

膵臓がんオルガノイドを用いたがん悪性化機構の研究

金沢大学がん進展制御研究所
中山 瑞穂

[申請研究目的の概要]

膵臓がんは診断による早期発見が難しく、診断時にはすでに5年生存率が約10%といまだに治療困難ながんである。膵臓がんのドライバー遺伝子はゲノム解析により明らかとなっており（KRAS, TP53, CDKN2A, SMAD4）、がんモデルマウスを使った研究では膵臓がんの発生には Kras変異が重要なゲートキーパーであることが知られる。一方で、膵臓がんはがん細胞の悪性化形質が間質との関わりに強く影響していることや、発現遺伝子群を基準としたがんの分類分けが予後と密接に関係していることなど、悪性化におけるがん形質とドライバー遺伝子変異の関わりは、ほとんど明らかにされていない。

本研究ではドライバー遺伝子変異をもつマウスの膵臓からオルガノイドを樹立し、これを用いた移植実験や *in vitro* 実験を通して、各ドライバー遺伝子変異とがん形質との関係を明らかにすることを目的とした。

[実際おこなった実験]

● 膵臓オルガノイドの樹立

Kras変異、p53変異、Smad変異のためのマウスは、それぞれ *Kras*^{G12D}, *p53*^{R270H}, *Tgfr2*^{flx/flx} マウス (C57BL/6Nバックグラウンド) を用いた。これらに *RosaCre* マウスを交配し各ドライバー遺伝子変異を持つマウスを作製した。10週齢のマウスにタモキシフェン (4 mg/匹; 25-30g) を3回連投後、膵臓から膵管を単離した¹⁾。膵管はコラゲナーゼ処理後マトリゲル (Corning社, Growth factor reduced) に包埋し2-3回passageしてオルガノイド細胞を樹立した。オルガノイドからゲノムを抽出して、目的の遺伝子変異が起きているかをPCRで確認した²⁾。最終的に樹立したオルガノイドリストを図1に示す。なお、*Cdkn2a*についてはCRISPR-Cas9システムによるノックダウンを試みたが、KOオルガノイド細胞は取得できなかった。

図1) 樹立した膵臓オルガノイド

	Kras ^{G12D}	p53 ^{R270H}	Tgfr2 ^{KO}	p16 ^{KO} CRISPR
K	K	KP	KT	
T	KT	TP	T	
P	KP	P	PT	
KT		KTP		

● オルガノイド移植

本研究では、膵臓実質への移植 (OGO) と膵管経由からの移植 (IGO) の2種類の方法を行った³⁾。

(OGO移植; Orthotopically Grafted Organoid) : オルガノイドは3-5×10⁵個/個体を100%マトリゲルにSuspendして膵臓の膵体-膵尾部へ接種した。

(IGO移植; Intraductally Grafted Organoid) オルガノイド (5-8×10⁵個/個体) を30% Matrigel/PBS にSuspendした。マウスは麻酔下で開腹し、十二指腸に開口している総胆管からオルガノイドを注入した。その際、肝臓側へ流入しないように肝臓手前で総胆管をクリップで止めた。

参考文献

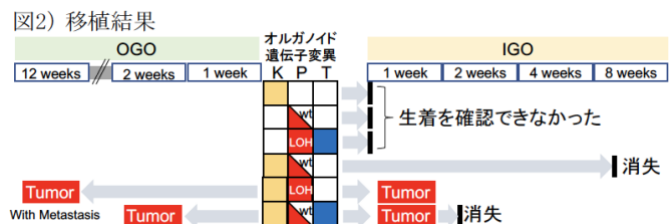
- 1) Huch M. *et al.* EMBO J. (20) 2708-21. 2013.
- 2) Sakai E *et al.* Cancer Research (78) 1334-46. 2017.
- 3) Miyabayashi *et al.* Cancer Discovery (10) 1566-89. 2020.

(移植結果)

本研究では、IGO移植を重点的に行った。結果の概要は図2に示す。

(Kras単独変異オルガノイド; K)
IGO移植による生着は確認できなかった。

(p53単独変異オルガノイド; P)
IGO移植による生着は確認できなかった。



(PT 二重変異オルガノイド)
IGO移植による生着は確認できなかった

(pR270H/LOH K 二重オルガノイド)
IGO移植、OGO移植どちらも生着が見られた。

(pR270H/+ KT 三重変異オルガノイド)
IGO移植、OGO移植どちらも生着が見られた。

以上の結果から、p53変異とKras変異の組み合わせは膵臓での生着および増殖に有利な遺伝子変異であると考えられた。

以下にそれぞれの生着したオルガノイドの詳細を示す。

pR270H/LOH K オルガノイド

(図3左; IGO移植) 移植後1週間で小さな腫瘍が観察された。腫瘍内には少量のオルガノイド細胞が多くの間質細胞と共に存在していた。Ki67染色によりオルガノイドの増殖細胞も認められた。

