確認された[26]。

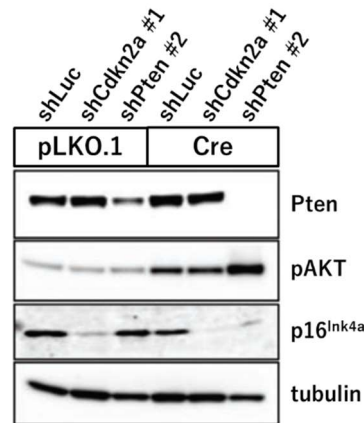


図 30. *R26-Pik3ca<sup>H1047R</sup>* マウス胆管オルガノイドへの遺伝子導入後のウェスタンブロット

最初に *Cre* または pLKO.1 を導入し、その後、*Cdkn2a* または *Pten* を標的とする shRNA を導入した *R26-Pik3ca<sup>H1047R</sup>* マウス胆管オルガノイドを解析した。sh*Luc* を導入したオルガノイドと比較して、Pten と p16<sup>Ink4a</sup> のノックダウンが確認された。pAKT は *Cre* を介した *Pik3ca<sup>H1047R</sup>* の誘導により発現が増し、Pten ノックダウンによりさらに増加した[26]。tubulin はローディングコントロール。

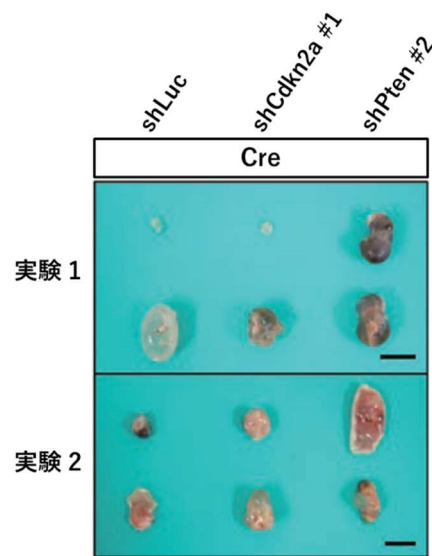


図 31. *R26-Pik3ca<sup>H1047R</sup>* マウス胆管オルガノイドより生じた皮下嚢胞

2 回の独立した実験の結果を示す。実験 1 では凝血塊を伴う単房性または多房性嚢胞が誘発された。実験 2 では多房性嚢胞のみが誘発された[26]。スケールバーは 1 cm。

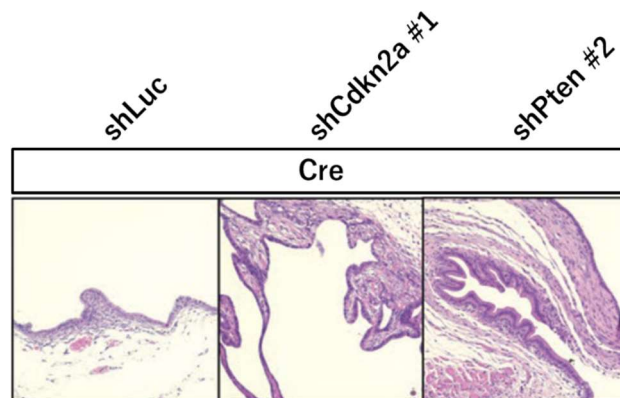


図 32. *R26-Pik3ca<sup>H1047R</sup>* マウス胆管オルガノイドより生じた皮下嚢胞の組織像

図 31. 実験 2 で生じた嚢胞の組織像を示す。*shLuc* を導入したオルガノイドでは嚢胞の内腔は異型のない単層の上皮細胞で覆われていた(左)。*shCdkn2a* または *shPten* を導入したオルガノイドでは、部分的に内腔へ突出した上皮細胞を認めた (中および右) [26]。

続いて *Cre* の導入により PI3K の活性化および p53 の欠失を同時に生じる *R26-Pik3ca<sup>H1047R</sup>; Trp53<sup>flox/flox</sup>* マウス胆管オルガノイドを用いて検討した。*Cre* 遺伝子導入によって PI3K 経路の活性化と p53 欠失とが同時に生じた場合 (図 33)、検討した 3 症例すべてで基本的に嚢胞が認められた。1 症例のみ固形腫瘍様の結節が例外的に発生したが (図 34)、組織学的には異型のない腺構造を示した (図 35)。PI3K 経路および ERK 経路に関する検討では、*Cre* 導入によりリン酸化 AKT の発現が増加しており、PI3K 経路の活性化を認めた (図 36)。ERK 経路については、皮下腫瘍由来のオルガノイドでは、皮下接種前よりもリン酸化 Erk の発現が増加しており、活性化を示した。しかし、皮下接種前には発現の増加を認めておらず、*Cre* 導入による PI3K 経路の活性化および p53 欠失の影響は受けなかった (図 36)。

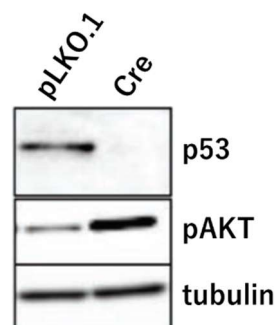


図 33. *R26-Pik3ca<sup>H1047R</sup>; Trp53<sup>flox/flox</sup>* マウス胆管オルガノイドへの *Cre* 導入後のウェスタンブロット

*Cre* を介した PI3K 経路の活性化および p53 欠失が確認された[26]。



図 34. *R26-Pik3ca<sup>H1047R</sup>; Trp53<sup>flax/flax</sup>* マウス胆管オルガノイドより生じた皮下結節

パネル上段の *Cre* を導入したオルガノイド（右）のみが触知可能な結節（矢頭）を生じた。パネル下段は摘出した皮下結節。右側の結節は主に嚢胞性腫瘍だったが、単一の固形腫瘍が含まれていた[26]。スケールバーは 1 cm。パネル下の数値は腫瘍発生率。

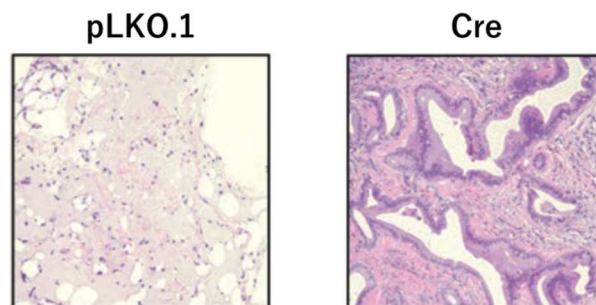


図 35. *R26-Pik3ca<sup>H1047R</sup>; Trp53<sup>flax/flax</sup>* マウス胆管オルガノイドより生じた皮下結節の組織像

図 34 で生じた皮下結節のヘマトキシリン・エオシン染色像を示す。pLKO.1 の導入では腺管構造は観察されなかった。*Cre* 遺伝子導入により生じた固形腫瘍（図 34. \*）では過形成を伴う腺管構造が認められた[26]。

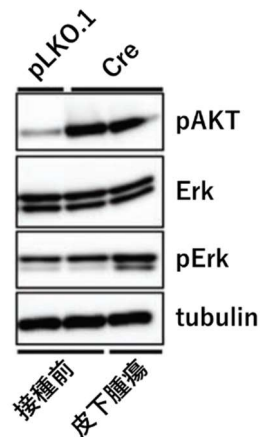


図 36. *R26-Pik3ca<sup>H1047R</sup>; Trp53<sup>flox/flox</sup>* マウス胆管オルガノイドの PI3K 経路および ERK 経路に関するウェスタンブロット

