

オルガノイドを用いた卵巢高悪性度漿液性がんの作成

千葉県がんセンター研究所
所長 筆宝 義隆

Keywords: 卵巢がん、高悪性度漿液性腺癌、オルガノイド、皮下腫瘍

1. はじめに

近年のがんゲノム解析の進展により膨大な数のがん特異的遺伝子異常が同定されたが、それらの発がんへの寄与を証明するためには機能的な検証が別途必要になる。ある遺伝子が発がんに関与することを直接証明するには、対応する遺伝子改変マウスを作成して実際に発がんすることを示すのが最も直接的な方法だった。一方、一般的に遺伝子改変マウス(GEM)の作成には多大な時間と労力を要する上に、胎生致死となり臓器特異的 GEM の作成が必要になる場合も少なくない。臓器によっては、臓器特異的な発現を示す遺伝子の同定を行い Cre トランスジェニックマウス(Tg)の作成から着手しないといけない場合もある。また、一般にがんで高頻度の遺伝子変異でも単独でマウスに再現しただけでは自然発がんが見られないことが多いため、複数の変異を組み合わせることが一般的である。このように、ある遺伝子の発がんへの関与を検証するにはかなりの覚悟と時間が必要になる。

これに対して、より簡便な手法としてヒトがん細胞株や NIH3T3 細胞を用いた細胞レベルの解析も広く行われている。ただし、がん細胞株は遺伝学的背景や遺伝子異常の全貌が不明であり、長期培養の影響で元の腫瘍とは性質が変わっていることも多いため結果の一般化や再現性の取得が難しい場合が多い。また、すでに形質転換しているためそもそも正常細胞ががん化する過程の解析には不適である。NIH3T3 細胞はがん化していない不死化細胞なのでがん遺伝子の形質転換能の検証に汎用される。しかし、上皮細胞ではないため結果を単純に上皮細胞からの発がん過程に外挿できないという問題があった。このように、迅速かつ簡便な新規発がんモデルの開発が求められていたが、未確立のまま長年経過していた。

2. オルガノイド発がんモデルの確立

オルガノイド (organoid) とは臓器類似 (organ-oid) の構造体という意味の造語であり、ミニ臓器とも呼ばれる。2009年にマウス小腸のオルガノイド培養法が確立され、正常幹細胞および臓器のホメオスタシスを生理的な環境で長期間維持することが可能になった。基本的なコンセプトは、液性因子による小腸における幹細胞性の維持に重要なシグナル経路 (WNT 経路の活性化と BMP 経路の抑制) の再構成および基底膜成分を模倣する細胞外基質 (主としてラミニンを含むマトリゲル) への包埋により、幹細胞 niche を *in vitro* でも3次元で再現する、というものである。従来の2次元平面培養と異なり、血清を使用せずに上皮特異的な増殖因子である EGF を添加するため、初代培養でしばしば問題となる線維芽細胞は当初混入していたとしても次第に排除され、極めて純度の高い上皮細胞の培養が可能になる。また、血清が誘導するアーティファクトとも言える細胞老化とも無縁なため、細胞がそれを乗り越えて「不死化」することもなく、初代培養から生理的な条件を維持しつつ長期培養が可能となる。オルガノイドのこうした性質を踏まえると、従来主流だった GEM による個体レベルのモデルなしでも発がん過程の再現が可能になることが想定された。

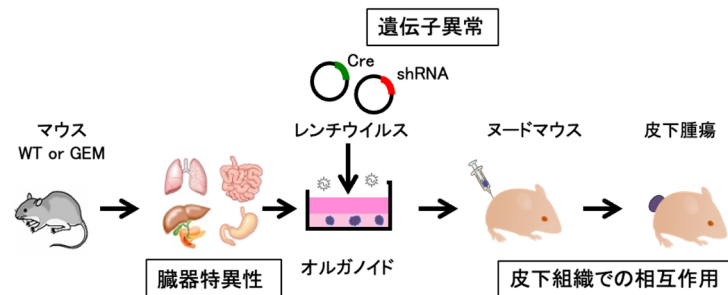


図1 オルガノイド発がんモデルの概念図

そこで、我々はマウス小腸オルガノイドへのレンチウイルスによる遺伝子導入を試みたが、マトリゲル中に包埋されたままのオルガノイドへは遺伝子導入が困難だった。しかし、試行錯誤の後に最終的に 90%程度の感染効率を達成し、遺伝子改変オルガノイドをヌードマウスへ皮下移植することで大腸多段階発がん過程を忠実に再現するモデルの開発に成功した¹ (図1)。2013年に *Science* 誌が選ぶ10大ニュースに「オルガノイド」が選ばれたが、本モデルはその際の記念特集号の総説の中でオルガノイドを用いた疾患モデルとして最初の成功例として紹介されている²。なお、オルガノイド研究は大きく二分され、ES細胞やiPS細胞などの多能性幹細胞を用いて多種類の細胞で構成される臓器全体を再現する研究と、組織幹細胞を用いて

