

難治がんの新規分子治療標的候補に対する発がん再構成系を用いた治療戦略の構築

千葉県がんセンター研究所 発がん制御研究部

筆宝義隆

1. はじめに

次世代シーケンサーの普及と共に、国際的な協力下で種々のがんに対するゲノム解析が急速に進展している。その結果、多くの融合遺伝子や遺伝子変異が新規に同定され、治療標的の候補として注目を集めている。日本では胃がんや肝がんの患者数が多く、これまでにこの分野で外科治療、内視鏡治療、局所療法などで国際的にリードしてきた実績がある。一方、ピロリ菌や肝炎ウイルスの駆除によりこれらのがんは将来的に激減すると予測されており、代わりにスキルス胃がんや肝内胆管がんなどの難治がんに対する画期的な治療法の開発が今後の重要な課題である。

我々は最近、初代培養細胞を用いた「in vitro 発がん再構成系」の開発に成功し（図1）、大腸発がんの細胞レベルのモデルとして世界に先駆けて報告した（Onuma et al, *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2013）。従来は遺伝子改変マウスの作成やNIH3T3細胞への導入により遺伝子変異の発がん性検証が行われていたのに対し、目的の臓器由来の正常細胞に複数の遺伝子異常を組み合わせることで導入し、発がん性の有無を短期間で直接検証することを可能にした。また、当該遺伝子変異に依存して発がんした細胞株も簡便に作成可能なため、治療薬や治療標的分子の評価系に用いて創薬開発の大幅な迅速化に資する実験系として応用が期待されている。そこで、本研究では最近本邦で同定され肝内胆管がんの新規ドライバー遺伝子であるFGFR2融合遺伝子（Arai et al, *Hepatology*, 2014）について本手法を用いてその発がん性を検証すると同時にがん細胞株の作成を試みた。

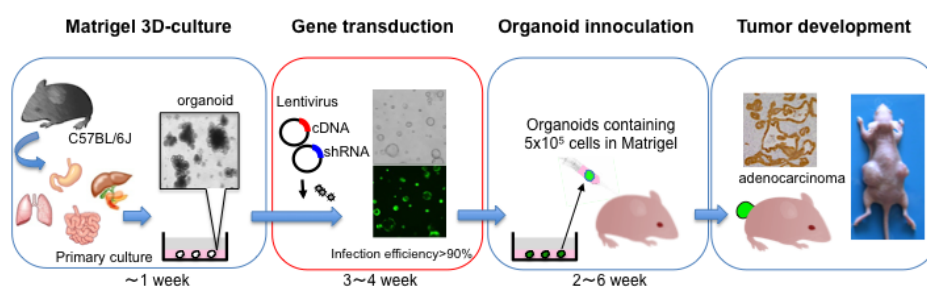


図1 in vitro 発がん再構成系の概略

マウスの各種臓器より採取した細胞に対してマトリゲルを用いた3次元初代培養を行い、オルガノイドとして増殖させる。ついでレンチウイルスを用いた極めて高効率の遺伝子導入を行ったのちにヌードマウス皮下に接種して腫瘍原性の検証を行う。皮下腫瘍は再び3次元培養を行うことで株化可能である。

2. 方法

マウス

C57BL/6J マウスの野生型およびLSL-KrasG12D ノックインマウスの4-6週齢のオスを用いて臓器を採取した。造腫瘍能の検定にはヌードマウス5-8週齢を用いた。

3次元初代培養

マウスより肝臓を単離して断片化した後に、酵素処理を行い単一細胞にまで分散させた。マトリゲルをあらかじめ重合させておき、その上に細胞を播種すると生細胞のみが生着する。翌日死細胞とメディウムを除去した後にマトリゲルを重層し3次元培養を開始する。数日毎に継代を繰り返すが、通常約10日以内に上皮細胞（CK19陽性）で構成されるオルガノイドのみが得られる。

ウイルス作成および感染

p16およびPtenに対するshRNAやCre-recombinaseのcDNAなどをレンチウイルスベクターpLK0.1に組み込んだものを用いて、常法に従いウイルス粒子を作成した。融合遺伝子FGFR2-AHLYL1に関しては、柴田龍弘博士からご供与いただいたレトロウイルスベクターpMXsに組み込んだものを用いた。ウイルス感染の際には細胞懸濁液と濃縮したウイルス粒子を等量ずつ混ぜた上でマトリゲル上に播種して一晩培養を行った。