*Cre* 導入により pAKT の発現が増加しており、PI3K 経路の活性化を認めた。一方、ERK 経路については、皮下腫瘍由来のオルガノイドにおいて皮下接種前よりも Erk の活性化を認めた。pErk は皮下接種前には発現の増加を認めておらず、*Cre* 導入による PI3K 経路の活性化および p53 欠失の影響は受けなかった[26]。

### 1. 2. 2 胆管オルガノイドにおける *FGFR2-AHCYL1* 融合遺伝子による腫瘍形成能の検討

*FGFR2-AHCYL1* は、ICC において検出が報告されている最近同定された融合遺伝子である[4]。*FGFR2* 融合遺伝子と *Kras* 変異は ICC において相互に排他的であると報告されているが[4]、*FGFR2* 融合遺伝子は *Kras* の下流である ERK 経路を強力に活性化することから[17]、*FGFR2* 融合遺伝子と *Kras* 変異は同じシグナル伝達経路の異常をもたらすことを強く示唆している。ICC の発がんにおける *FGFR2* 融合遺伝子の役割を検討するために、マウス胆管オルガノイドに FLAG タグを付した *FGFR2* 融合遺伝子をレトロウイルスベク



ターにより導入し、遺伝子導入された細胞を G418 で選択した。しかしながら、オルガノイドにおいて融合タンパク質の発現は FLAG 抗体を用いて検出されなかった。一方で、陽性コントロールである GFP は発現が確認されたことから、ウイルスベクターの感染性に関する問題は否定的であった（図 37）。さらに、FGFR2 融合タンパク質は NIH3T3 細胞においては高度に発現され（図 37）、紡錘状の形態変化をもたらした（図 38）。加えて、以前に報告されたようにヌードマウスにおける急速な腫瘍の増大（図 39）が観察された[4]。一方、*FGFR2* 融合遺伝子が導入されたオルガノイドにおいて p16<sup>Ink4a</sup> が誘導され（図 40）、その発癌特性と一致しており、オルガノイドにおける融合遺伝子の発現が示唆された。実際にゲノムへの組み込みの成功および融合遺伝子の mRNA レベルでの発現は、ゲノム PCR（図 41）および RT-PCR（図 42）によってそれぞれ確認された。これらの結果は、*FGFR2* 融合遺伝子がオルガノイドに導入されたが、その遺伝子産物は NIH3T3 細胞とは異なる方法で処理される可能性が示唆された。

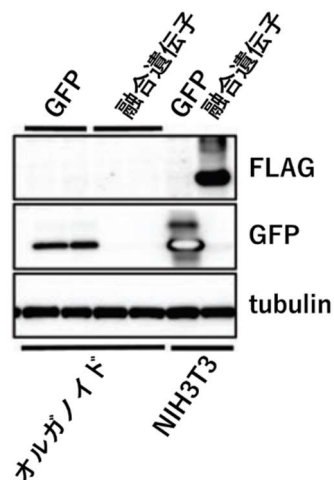


図 37. *FGFR2-AHCYL1* 融合遺伝子を導入したオルガノイドおよび NIH3T3 細胞のウェスタンブロット

FLAG タグを付した *FGFR2* 融合遺伝子または *GFP* をコードするレトロウイルスベクターを胆管オルガノイドまたは NIH3T3 細胞へ導入した。オルガノイドにおいて融合タンパク質は検出されなかったが、NIH3T3 細胞においては高度に発現された[26]。

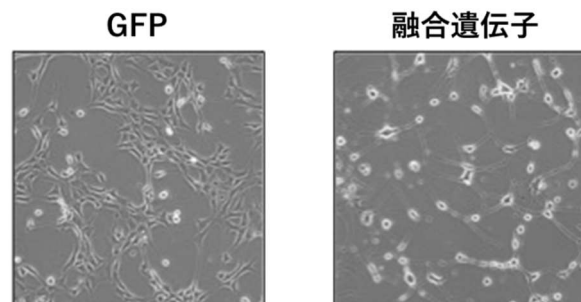


図 38. *in vitro* での *FGFR2-AHCYL1* 融合遺伝子による NIH3T3 細胞の形質転換

*FGFR2-AHCYL1* 融合遺伝子（右）の導入により、紡錘状の形態変化が誘発された。*GFP*（左）の導入では形態変化は認められなかった[26]。

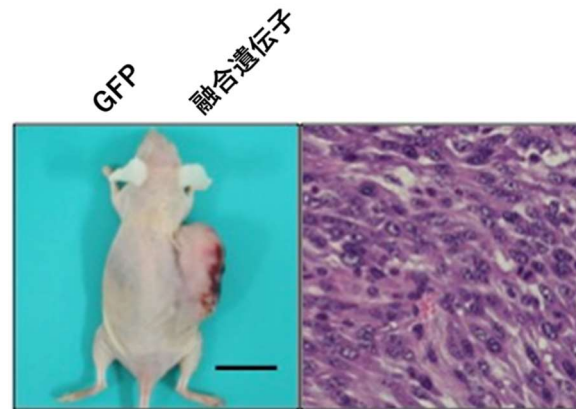


図 39. *in vivo* での *FGFR2-AHCYL1* 融合遺伝子による NIH3T3 細胞の形質転換

*FGFR2-AHCYL1* 融合遺伝子を導入した NIH3T3 細胞をヌードマウスへ皮下接種後、2 週間で腫瘍を発症した（左）。スケールバーは 2cm。皮下腫瘍のヘマトキシリン・エオシン染色（右）では紡錘状細胞の大量増殖を認めた[26]。