上皮のみを対象にする研究がある。本稿では後者のオルガノイドを扱うことに留意されたい。

その後、我々は大多数の症例に共通のドライバー変異が存在するタイプのがんにおける本アプローチが特に有用であることを確認した。例えば APC 変異が 80% の症例に存在する大腸がん、KRAS 変異が 90% の症例に見られる膵がんなどである³。これらはオルガノイドに単独変異を再現しただけでも前癌病変までは再現可能で、複数変異により発がんが達成可能だった。また、胆道^{4,5}、子宮内膜⁶、肺⁷、胃、乳腺などの複数の臓器に対しても同様のアプローチで複数変異を再現することで様々な腫瘍形成が達成可能であることを確認した。興味深いことに、GEM とは異なり臓器特異的微小環境や細胞性免疫がないにも関わらず、多くの場合で発がんに関しては対応する GEM と同様な結果が得られた。このことから、遺伝学的要因が強い発がん過程に対しては本モデルが代替できる可能性が高いことを示唆した。一方、少数例ながら遺伝子異常や臓器によっては、対応する GEM での結果とは異なり腫瘍形成に至らない場合もあり、臓器特異的微小環境の寄与や細胞性免疫が重要な発がん過程であることが示唆された。

3. 卵管オルガノイドからの高悪性度漿液性がんの作出

上皮性卵巣がんは大きく 4 種類に大別され、それぞれ異なる起源細胞と遺伝子変異を有することが知られている。このうち高悪性度漿液性がん (HGSC) は最も頻度が高く、ほぼ全例で p53 変異を有する (図 2)。以前は卵巣表面上皮 (OSE) が起源と考えられており、実際 OSE における p53 の変異または欠失による GEM に対するアデノウイルス Cre の局所注入によって HGSC 疾患モデルが作製されている。一方、最近 HGSC は主に卵管 (FT) から発生して漿液性卵管上皮内がん (STIC) と呼ばれる前癌病変を経て発症するとする考えが有力である。実際、FT に特異的な組み換えを誘導する Pax8-Cre や Ovgp1-Cre などの TG と p53^{fl/fl} マウスの交配でも p53 欠損で駆動される卵巣がんの発生が達成されている。ただし、少なくとも他の一つの遺伝子変異と長い潜伏期間が必要なことから、他の要因の関与が想定され、GEM 研究は HGSC の発症機構の全貌を明らかにするには至っていない。