(図3右; OGO移植) 移植後12週間で、激しい膵臓がん組織 (PDACおよびPanIN) が観察された。肝臓転移や腹腔内播種もみられた。

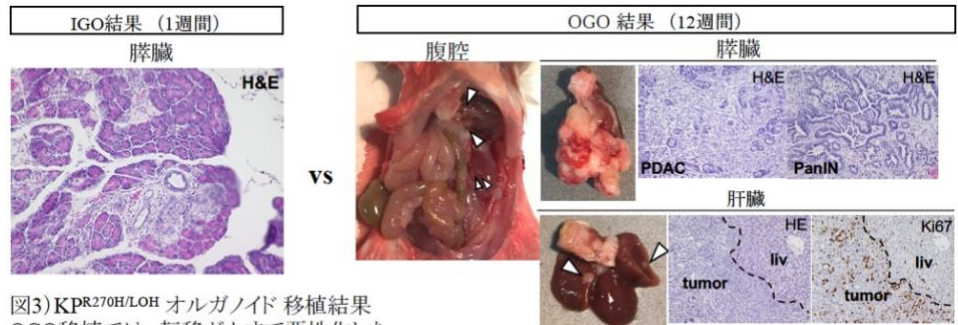


図3) KPR270H/LOH オルガノイド 移植結果
OGO移植では、転移がんまで悪性化した。

(考察) IGO移植、OGO移植でこれだけの差が認められた原因として、IGO移植にはSHOマウス、OGO移植にはNOGマウスを使用したことが考えられる。IGO移植後1週間で観察された多くの間質細胞の同定は今後必要であるが、生存できたオルガノイド細胞がかなり少なかったのは、膵管内に移植直後から止まることができなかった可能性もある。

pR270H/+ KT オルガノイド

(図4左; IGO移植) 移植後1週間で小さな腫瘍を確認できたが、多くの間質細胞の中にオルガノイド細胞が浮遊しているような状態だった。Ki67陽性細胞はほとんど観察されず、増殖力はほぼないと思われた。2週間後の膵臓では痕跡すらなかったことから、移植後1-2週間の間に徐々に消失していったと考えられた。

(図4右; OGO移植) 移植後2週間では、オルガノイド細胞周辺に間質細胞がまわりついており、IGO時と比べ、Ki67陽性細胞が多く観察された。

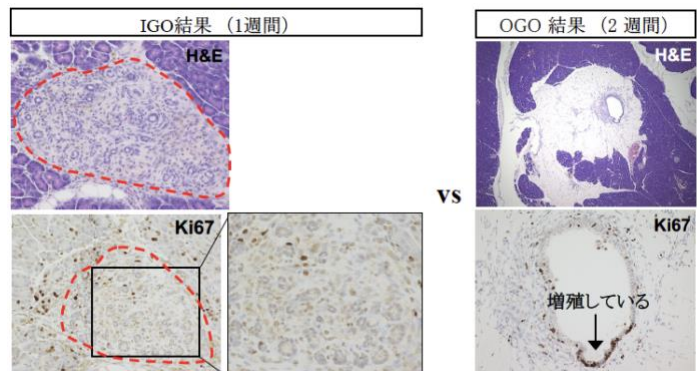


図4) PR270H/+KT オルガノイド 移植結果
OGO移植ではIGO移植より多くの増殖細胞が観察された。

(考察) どちらの移植もSHOマウスを用いた。両方でオルガノイド細胞が多くの間質細胞に囲まれていたが、IGO移植によるオルガノイド細胞は増殖しておらず、OGO移植によるオルガノイド細胞は増殖していた。今回はそれぞれの間質細胞の特定までには至らなかったが、オルガノイド細胞の生存に関与していることが唆されるため、この特定は今後の課題である。

(移植結果全体の考察)

膵管内には消化酵素を含む膵液が充満しているため細胞にとっては過酷な環境であると考えられる。今回行ったIGO移植成績が、全体的にOGO移植と比較して悪かった要因の一つとして、膵管内への直接移植が細胞に大きな負担がかかったことが考えられる。ただ、単独変異オルガノイドを同様の手法で移植してもほぼ生着できなかった点を考えると、PKの二重変異はこの環境に適応する能力が比較的高かったとも考えられる。

膵管内移植方法については、細胞が膵管内に止まることができる方法を工夫する必要がある。
 また、今回の移植実験ではp53変異のstatusについてLOHが起きていない細胞（＝野生型p53が発現している）と起きている細胞を区別せずに用いた。我々が大腸がんオルガノイドで行った研究では変異型p53とLOHによる野生型欠損の組み合わせはがんの悪性化に重要であること（Nakayama M. *et al.* Nat Commun. 11.2333. 2020）、またTCGAにおいて変異型p53を発現した膵臓がん検体のほとんどで、野生型p53が欠損していることから、p53 statusは変異型p53/LOH（野生型p53欠損）に絞って研究を進める。