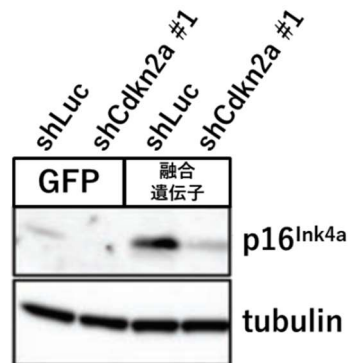


図 40. *FGFR2* 融合遺伝子が導入されたオルガノイドのウェスタンブロット

*FGFR2* 融合遺伝子が導入された胆管オルガノイドにおいて  $p16^{\text{Ink4a}}$  が選択的に誘導された[26]。

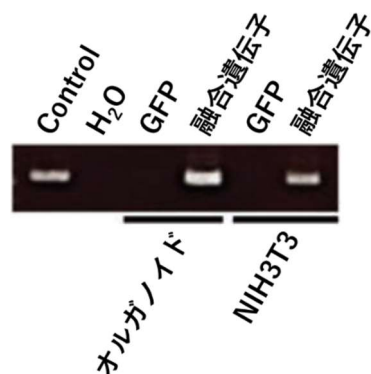


図 41. *FGFR2* 融合遺伝子のゲノム PCR

レトロウイルスベクターによる *FGFR2* 融合遺伝子の導入が確認された。ポジティブコントロールとして融合遺伝子のレトロウイルスベクターを使用[26]。

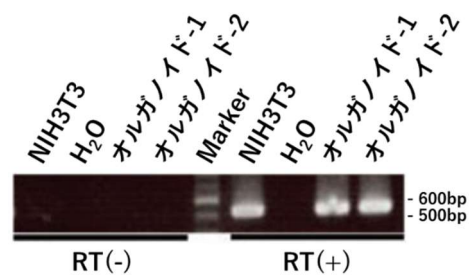


図 42. *FGFR2* 融合遺伝子の RT-PCR

オルガノイドにおける *FGFR2* 融合遺伝子の転写レベルでの発現は 2 回の独立した遺伝子導入で確認された (PCR 増幅産物 550bp) [26]。

### 1. 2. 3 長期培養胆管オルガノイドにおける *FGFR2* 融合遺伝子の腫瘍形成

NIH3T3 細胞は *Cdkn2a* 遺伝子座が存在せず[37]、*FGFR2* 融合遺伝子によって形質転換されたという事実に基づいて (図 38, 図 39) [4]、*FGFR2* 融合遺伝子を *shCdkn2a* と共に胆管オルガノイドに導入した (図 40)。しかしながら、遺伝子導入した 6 症例のいずれにおいても触知可能な結節は認められなかった。腫瘍の発生に重要な遺伝的または後天的な異常が今回の標準的なプロトコールによって得られたオルガノイドには欠けている可能性が示唆された。次に 2 週齢のマウスの肝臓から採取し、20 回継代した後に凍結保存したオルガノイドを用いて、同様の実験を行った。これらのオルガノイドに *FGFR2* 融合遺伝子および *shRNA* を導入すると固形腫瘍が誘導されたが、*GFP* を導入したオルガノイドでは Matrigel プラグおよび非腫瘍性小結節のみを生じた (図 43)。特に *FGFR2* 融合遺伝子に加えて、*shCdkn2a* を導入することでより大きな腫瘍を形成する傾向がみられた (図 43)。固形腫瘍の組織学的検査では、異形成が確認された (図 44)。これらの結果は、同じ長期培養細胞を用いた別の実験においても再現された (表 3)。従って、長期培養でオルガノイドに未知の遺伝的またはエピジェネティックな異常が蓄積された状況ではあるが、融合遺伝子は *Cdkn2a* 抑制と協調して、胆管オルガノイドからの腫瘍形成を促進する可能性が示唆された。しかし、皮下腫瘍を形成したオルガノイドにおいても FLAG 抗

体による融合タンパク質の発現は確認できなかった (図 45)。一方、NIH3T3 細胞においては融合遺伝子が予想通り ERK 経路の活性化を誘導していることが、ウェスタンブロットにより確認された。しかし、皮下接種前または皮下腫瘍由来のオルガノイドでは融合遺伝子導入による Erk リン酸化の変化は認められなかった (図 45)。 *Trp53<sup>flx/flx</sup>* マウスおよび *R26-Pik3ca<sup>H1047R</sup>* マウス胆管オルガノイドを用いて同様の実験を行うことにより、融合遺伝子と協調しうるシグナル伝達経路を探索したが、培養初期のオルガノイドに腫瘍は発生しなかった (表 3)。

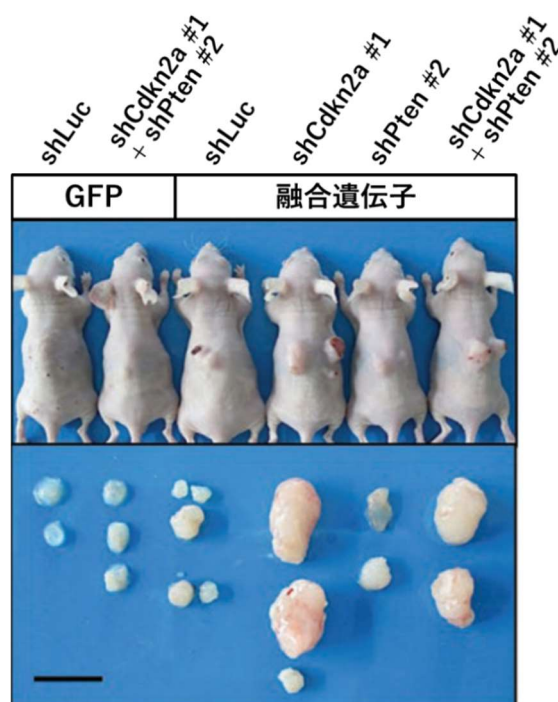


図 43. *FGFR2* 融合遺伝子を導入した胆管オルガノイドより生じた皮下腫瘍  
 パネル上段はヌードマウスの皮下腫瘍。パネル下段は摘出した皮下腫瘍。 *GFP* を導入したオルガノイドからは平坦な Matrigel プラグが誘導され、 *FGFR2* 融合遺伝子を導入したオルガノイドからは固形腫瘍を生じた[26]。スケールバーは 1 cm。

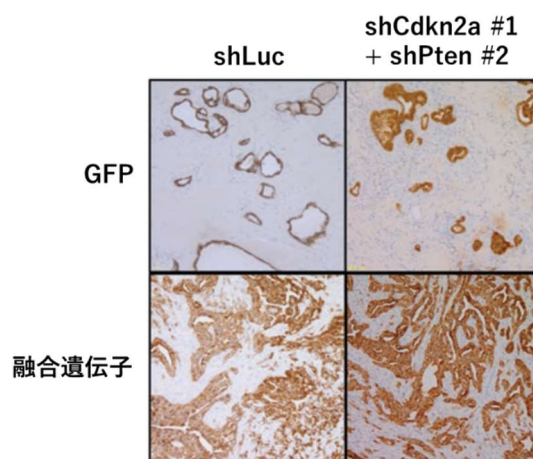


図 44. *FGFR2* 融合遺伝子を導入した胆管オルガノイドより生じた皮下腫瘍の CK19 免疫染色像

*GFP* を導入した胆管オルガノイドでは腫瘍性変化は認められなかったが、*FGFR2* 融合遺伝子の導入により異形成が確認された[26]。

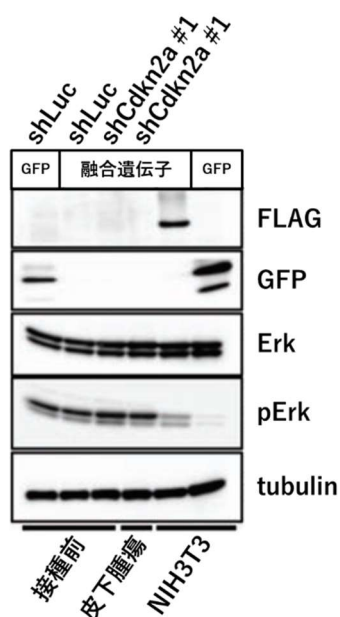


図 45. ERK 経路に関するウェスタンブロット

ヌードマウスへの接種前、皮下腫瘍由来（接種後）のオルガノイドおよび NIH3T3 細胞の ERK 経路について解析した。皮下腫瘍を形成したオルガノイドにおいても FLAG 抗体による融合タンパク質の発現は確認されなかった。NIH3T3 細胞においては融合遺伝子導入により ERK 経路の活性化が誘導されたが、オルガノイドではリン酸化 Erk の発現変化は認められなかった[26]。

Genotype	cDNA	shRNA	Tumor
<i>Wild type</i>	<i>GFP</i>	<i>shLuc</i>	0/8
		<i>shCdkn2a + shPten</i>	0/8
	<i>FGFR2-AHCYL1</i>	<i>shLuc</i>	2/8
		<i>shCdkn2a</i>	2/8
		<i>shPten</i>	2/8
		<i>shCdkn2a + shPten</i>	2/8
Genotype	cDNA	cDNA	Tumor
<i>Trp53<sup>flox/flox</sup></i>	<i>GFP</i>	<i>Cre</i>	0/3
		<i>pLKO.1</i>	0/3
	<i>FGFR2-AHCYL1</i>	<i>Cre</i>	0/3
		<i>pLKO.1</i>	0/3
<i>R26-Pik3ca<sup>H1047R</sup></i>	<i>GFP</i>	<i>Cre</i>	0/3
		<i>pLKO.1</i>	0/3
	<i>FGFR2-AHCYL1</i>	<i>Cre</i>	0/3
		<i>pLKO.1</i>	0/3