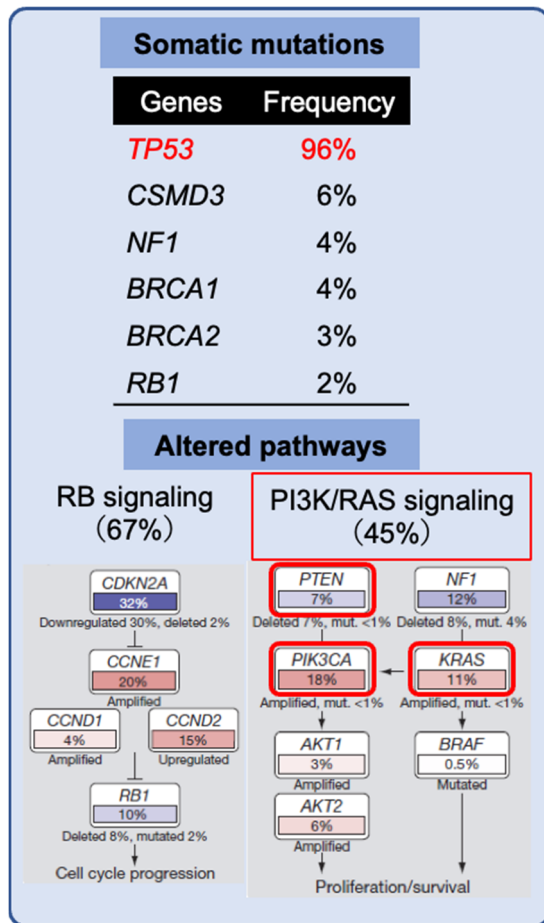


図2 高悪性度漿液性がんの変異プロファイル

HGSC は卵管を起源としてほぼ全例で p53 変異を有することから、オルガノイド発がんモデルでも発がん過程が再現される可能性が高いことが想定された。そこで、p53^{fl/fl} マウスから卵管オルガノイドを樹立 (図3) した後にレンチウイルスを用いて Cre を導入し p53 欠失させたが、ヌードマウス皮下へ移植しても全く腫瘍は誘導されなかった。しかし、その後 shRNA による Pten 抑制または Cre による変異型 Pik3ca 誘導を組み合わせると、それぞれ STIC と HGSC 様の腫瘍が発生した⁸ (図4)。大腸がんでは頻度が高く WNT 経路を活性化する Apc 欠失は HGSC では頻度が低い。そこで、がん抑制遺伝子の欠失が非選択的に発がんを促進するわけではないことを確認するために Apc 欠失と p53 欠失を組み合わせてみたが、嚢胞様の良性病変が誘導されるのみで発がんにはいたらなかった。このことから、本オルガノイドモデルにおいても実際の卵管発がんにおけるシグナル経路の選択性が再現されていると考えられた。

4. 卵管オルガノイドからの癌肉腫の作出

HGSC における RAS 経路の高頻度の活性化と一致して、変異 Kras は p53 欠失と協調して腫瘍を発生させた。具体的には LSL-Kras^{G12D/+};p53^{fl/fl} マウス由来の卵管オルガノイドに Cre を導入してヌードマウス皮下に移植した。ただし、この腫瘍は癌腫細胞と肉腫細胞の2種類を含む癌肉腫という組織型を示した。オルガノイドは上皮由来で培養時も嚢胞様の構造だったことから、皮下移植後に上皮間葉転換 (EMT) プログラムが誘導された可能性が示唆される。ま

た、腫瘍の再培養によって得られたオルガノイドの多くは上皮細胞の特徴である嚢胞様の構造を示したことから、皮下組織の微小環境が肉腫への分化に重要であることが示唆された。興味深いことに、変異 *Kras* と *p53* 欠失の協調による癌肉腫の誘導は同じ遺伝子型を持つ子宮内膜オルガノイドでの結果とは同じだったが、膵管および胆管オルガノイドでは腺癌のみが発生したのとは対照的だった。オルガノイドの培養条件は同一のものを採用しており、また臓器特異的微小環境の関与もないことから、これらの観察は婦人科系と消化器系の細胞ではエピジェネティックな状態がそもそも異なり、結果として発がんプログラムも異なっていることを強く示唆した。

我々の実験系ではレンチウイルスによるオルガノイドの感染効率は通常 90%程度のため、*Cre* を導入しても *Kras* および *p53* の floxed アレルについて

非組換え細胞が一部残存し、これはオルガノイドのゲノム PCR で簡単に確認可能である。しかし、皮下腫瘍由来のオルガノイドでは両方とも完全に組み変わった細胞のみに置換されることから、卵管発がんにおける *Kras* 変異と *p53* 欠失の組み合わせを持つ細胞の癌化における優位性が確認された。そこで、次に *p53* 欠失に依存しない卵管発がん誘導が可能か検討した。変異型 *Kras* を発現する *p53* 野生型オルガノイドに対して、shRNA による *Cdkn2a* の抑制と *Cre* による *Tgfbr2* の欠失を組み合わせたところ、それぞれ純粋な肉腫と癌腫を発症し、卵管発がんにおける EMT 誘導には TGF- β シグナル経路の関与が必須であることが確認された。興味深いことに変異型 *Kras* と *Cdkn2a* 抑制により得られた腫瘍を再培養したところ、肉腫の組織像を反映して嚢胞様ではなく紡錘形の細胞のみが認められ、また *Kras* 野生型アレルの自然欠失が確認された。一般的に変異型 *Kras* と野生型が共存する腫瘍において、野生型アレルは相対的にがん抑制的に働くことからその欠失は腫瘍促進的に働くことが知られてお

