

研究経過報告書

研究テーマ：上皮間葉共培養オルガノイドの癌治療への臨床応用

鈴木 伸三

近年、オルガノイド培養法により正常消化管上皮においても *in vitro* 培養が可能となりました。オルガノイド培養は、マトリゲル内で上皮細胞のみを培養できるという点が特徴であり、上皮細胞のみのシグナルの検出や分化の観察に適しています。一方、発癌および癌の進展において、癌関連 *fibroblasts*(CAF)などの、間質細胞も重要な役割を成していることが指摘されています。

留学先研究室は、消化管間質において *Gremlin1* 陽性細胞が正常消化管間質の幹細胞として機能していることを、報告しています。しかし、癌組織において *Gremlin1* 陽性細胞が、CAF を供給しているかどうかは不明でした。マウス AOM/DSS 大腸癌モデルおよびレポーターマウスを使用して、確認したところ、癌組織においても *Gremlin1* 陽性細胞が *lineage trace* され、CAF の供給源となっていることが確認されました。

次に、*Gremlin1**flox/flox* マウスより消化管 *fibroblasts* を採取し、まず *hTERT* の発現により不死化した後、*Lenti-Cre* による *loxP* 配列の組み換え、および *Gremlin1* 発現 *Lenti-virus* を使用することで、*Gremlin1* 強制発現株と、正常株、*Gremlin1*KO 株の各 *fibroblasts* を樹立しました。各細胞株、*BRE-Luciferase* を使用して、下流の *BMP* シグナルを評価し機能的にも強制発現、KO に成功していることを確認しました。次に *CFU-Assay* にて、幹細胞機能を評価したところ、*Gremlin1*KO 株において、有意な低下がみられ幹細胞の維持に *Gremlin1* の発現が重要であることを改めて確認しました。今後、これらの *fibroblasts* 株を使用し、ヒト癌オルガノイドおよびマウス癌オルガノイドと共培養実験を行い *Gremlin1* 細胞が癌の増殖に与える影響について評価する予定です。

次に正常マウスの胃、小腸、大腸オルガノイドと同部位のより採取した *fibroblasts* を、マトリゲル内で共培養することに成功しました。通常、*Budding* した形態となる小腸オルガノイドが円形に変化することがわかりました。この形態変化は、*Wnt* シグナルが供給されたときにおきる変化として知られており、共培養した *fibroblasts* から、*Wnt* シグナルが供給されたものと思われました。次に、*CRISPR* 技術を使用し *APC/KrasG12D/p53* の遺伝子改変を加えることで、癌化大腸オルガノイドを作成し、正常オルガノイドおよび癌化オルガノイドとマウス血球を共培養すると、血球細胞は、癌化オルガノイドと共培養したときにマトリゲル内に浸潤することがわかりました。浸潤した血球細胞は癌オルガノイドの増殖を抑制傾向がみられたものの有意なものではありませんでした。共培養系において癌増殖を抑制する血球分画があるものと仮定し、*NK* 細胞のみを磁気ビーズを使用して単離し、共培養したもののマトリゲル内への血球浸

潤自体が非常に弱いものとなってしまいました。血球細胞が癌細胞への殺傷効果を発揮するのに間質細胞が関与している可能性も考慮し、今後、先に樹立した不死化 fibroblasts 株を使用し、上皮、間質、血球の 3 細胞の共培養系を樹立し、in vitro での癌免疫を観察できることを目指して研究をすすめています。