表 3. *FGFR2* 融合遺伝子による腫瘍形成の結果

長期培養胆管オルガノイドに *FGFR2* 融合遺伝子を導入することで腫瘍形成を認めた。腫瘍形成において融合遺伝子と協調しうるシグナル伝達経路を探索するため、*Trp53<sup>flox/flox</sup>* マウスおよび *R26-Pik3ca<sup>H1047R</sup>* マウス胆管オルガノイドに *FGFR2* 融合遺伝子を導入したが、腫瘍形成は認められなかった[26]。



## 第 2 章 胆嚢オルガノイドに対するがん関連遺伝子導入

### 2.1 胆嚢オルガノイドからの *Kras* 依存性腫瘍形成

胆嚢特異的に発現する既知の遺伝子が存在しないため、胆嚢特異的な遺伝子ターゲティングは技術的に困難である。そのため、胆嚢を物理的に単離し、そのオルガノイド培養ならびにレンチウイルスベクターによる遺伝子導入を行った (図 46)。検討するがん関連遺伝子としては、*Kras*, *p16*, *Pten* とした。*Kras* に関しては、ヒトの胆嚢がんにおける *KRAS* 変異率は、最近の研究では 0% [17] から 7.8% [38]、22% [39] まで様々な報告があるが、*KRAS* 変異は少なくとも膵胆管合流異常に関連した胆嚢がんにおいては主要な変異の一つである [40][41]。*p16* については *Cdkn2a* が胆嚢がんの 5.9% で変異しているとされている [38]。一方、*Pten* については、胆嚢を含む腹部臓器における *Pten* 欠失ならびに *Kras* 活性化を組み合わせたマウスで胆嚢がん発生が以前に報告されていることから [24]、妥当性があると考えられた。*Kras<sup>LSL-G12D</sup>+* マウス胆嚢オルガノイドに連続的に遺伝子導入を行い、*Kras* 活性化および *Cdkn2a* または *Pten* の抑制を行った (図 47)。これら遺伝子を導入した胆嚢オルガノイドをヌードマウスに接種すると、検討した 4 つの場合のいずれにおいても、*Kras* 活性化なしに腫瘍は発生しなかった (図 48)。*Cre + shLuc* を有するオルガノイド (*Kras* 活性化単独) は、4 症例中 1 症例のみで腫瘍を発症したが、*Cre +*

*shCdkn2a* (*Kras* 活性化および *p16* ノックダウン) および *Cre+shPten* (*Kras* 活性化および *Pten* ノックダウン) を有するオルガノイドは、それぞれ 4 症例中 3 症例および 4 症例中 2 症例で固形腫瘍を発症した (図 48)。組織学的には、*Pten* ノックダウンまたは *Kras* 活性化単独では正常から過形成のみが誘導されたが、*Kras* 活性化に加えて、*Cdkn2a* または *Pten* ノックダウンを組み合わせると、異形成を伴う腫瘍発生をもたらした (図 49)。*Kras* 活性化および *shCdkn2a* の導入は腸上皮化生から低分化腫瘍まで様々な組織学的グレードの病変を協調的に誘導したが (図 50)、腸上皮化生由来のオルガノイドを再度ヌードマウスへ皮下接種すると最終的に低分化腫瘍が発生した (図 50)。ゲノム PCR ではヌードマウス皮下接種前のオルガノイド中には、*Kras* 活性化が誘導されなかった細胞が検出された。一方、皮下接種後に形成された腫瘍由来オルガノイドでは検出不能となり (図 51)、腫瘍形成における *Kras* 活性化細胞の必要性が示唆された。

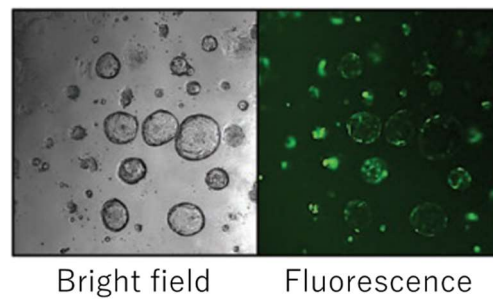


図 46. レンチウイルスベクターによる胆嚢オルガノイドへの *GFP* 遺伝子導入

*GFP* 遺伝子導入 2 日後の位相差顕微鏡画像（左）および蛍光画像（右）を示す。レンチウイルスベクターによる遺伝子導入が確認された[26]。



図 47. *Kras*<sup>LSL-G12D/+</sup> マウス胆嚢オルガノイドへ遺伝子導入後のウェスタンブロット

*Cre* の導入により変異 *Kras* の発現を認めた（左）。*shCdkn2a*, *shPten* 導入によりそれぞれ *p16*, *Pten* の発現抑制が確認された（右）[26]。

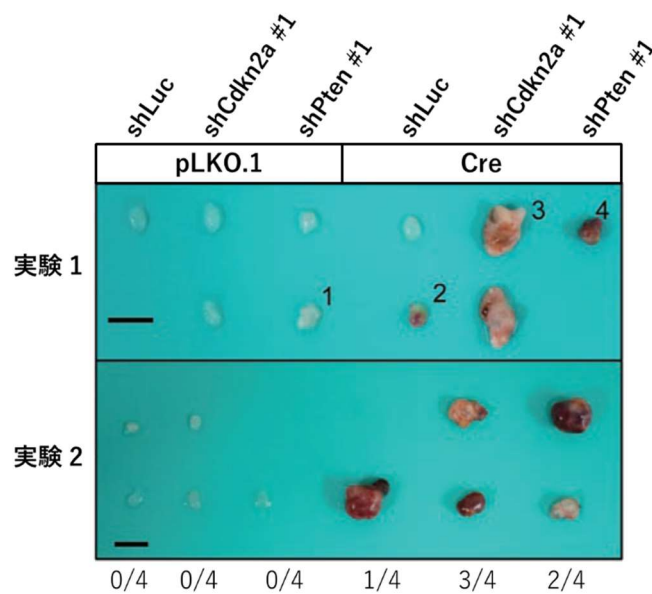


図 48.  $Kras^{LSL-G12D/+}$  マウス胆嚢オルガノイドより生じた皮下結節

$Kras^{LSL-G12D/+}$  マウス胆嚢オルガノイドに各種遺伝子導入を行い、 $Kras$  活性化および  $Cdkn2a$  または  $Pten$  のノックダウンを行った。2 回の独立した実験で摘出された皮下結節を示す。pLKO.1 を導入したオルガノイド ( $Kras$  非活性化) では腫瘍は誘導されなかった[26]。スケールバーは 1 cm。パネル下の数値は腫瘍発生率。

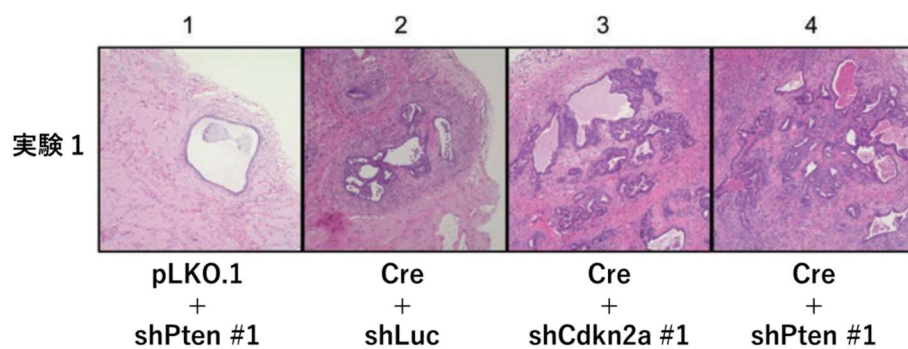


図 49.  $Kras^{LSL-G12D/+}$  マウス胆嚢オルガノイドより生じた皮下結節の組織像

図 48 の結節 #1~4 のヘマトキシリン・エオシン染色像を示す。 $Kras$  活性化に加えて、 $Cdkn2a$  または  $Pten$  ノックダウンを組み合わせると、異形成を認めた[26]。