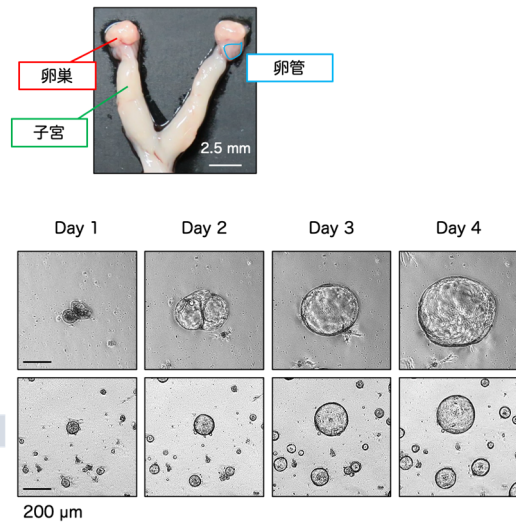


図 3 マウス女性生殖器のオルガノイド培養

り、実際のヒトのがんでもしばしば観察される。p53 欠失の際には同様の変化は見られなかったことから、Cdkn2a 抑制は p53 欠失と比較して相対的に発がん促進効果が弱いため、それを代償するために Kras 野生型アレルの自然欠失への選択圧が生じていることが推測された。

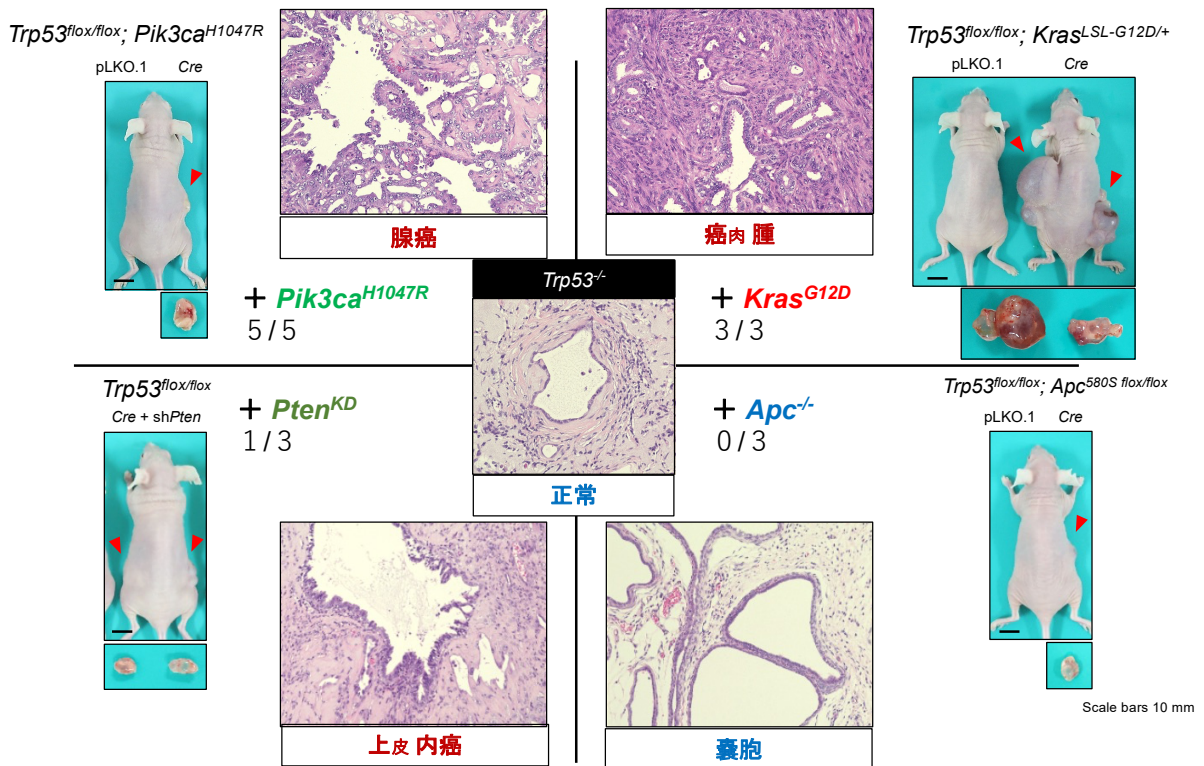


図 4 卵管オルガノイドからの p53 欠失依存的な卵巣発がんモデル

5. 皮下腫瘍由来オルガノイドの活用

最後に、皮下腫瘍由来オルガノイド (TDO) を用いて卵巣がんの臨床で用いられている薬剤に対する感受性の評価を行った。パクリタキセルとシスプラチンの両方に対する感受性は良性病変である嚢胞で最も高く、癌肉腫で最も低かった。また、遺伝子異常によって感受性が異なることも確認できた。これは実際の臨床における反応性と対応しており、薬剤開発の前臨床試験でもこれらの有用なリソース