● 膵臓オルガノイド細胞とWntシグナル依存性について（*in vitro*実験）

膵臓オルガノイドの培養液にはWnt/R-spondinが必須である。また、ヒト膵臓がんオルガノイドでもニッチファクターとしてWntへの依存性が高いことが報告されている（Seino *et al.* Cell Stem Cell (22) 454-467. 2018.）。一方で我々は腸管がんにおいて、ミスセンス変異p53がWntシグナル活性化亢進に関わっていることを見出している（論文未発表）。そこで今回樹立した膵がんオルガノイド（PTK）を用いてWntシグナルへの依存性を検証した。

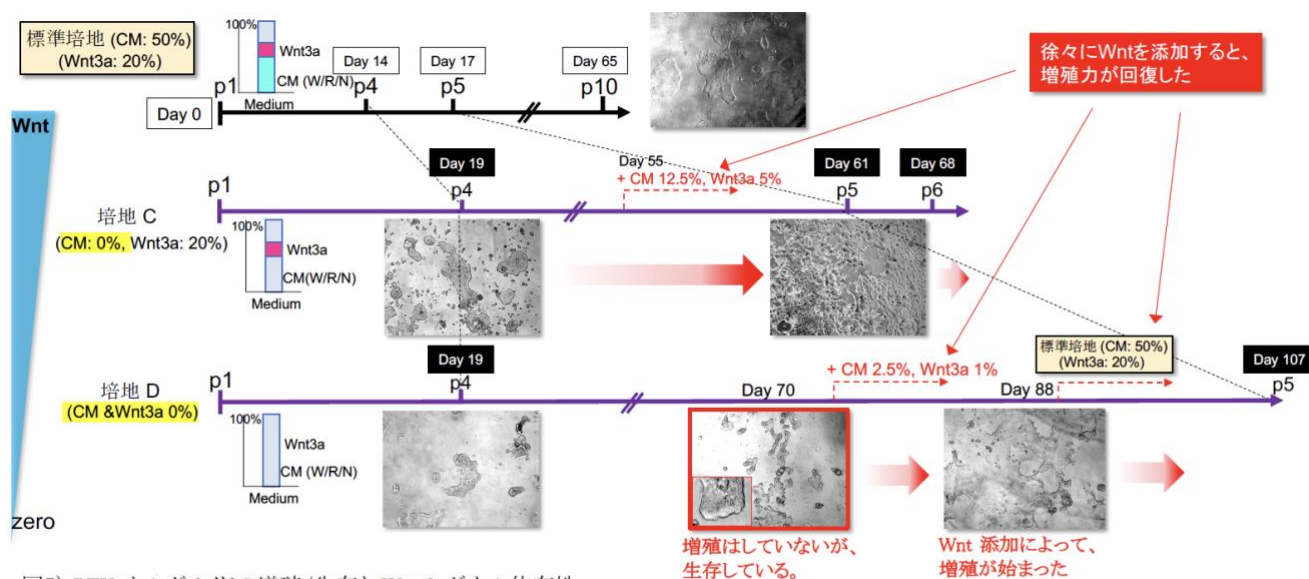


図5) PTK オルガノイドの増殖/生存と Wnt シグナル依存性
 Wntを全く含まない培地Dでは、増殖が止まってしまったが培地へのWnt添加により増殖力が徐々に回復し、107日目に継代できる程度まで増殖した。

(実験方法)

$P^{R270H/+}$ TKオルガノイドを、以下の培地で培養した。

- 標準培地： Wnt/Rspo/NogginのConditioned Medium (CM) +Wnt3aを含有、
- 培地C: 標準培地からCMのみ抜いたもの、
- 培地D: 標準培地からCMとWnt3aを抜いたもの

Dish (24 well plate) の80-90% Confluencyとなったら継代し培養を続けた。

(結果：図5)

$P^{R270H/+}$ TKオルガノイドの増殖はWntシグナルに依存していたが、生存力はWnt非存在下でも維持されていた。この性質が $P^{R270H/+}$ TKに特異的なものなのか、今後他の遺伝子変異オルガノイド（P, K, PKなど）でも検証を試みる予定である。

このWnt非存在下でもDormantな状態を維持できることは、がんの初期発生の間質が乏しい時期における生存を可能にするという意味で非常に興味深い。

[今後の研究展望]

膵臓がん研究におけるマウスモデルは、ほとんどが膵臓特異的プロモーター (Pdx1, CK19)などが用いられている。しかしながら、厳密な膵管上皮細胞のプロモーターは知られておらず、膵がん発生部位も未だにControversialな側面もあるため、慎重に理解していく必要がある。

本研究では、同じGenotypeのオルガノイドでも移植場所によって異なる生存率（生着率）を示したことは移植環境による影響を大きく受けていることを示している。この点に着目してドライバー遺伝子と微小環境との関わりを深く追求していきたい。

最後に、この研究を支援していただいたアステラス病態代謝研究会の関係者みなさまに改めてお礼を申し上げます。ありがとうございました。