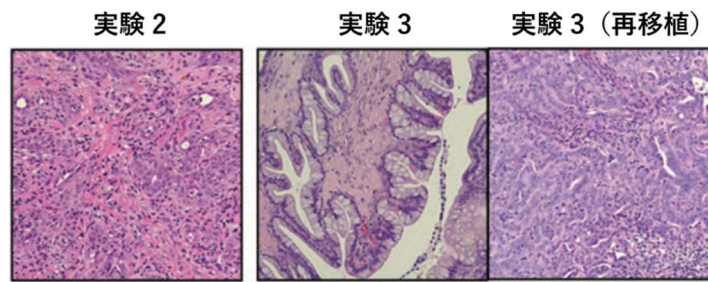


図 50. *Kras* 活性化および *Cdkn2a* ノックダウンにより生じた皮下結節の組織像と再移植によって生じた皮下結節の組織像

*Kras* 活性化および *Cdkn2a* ノックダウンにより生じた皮下結節のヘマトキシリン・エオシン染色像を示す。実験 2 (左) では低分化腫瘍、実験 3 (中) では腸上皮化生を認めた。腸上皮化生由来のオルガノイドを再移植すると低分化腫瘍を生じた (右) [26]。

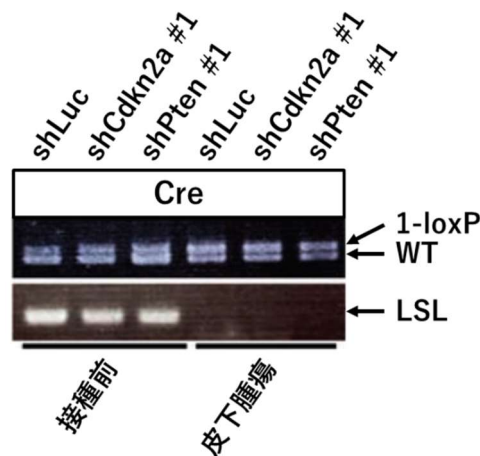


図 51. *Kras* 遺伝子座のゲノム PCR

ヌードマウスへの皮下接種前および皮下腫瘍由来の胆嚢オルガノイドを分析した。*Kras*<sup>LSL-G12D/+</sup> マウス胆嚢オルガノイドは Cre/loxP システム (図 17 左図) を用いており、*Cre* 遺伝子導入により変異 *Kras* を発現する。パネル上段は LSL (1-loxP) 配列除去後の変異型 *Kras* および *Kras* 野生型遺伝子 (WT) の検出。パネル下段は loxP-Stop-loxP (LSL) 配列の検出。LSL 配列は皮下接種前には残存していたが、皮下接種後には消失した[26]。

胆嚢がんにおける *Trp53* の高い突然変異率[17][38]に基づいて、*Kras<sup>LSL-G12D</sup>*; *Trp53<sup>flx/flx</sup>* マウス胆嚢オルガノイドに *Cre* を導入した (図 52)。実験した 3 症例すべてにおいて固形腫瘍が発生した (図 53)。一方、*Cre* を導入しなかった症例では、平坦な多房性嚢胞が発生した (図 53)。組織学的には、固形腫瘍は低分化腫瘍の特徴を示した (図 54)。ERK 経路に関するウェスタンブロットでは、Erk 活性化に関して、p53 の状態によって変異 *Kras* の発現は異なる結果をもたらすことが明らかとなった。すなわち、p53 発現下では、Erk は予想通り *Kras* 活性化時にリン酸化された (図 55) が、胆管オルガノイドでの観察結果と同様に p53 欠失では、脱リン酸化された (図 28)。

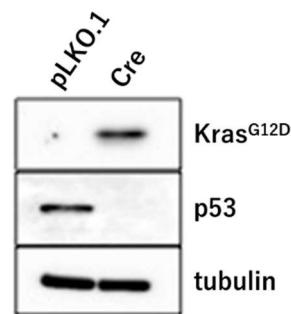


図 52. *Kras<sup>LSL-G12D</sup>*; *Trp53<sup>flx/flx</sup>* マウス胆嚢オルガノイドへの *Cre* 導入後のウェスタンブロット

*Cre* を介した変異 *Kras* の発現および p53 の欠失が確認された[26]。



図 53. *Kras<sup>LSL-G12D</sup>+*; *Trp53<sup>flx/flx</sup>* マウス胆嚢オルガノイドから生じた皮下結節  
 パネル上段はヌードマウスの皮下結節。 *Cre* を導入したオルガノイド（右）は、出血を伴う触知可能な結節を生じた（黒矢頭）。pLKO.1 を導入したオルガノイド（左）は、わずかに隆起した病変（白矢頭）を認めた。パネル下段は摘出した皮下結節。嚢胞性病変（左）と固形腫瘍（右）であった[26]。スケールバーは 1 cm。パネル下の数値は腫瘍発生率。

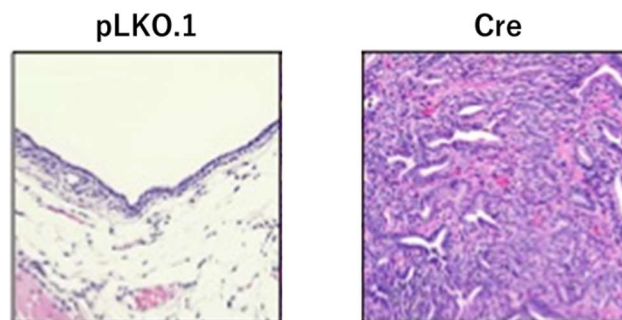


図 54. *Kras<sup>LSL-G12D</sup>+*; *Trp53<sup>flx/flx</sup>* マウス胆嚢オルガノイドから生じた皮下結節の組織像

皮下結節のヘマトキシリン・エオシン染色像を示す。 *Cre* 導入オルガノイドは、線維形成反応を伴う異形成を認めた。pLKO.1 導入オルガノイドは、単層上皮を伴う嚢胞を認めた[26]。

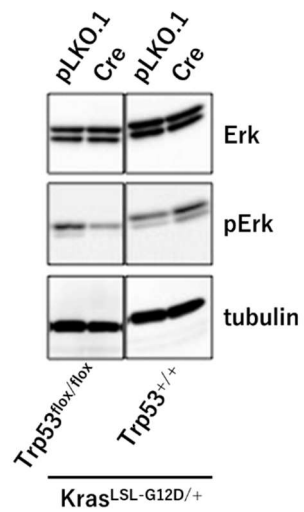


図 55. 皮下接種前の胆嚢オルガノイドの ERK 経路に関するウェスタンプロット

*Kras*<sup>LSL-G12D/+</sup>; *Trp53*<sup>flox/flox</sup> マウスと *Kras*<sup>LSL-G12D/+</sup>; *Trp53*<sup>+/+</sup> マウスの胆嚢オルガノイドを解析した。p53 発現下では *Kras* 活性化により Erk はリン酸化されたが、p53 欠失では *Kras* 活性化により Erk は脱リン酸化された[26]。



## 総括

*Kras* 変異単独では腫瘍形成には不十分であったが、腫瘍抑制遺伝子のノックダウンを組み合わせることで腫瘍形成を認めた (図 56)。 *Pik3ca* 変異および *FGFR2* 融合遺伝子は、*Kras* の重要な下流経路と関連しているが、胆管オルガノイドからの腫瘍形成の誘導は *Kras* 変異より効力が低いと考えられた。