となることが考えられた。

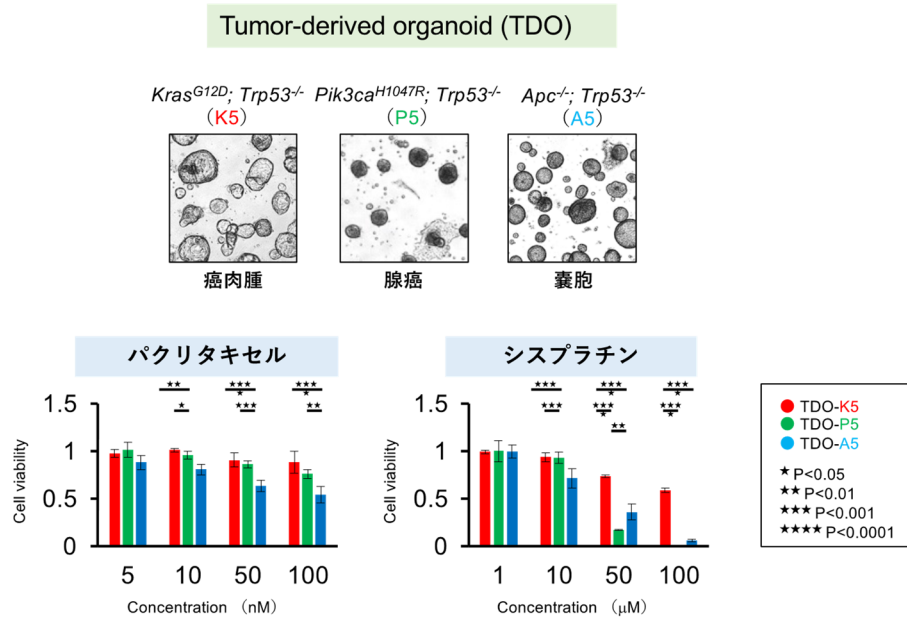


図5 腫瘍由来オルガノイドの薬剤感受性

6. おわりに

本稿で紹介したオルガノイドを用いた卵管発がんモデルは、迅速かつ簡便であるだけでなく実際の発がん過程を正確に再現する優れたモデルであることを示した。本モデルを活用することで遺伝子型、細胞型、腫瘍表現型の間にある発がん分子機構について新たな洞察を得ることが可能であり、また前臨床試験における有用性も期待される。患者由来のオルガノイドと併せて解析することで様々な展開が考えられ⁹、今後も重要な解析系の地位を占め続けるものと考えられる。

文献

1. Onuma K, Ochiai M, Orihashi K, *et al.* Genetic reconstitution of tumorigenesis in primary intestinal cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2013; **110**: 11127-11132.
2. Lancaster MA, Knoblich JA. Organogenesis in a dish: Modeling development and disease using organoid technologies *Science*. 2014; **345**:1247125.
3. Matsuura T, Maru Y, Izumiya M, *et al.* Organoid-based ex vivo reconstitution of Kras-driven pancreatic ductal carcinogenesis. *Carcinogenesis* 2020; **41**: 490-501.
4. Ochiai M, Yoshihara Y, Maru Y, *et al.* Kras-driven heterotopic tumor development from hepatobiliary organoids. *Carcinogenesis* 2019; **40**: 1142-1152.
5. Kato S, Fushimi K, Yabuki Y, *et al.* Precision modeling of gall bladder cancer patients in mice based on orthotopic implantation of organoid-derived tumor buds. *Oncogenesis* 2021; **10**: 33.
6. Maru Y, Tanaka N, Tatsumi Y, *et al.* Kras activation in endometrial organoids drives cellular transformation and epithelial-mesenchymal transition. *Oncogenesis*. 2021;**10**:46.
7. Sato T, Morita M, Tanaka R, *et al.* Ex vivo model of non-small cell lung cancer using mouse lung epithelial cells. *Oncol Lett* 2017; **14**: 6863-6868.
8. Maru Y, Tanaka N, Tatsumi Y, *et al.* Probing the tumorigenic potential of genetic interactions reconstituted in murine fallopian tube organoids. *J Pathol*. 2021; **255**:177-189.
9. Maru Y, Hippo Y. Current Status of Patient-Derived Ovarian Cancer Models. *Cells* 2019; **8**:505.

オルガノイドを用いた卵巢高悪性度漿液性がんの作成

2025年6月19日発行

公益財団法人山口内分泌疾患研究振興財団
〒105-0014 東京都港区芝2丁目28-11
E-Mail : office@yamaguchi-endocrine.org