3. 結果

LSL-KrasG12D マウスは、Cre 遺伝子を発現させることで任意の臓器で特異的に代表的ながん遺伝子Krasの活性化変異の発現を誘導することが可能である。我々は、各種臓器由来オルガノイドにレンチウイルスを用いて *in vitro* でCre 遺伝子を導入したKras 活性化胆管オルガノイドを調整済みである。Kras 変異単独では小腫瘍が誘導されるのみだったが、p16 およびPten などのがん抑制遺伝子に対するshRNA と組み合わせることで、腺癌類似の組織型を呈するヌードマウス皮下腫瘍が誘導された。このことから、Kras 変異が胆管癌のドライバー遺伝子の陽性コントロールとして機能すること、成体マウス肝臓からでも腫瘍が誘導可能であることが示された。また、上記融合遺伝子はKras 変異とは相互排他的であることが報告されていることから、Kras 変異と置換して導入することで腫瘍形成が誘導されることが期待された。さらに、過去の遺伝子改変マウスの結果から、単一の遺伝子変異単独で発がんにいたることは稀であり他の遺伝子変異との協調作用が必要と考えられた。

そこで、FGFR2-AHLYL1 またはGFP をまずレトロウイルスを用いて胆管オルガノイドに導入した後に、レンチウイルスを用いてp16 およびPten に対するshRNA を単独または組み合わせで導入し、ヌードマウスに接種した。その結果、shRNA だけでは腫瘍が誘導されないこと、FGFR2-AHLYL1

の導入により異型腺管を有する微小腫瘍が誘導されることを見出した (図2)。一方、p16 のノックダウンを追加することにより腫瘍径が有意に増大し、組織学的にも悪性度の増加を見た。これらの結果から、FGFR2-AHCL1 は肝内胆管癌のドライバー変異として機能するがん遺伝子であることが証明され、治療標的としても有望であることが強く示唆された。

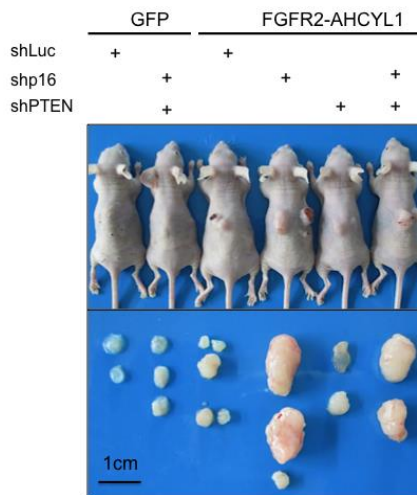


図2 FGFR2 融合遺伝子による腫瘍形成
レトロウイルスで胆管オルガノイドに融合遺伝子と GFP (コントロール) を導入し、ついで p16 や Pten、Luciferase (コントロール) に対する shRNA を導入した。マトリゲルと共にヌードマウス皮下に接種後、4 週間で解剖した。上段は皮下腫瘍、下段は解剖後の腫瘍。融合遺伝子は単独では小さい腫瘍を誘導するのみだが、p16 のノックダウンと強い相乗効果を有する。融合遺伝子を導入しない場合に得られた腫瘍はマトリゲルの残滓であり腺管形成は見られなかった。

4. 考察

得られた皮下腫瘍については、現在再び3次元培養を行い新規細胞株として各種阻害剤の効果を解析中である。新規に遺伝子異常が同定された場合に、遺伝子改変マウスを作成することなく当該遺伝子の発がん性の検証、協調的ながん化を促進する遺伝子異常の同定、当該遺伝子異常を有する細胞株のカスタム作成およびそれを用いた治療薬の探索などが短期間で実施可能であること、などが「in vitro 発がん再構成系」の想定される利点だが、今回実際にそのことが再確認される結果となっている。本実験系のこうした特性を生かすことで、多くの臓器におけるがんの橋渡し研究に貢献することが期待される。

5. 学会発表

1. 筆宝義隆 (英語口演) A Novel Cell-based Model for Intrahepatic Cholangiocarcinoma. 第74回日本癌学会総会 (名古屋) 2015年10月
2. 筆宝義隆 (口演) 3次元初代培養を利用した新規肝内胆管がんモデルの確立と個別化医療への応用. 第19回日本がん分子標的治療学会学術集会 (松山) 2015年6月
3. 筆宝義隆 (口演) 3次元初代培養を利用した新規肝内胆管がんモデルの確立. 第22回肝細胞研究会 (米子) 2015年6月