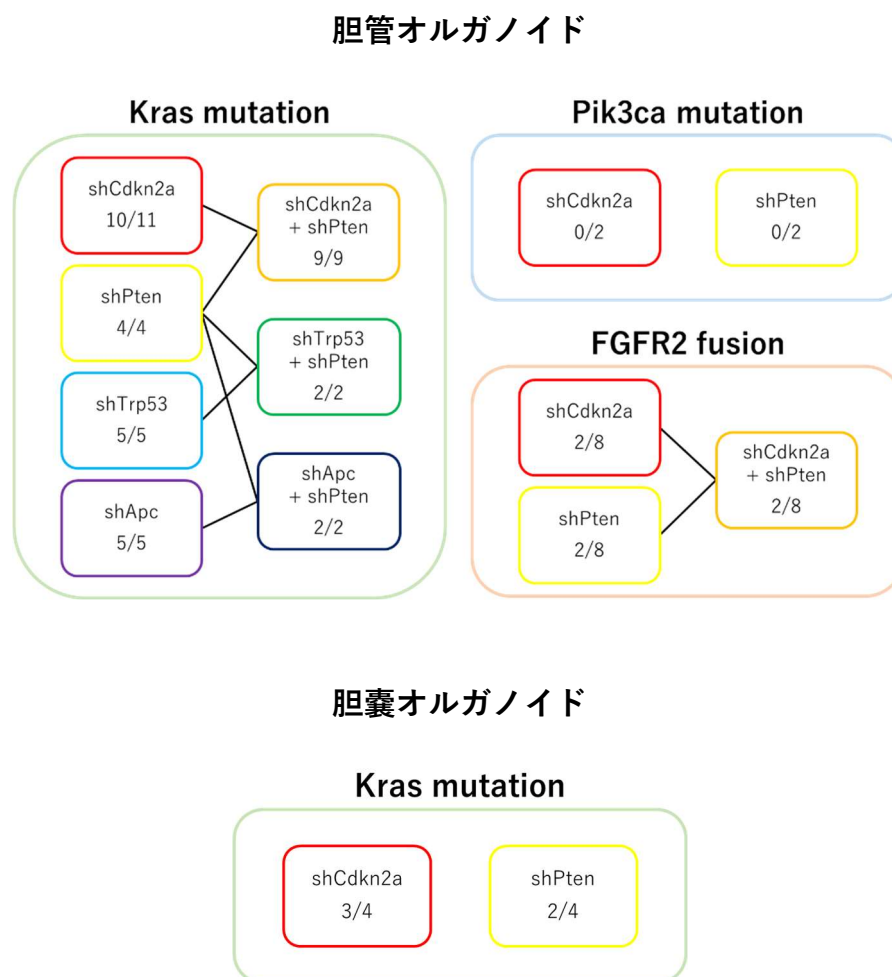


図 56. 胆管・胆嚢オルガノイドによる多段階発がんモデルのまとめ

各遺伝子変異における腫瘍発生率を示す。*FGFR2* 融合遺伝子は長期培養オルガノイドに導入した際のみ腫瘍を形成した。

## 考 察

*Kras* は代表的ながん遺伝子であり、ヒト胆道がん臨床検体のゲノム解析においても中心的な変異であると報告されている。この *Kras* 変異により実験的に誘導される胆管腫瘍は、これまでのところ *Kras* 変異を導入した遺伝子改変マウスモデルを用いた個体レベルでの検討を中心になされてきており、腫瘍形成能や組織型などがよく再現されていることが報告されている[19][20][24]。しかし、マウスを用いることで個体レベルでの発がんが検証できるという利点を有する一方で、上皮細胞の異常にとどまらず免疫系細胞や局所の微小環境といった要素を含む複雑系であること、時間や費用がかかること、検討する遺伝子変異数の組み合わせが増えるほど多数のマウスが必要となり、実現が困難であることなどの課題も有していた。本研究においては、近年発展している細胞の三次元オルガノイド培養を応用し、マウス個体の肝臓および胆嚢より樹立した胆管・胆嚢オルガノイドへの *in vitro* 遺伝子導入を介して、正常胆道上皮からの胆道発がんが単純かつ迅速な方法で達成できることを証明した。

初期の *in vivo* 研究結果と一致して、*Kras*<sup>G12D</sup> 変異単独ではマウス胆管オルガノイドから免疫不全マウス皮下における異所性腫瘍形成には不十分であった。具体的には、*Kras*<sup>LSL-G12D</sup> マウス胆管オルガノイドに *Cre* を単独で導入した場合に皮下結節は認められなかった。一方、*Cre* + *shLuc* の導入では 12 例中

4 例に皮下結節を認めたが、組織学的に非腫瘍性病変であった。皮下結節を生じた原因としては、*Cre* 単独の導入に対して、2 回のレンチウイルスベクター導入によりゲノムへの非特異的な組み込みが影響した可能性がありうる。*Kras* 活性化変異に加えて、腫瘍抑制遺伝子のノックダウンを組み合わせると腫瘍の発生をもたらした。これらの結果より *Kras*<sup>G12D</sup> 依存性胆道がん発生の大部分の根底に遺伝的要因がある可能性が示唆された。充実性腫瘍とともに、内部に漿液を含む拡張した嚢胞が高頻度に観察された。これらの嚢胞には充実部分を伴うか、あるいは乳頭状突出を有する病変の内包がみられた。ヒトでも胆管内乳頭状腫瘍 (IPNB, intraductal papillary neoplasm of bile duct) [42][43]において乳頭状病変がみられ、IPNB と遺伝子変異との関連について探索するのに本モデルが有用である可能性がある。オルガノイドに *Kras*<sup>G12D</sup> および *shCdkn2a* を遺伝子導入することにより前癌病変や中等度の異型を有する腫瘍性病変が誘導された。加えて *Pten* ノックダウンあるいは前癌病変オルガノイドを再移植することにより、さらに高度な異型を有する腫瘍への進行を認めた。したがって、オルガノイドによるアプローチは、胆道腫瘍形成の新たな多段階発がんモデルとして有用であると考えられる。

一方で、これら 2 つのアプローチの間には標的細胞とその結果生じる腫瘍サブタイプとに大きな違いがある。第一に肝臓特異的 GEM は基本的に *Alb-Cre*

マウスを用いて作製され、遺伝子組み換えは胎児肝臓の肝前駆細胞または肝細胞で起こる。一方、三次元オルガノイド培養は、マウス成体肝臓を用いている。

第二に GEM は主に HCC と ICC の両方を生じるが、オルガノイドを用いたアプローチでは、ICC またはその前癌病変のみを生じ、HCC は認められなかった。さらに GBC に関しては、これまでの GEM は、*CK19-Cre*[20]、*CK5-Cre*[25]、または *Ah-Cre*[24] マウスとの交配によって作製され、非標的臓器の上皮細胞からも腫瘍を生じた。一方、オルガノイドは物理的に単離した胆嚢を用いている。マウス成体肝臓から作製したオルガノイドが、数か月間安定的に増殖したことを考えると、これらのオルガノイドは前駆細胞を含むと考えられる。しかし、機序は不明であるが、肝臓由来オルガノイドの遺伝子発現において *Ck19/Alb* 比が高く、今回の三次元培養の条件下では、肝細胞系列よりもむしろ胆管細胞系列へ偏向した分化を示唆している。オルガノイドにおけるそのような分化傾向が胆管系腫瘍の選択的誘導に寄与した可能性がある。興味深いことに、このような ICC の選択的誘導は、胎児肝臓に変異 *Kras* および *Pten* 欠失を導入した GEM でも確認されたが、同様の遺伝子変異がマウス成体肝臓に導入された場合、HCC が選択的に生じた[20]。*Ck19* または *Ah* 発現細胞においては、同様の複合遺伝子変異により胆嚢に前癌病変から腫瘍性病変を誘導した。しかし、前胃または気管支において発生した病変による早期死亡のため

