論文の内容の要旨

論文題目　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
氏名　　　吉原　靖典

【序文】

現在、本邦の死因第 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。特に胆道がんに関しては、早期がんに対する手術療法を除いては根治的な治療法に乏しく、また進行がん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。

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。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、その後に開発された遺伝子改変マウスにより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個体レベルで評価することが可能となった。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ことが可能となったが、依然として時間やコストの問題、上皮細胞以外との相互作用に起因する複雑性の問題などを考慮する必要性がある。

細胞外基質である 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。消化器がん分野においても、マウス腸オルガノイドを用いた発がん系について報告されている。すなわち、ヒト大腸がんに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が確認された。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。特に疾患モデルが少ない難治性がんにおいて、この手法が有意義であると考えられ、胆道がんについて検討した。

【方法・結果】

<u>マウス胆管オルガノイドからの肝内胆管がんモデル作製</u>

Matrigel を用いた三次元オルガノイド培養によりマウス肝臓由来オルガノイドを作製した。培養開始直後は、肝臓由来の免疫細胞や間葉系細胞など、多様な細胞が存在していたが、1 回の継代後は上皮成分の嚢胞性オルガノイドのみが増殖した。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に、*Alb*（肝細胞マーカー）および *Ck19*（胆管細

胞マーカー）の発現レベルをリアルタイム PCR により評価した。その結果、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選択的に胆道上皮の形質を有する細胞の増殖が明らかとなった。

ヒト肝内胆管がん（ICC, intrahepatic cholangiocarcinoma）の約 25% において *KRAS* 遺伝子変異が認められる。そこで、マウス胆管オルガノイドにレンチウイルスベクターを用いて *Kras* 遺伝子変異を誘導し、ヌードマウス皮下における腫瘍形成能の評価を試みたが、腫瘍形成は認められなかった。

次に *Kras* 変異に加えて、ICC で変異していることの多い腫瘍抑制遺伝子である *Pten* および $p16^{Ink4a}$ と $p19^{Arf}$ との両方をコードする *Cdkn2a* を shRNA によりノックダウンし、腫瘍形成能を評価した。変異 *Kras* を有するオルガノイドに、sh*Cdkn2a* および/または sh*Pten* による *p16*, *Pten* のノックダウンを組み合わせてヌード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。

Wnt シグナル経路の活性化および p53 の不活性化は、ヒト ICC において高頻繁に認められる。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* 変異オルガノイド（$Kras^{LSL\text{-}G12D/+}$ マウス胆管オルガノイド）に対して、shRNA によって Apc または p53 をノックダウンした。*Cre*＋sh*Apc* または *Cre*＋sh*Trp53* 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、これらは組織学的に異形成を示した。そして、*Cre* および shRNA の導入順序を反対にしても同様の結果であった。一方、sh*Trp53* または sh*Apc* 単独の導入では腫瘍は誘導されなかった。

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、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 $R26\text{-}Pik3ca^{H1047R}$ マウス由来のオルガノイドを使用した。これはレンチウイルスを用いて *Cre* を導入することで、$Pik3ca^{H1047R}$ が転写される。*Cre*＋sh*Pten* または *Cre*＋sh*Cdkn2a* を導入した後、ヌードマウスへ接種すると、検討したすべての症例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た。

FGFR2-AHCYL1 は、ICC において最近同定された融合遺伝子である。*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、*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、*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。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 および RT-PCR

によってそれぞれ確認された。一方で、NIH3T3 細胞においては *FGFR2* 融合タンパク質は高度に発現され、紡錘状の形態変化をもたらした。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。NIH3T3 細胞には *Cdkn2a* 遺伝子座が存在せず、*FGFR2* 融合遺伝子によって形質転換されたことから、*FGFR2* 融合遺伝子を sh*Cdkn2a* と共に胆管オルガノイドに導入した。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。特に *FGFR2* 融合遺伝子に加えて、sh*Cdkn2a* 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。固形腫瘍の組織学的検査では、異形成が確認された。つまり、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融合タンパク質の発現は確認できなかった。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。*Trp53*$^{flox/flox}$ マウスおよび *R26-Pik3ca*^{H1047R} 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。

<u>マウス胆嚢オルガノイドからの胆嚢がんモデル作製</u>

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。検討するがん関連遺伝子としては、*Kras*, *p16*, *Pten* とした。*Kras*$^{LSL\text{-}G12D/+}$ 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。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。*Cre*＋sh*Luc* 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*＋sh*Cdkn2a*（*Kras* 活性化および *p16* ノックダウン）および *Cre*＋sh*Pten*（*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。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。*Kras*

活性化および sh*Cdkn2a* 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、腸上皮化生由来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。

次に胆嚢がんにおける *Trp53* の高い突然変異率に基づき、$Kras^{LSL\text{-}G12D/+}$; $Trp53^{flox/flox}$ マウス胆嚢オルガノイドに *Cre* を導入した。実験した 3 症例すべてにおいて固形腫瘍が発生した。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。組織学的には、固形腫瘍は低分化腫瘍の特徴を示した。

【結論】

マウス胆管および胆嚢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。本手法は、胆道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発がんモデルとして有用であると考えられる。