[20][24]、GBC 発生のモニタリングは早期に中断された。以上よりマウス成体肝臓由来オルガノイドからの ICC の特異的誘導および胆嚢由来オルガノイドからの胆嚢特異的腫瘍形成の両方が、GEM に対する本手法の利点となりうる。

ICC に関わるがん遺伝子である *Pik3ca*<sup>H1047R</sup> および *FGFR2-AHCYL1* 融合遺伝子は、*Kras* の重要な下流経路と関連しているが、肝臓由来オルガノイドからの腫瘍発生の誘導は弱かった。すべての実験が変異 *Kras* と同条件で行われたことを考慮すると、これらの遺伝子は ICC の発がんドライバー遺伝子としては、*Kras*<sup>G12D</sup> より効力が低いと考えられる。あるいは、BTC で普遍的にみられる *KRAS* 変異とは異なり、*FGFR2-AHCYL1* 融合遺伝子は ICC で排他的に検出されるので、肝胆道系幹細胞の微小環境または肝臓分化に依存して、肝臓由来細胞からの形質転換を誘導する可能性がある[17]。その他の可能性としては、本研究では実験していない他の遺伝子変異との協調により腫瘍を生じた可能性が考えられる。*FGFR2-AHCYL1* 融合遺伝子は、*Trp53* 欠失または *Pik3ca*<sup>H1047R</sup> 遺伝子導入の状況下でも腫瘍の発生を促進することはなかったが、若齢マウス由来の長期培養オルガノイドにおいてのみ腫瘍を誘発した。これらの細胞集団は未知の遺伝的またはエピジェネティックな異常を有しており、*FGFR2-AHCYL1* 融合遺伝子と協調して腫瘍発生を促進したと考えられる。従来の GEM では *Pik3ca* 変異による BTC 発がんモデルは存在しない。しかし、

hydrodynamic tail vein injection 法を用いた成体肝細胞への *Pik3ca*<sup>H1047R</sup> および *Yap*<sup>S127A</sup> の発現ベクター導入による ICC または HCC の発がんは、以前に報告されている[44]。関連する研究では、活性型 *Akt* と *Notch* との協調も報告がある[45]。肝臓における PI3K シグナル伝達経路の活性化は、本研究では対象としなかった他のシグナル伝達経路の活性化と協調して腫瘍形成を促進する可能性があり、これらはオルガノイドアプローチによる評価が期待される。

一方、今回のアプローチは、T 細胞による腫瘍拒絶反応、臓器特異的な微小環境、前駆細胞の肝細胞への分化といった、動物個体の発がんにおける基本的な要素を欠いている。その結果、今回のモデルで誘発された腫瘍は、ヒト胆道がんの完全な再現ではなく、部分的な反映にとどまっている可能性がある。こういったオルガノイドベースのアプローチの課題を回避する方法として、①遺伝子変異を導入したオルガノイドを免疫不全マウス皮下移植ではなく、同系マウスへの同所移植 (syngeneic orthotopic transplant model) による腫瘍の生成、②肝臓由来オルガノイドの肝細胞または胆道細胞への分化を制御する培養条件を確立し、より前駆細胞の性状を限定したうえで腫瘍形成を試みるなどが考えられる。しかしながら、今回のモデルであってもオルガノイドアプローチによって発がんの各段階における分子変化を評価することが可能となった。例えば、*Kras* 変異を有するオルガノイドのヌードマウス皮下移植で形成された腫瘍においては、

*Kras* 経路の下流にある *Erk* のリン酸化による活性化がみられた。一方で皮下移植前の *in vitro* のオルガノイドにおいては *Erk* のリン酸化はみられず、上皮細胞における *Kras* 変異が無条件に *Erk* の活性化を誘導するのではなく、皮下における微小環境や免疫細胞との相互作用の関与を示唆するものである。

さらに、*Kras* 活性化に加えて *Trp53* 欠失を組み合わせた場合は肝臓と胆嚢由来の双方のオルガノイドに対して強力に腫瘍形成を促進させるにもかかわらず、むしろ *Erk* の不活性化をもたらした。その正確なメカニズムは今のところ不明であり、今後の解析を要するが、*Kras*, *Trp53* にとどまらずヒト胆道がんで見られるその他の代表的な変異を遺伝子改変マウスモデルと今回のオルガノイドモデルとに導入して発がん実験を比較検討することで、胆道がんの詳細な発がんメカニズムの解析が可能となることが期待される。

結論として、本研究を通じて胆道がんの発がんに関連する遺伝子の相互作用を容易かつ直接的に検証することができる新しいモデルを確立した。*Kras* とそれに関連するがん遺伝子に焦点を当てた本研究に基づいて、BTC において一般的に認められる他の遺伝子変異についても発がんメカニズムのさらなる解明が期待される。さらに、本研究で作製された腫瘍を新規抗がん剤の薬剤スクリーニングに用いることで、将来の創薬に応用できる可能性がある。以上よりオルガノイド発がんモデルは、胆道がんに関する基礎研究およびトランスレーショナル

リサーチの双方の発展において有用であると考えられる。



## 結 語

マウス胆道系オルガノイドに対してがん関連遺伝子を導入することで、多段階発がん過程を再現した。変異型 *Kras* 単独での腫瘍形成能は低かったが、がん抑制遺伝子の不活化を組み合わせることにより肝内胆管癌および胆嚢癌を誘導し得ることを示した。*Pik3ca* などの *Kras* 以外のがん遺伝子とがん抑制遺伝子の不活化との組み合わせでは、変異型 *Kras* 導入時に認められたような発がん作用は得られなかった。本研究では胆道がんの多段階発がん過程の再現を通じて、発がんに関与する遺伝子の相互作用を簡便に検証可能な新規モデルを確立した。本モデルを用いることにより胆道がんの発がんメカニズムの解明およびその治療法の開発への寄与が期待される。

## 謝 辞

本研究について御指導御鞭撻を賜りました東京大学 消化器内科 小池和彦教授に深く感謝致します。

千葉県がんセンター研究所 発がん研究グループ 発がん制御研究部 筆宝義隆先生には本研究を実施する機会を与えて頂き、その遂行にあたって御指導御鞭撻を賜りました。深謝の意を表します。また、丸喜明博士には研究手法について御指導御鞭撻を賜るとともに研究遂行にあたり多岐に御協力頂き、心から感謝致します。そして、日々の研究に際して多大な御支援を頂きました発がん制御研究部の皆様には深く感謝致します。

東京大学 消化器内科 泉谷昌志先生には本研究の遂行および学位論文をまとめるにあたり御指導御鞭撻を賜りました。心より感謝の意を表します。

## 引用文献

1. Hanahan, D. & Weinberg, R. A. Hallmarks of cancer: the next generation. *Cell* 144: 646–674, 2011.
2. Fearon, E. R. & Vogelstein, B. A genetic model for colorectal tumorigenesis. *Cell* 61: 759–767, 1990.
3. Soda, M. *et al.* Identification of the transforming EML4-ALK fusion gene in non-small-cell lung cancer. *Nature* 448: 561–566, 2007.
4. Arai, Y. *et al.* Fibroblast growth factor receptor 2 tyrosine kinase fusions define a unique molecular subtype of cholangiocarcinoma. *Hepatology* 59: 1427–1434, 2014.
5. Shih, C., Shilo, B.-Z., Goldfarb, M. P., Dannenberg, A. & Weinberg, R. A. Passage of phenotypes of chemically transformed cells via transfection of DNA and chromatin. *Cell Biol.* 76: 5714–5718, 1979.

6. Nagy, A. Cre recombinase: the universal reagent for genome tailoring. *Genesis* 26: 99–109, 2000.
7. Deng, C. X. Conditional knockout mouse models of cancer. *Cold Spring Harb. Protoc.* 2014: 1217–1233, 2014.
8. Sato, T. *et al.* Single Lgr5 stem cells build crypt-villus structures in vitro without a mesenchymal niche. *Nature* 459: 262–265, 2009.
9. Onuma, K. *et al.* Genetic reconstitution of tumorigenesis in primary intestinal cells. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 110: 11127–11132, 2013.
10. Maru, Y., Orihashi, K. & Hippo, Y. Lentivirus-Based Stable Gene Delivery into Intestinal Organoids. *Methods Mol. Biol.* 1422: 13–21, 2016.
11. Maru, Y., Onuma, K., Ochiai, M., Imai, T. & Hippo, Y. Shortcuts to intestinal carcinogenesis by genetic engineering in organoids. *Cancer*

- Sci.* 110: 858–866, 2019.
12. Patel, T. Worldwide trends in mortality from biliary tract malignancies. *BMC Cancer* 2: 10, 2002.
  13. Tyson, G. L. & El-Serag, H. B. Risk factors for cholangiocarcinoma. *Hepatology* 54: 173–184, 2011.
  14. Rizvi, S. & Gores, G. J. Pathogenesis, Diagnosis, and Management of Cholangiocarcinoma. *Gastroenterology* 145: 1215–1229, 2013.
  15. Misra, S., Chaturvedi, A., Misra, N. C. & Sharma, I. D. Carcinoma of the gallbladder. *Lancet Oncol.* 4: 167–176, 2003.
  16. Razumilava, N. & Gores, G. J. Cholangiocarcinoma. *Lancet* 383: 2168–2179, 2014.
  17. Nakamura, H. *et al.* Genomic spectra of biliary tract cancer. *Nat.*

- Genet.* 47: 1003–1010, 2015.
18. Zou, S. *et al.* Mutational landscape of intrahepatic cholangiocarcinoma. *Nat. Commun.* 5: 5696, 2014.
  19. O'Dell, M. R. *et al.* Kras(G12D) and p53 Mutation Cause Primary Intrahepatic Cholangiocarcinoma. *Cancer Res.* 72: 1557–1567, 2012.
  20. Ikenoue, T. *et al.* A novel mouse model of intrahepatic cholangiocarcinoma induced by liver-specific Kras activation and Pten deletion. *Sci. Rep.* 6: 23899, 2016.
  21. Xu, X. *et al.* Induction of intrahepatic cholangiocellular carcinoma by liver-specific disruption of Smad4 and Pten in mice. *J. Clin. Invest.* 116: 1843–1852, 2006.
  22. Zender, S. *et al.* A critical role for notch signaling in the formation of cholangiocellular carcinomas. *Cancer Cell* 23: 784–795, 2013.

23. Lee, K.-P. *et al.* The Hippo-Salvador pathway restrains hepatic oval cell proliferation, liver size, and liver tumorigenesis. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 107: 8248–8253, 2010.
24. Marsh, V., Davies, E. J., Williams, G. T. & Clarke, A. R. PTEN loss and KRAS activation cooperate in murine biliary tract malignancies. *J. Pathol.* 230: 165–173, 2013.
25. Kiguchi, K. *et al.* Constitutive expression of ErbB-2 in gallbladder epithelium results in development of adenocarcinoma. *Cancer Res.* 61: 6971–6976, 2001.
26. Ochiai, M. *et al.* Kras-driven heterotopic tumor development from hepatobiliary organoids. *Carcinogenesis* 40: 1142–1152, 2019.
27. Morita, S., Kojima, T. & Kitamura, T. Plat-E: an efficient and stable system for transient packaging of retroviruses. *Gene Ther.* 7: 1063–1066, 2000.

28. Adams, J. R. *et al.* Cooperation between Pik3ca and p53 mutations in mouse mammary tumor formation. *Cancer Res.* 71: 2706–2717, 2011.
29. Jackson, E. L. Analysis of lung tumor initiation and progression using conditional expression of oncogenic K-ras. *Genes Dev.* 15: 3243–3248, 2001.
30. Marino, S., Vooijs, M., Van Der Gulden, H., Jonkers, J. & Berns, A. Induction of medulloblastomas in p53-null mutant mice by somatic inactivation of Rb in the external granular layer cells of the cerebellum. *Genes Dev.* 14: 994–1004, 2000.
31. Katayanagi, K., Kono, N. & Nakanuma, Y. Isolation, culture and characterization of biliary epithelial cells from different anatomical levels of the intrahepatic and extrahepatic biliary tree from a mouse. *Liver* 18: 90–98, 1998.
32. Tanimizu, N. Notch signaling controls hepatoblast differentiation by



- altering the expression of liver-enriched transcription factors. *J. Cell Sci.* 117: 3165–3174, 2004.
33. Lemaigre, F. P. Mechanisms of Liver Development: Concepts for Understanding Liver Disorders and Design of Novel Therapies. *Gastroenterology* 137: 62–79, 2009.
34. Tannapfel, A. *et al.* Frequency of p16(INK4A) alterations and K-ras mutations in intrahepatic cholangiocarcinoma of the liver. *Gut* 47: 721–727, 2000.
35. Gysin, S., Salt, M., Young, A. & McCormick, F. Therapeutic strategies for targeting ras proteins. *Genes Cancer* 2: 359–72, 2011.
36. Ong, C. K. *et al.* Exome sequencing of liver fluke–associated cholangiocarcinoma. *Nat. Genet.* 44: 690–693, 2012.
37. Wotton, S. F. *et al.* RUNX1 transformation of primary embryonic

- fibroblasts is revealed in the absence of p53. *Oncogene* 23: 5476–5486, 2004.
38. Li, M. *et al.* Whole-exome and targeted gene sequencing of gallbladder carcinoma identifies recurrent mutations in the ErbB pathway. *Nat. Genet.* 46: 872–876, 2014.
39. Noguchi, R. *et al.* Genetic alterations in Japanese extrahepatic biliary tract cancer. *Oncol. Lett.* 14: 877–884, 2017.
40. Hanada, K. *et al.* Gene mutations of K-ras in gallbladder mucosae and gallbladder carcinoma with an anomalous junction of the pancreaticobiliary duct. *Am. J. Gastroenterol.* 94: 1638–1642, 1999.
41. Matsubara, T. *et al.* K-ras point mutations in cancerous and noncancerous biliary epithelium in patients with pancreaticobiliary maljunction. *Cancer* 77: 1752–1757, 1996.

42. Zen, Y. *et al.* Biliary intraepithelial neoplasia: An international interobserver agreement study and proposal for diagnostic criteria. *Mod. Pathol.* 20: 701–709, 2007.
43. Zen, Y. *et al.* Biliary papillary tumors share pathological features with intraductal papillary mucinous neoplasm of the pancreas. *Hepatology* 44: 1333–1343, 2006.
44. Li, X. *et al.* Co-activation of PIK3CA and Yap promotes development of hepatocellular and cholangiocellular tumors in mouse and human liver. *Oncotarget* 6: 10102–10115, 2015.
45. Fan, B. *et al.* Cholangiocarcinomas can originate from hepatocytes in mice. *J. Clin. Invest.* 122: 2911–2915, 2012.