

146. *Ex vivo* 発がんモデルを駆使した子宮体がんの本態解明

丸 喜明

*千葉県がんセンター 研究所 発がん制御研究部

Key words : 子宮体がん, オルガノイド, 発がん, 転移

緒言

がんは基本的に遺伝子異常の病気であり、近年の網羅的解析技術の発達により、がん特異的な異常が多数同定されている。こうした遺伝子異常のうち、実際に発がんに寄与しているものが何かに関する検証については個体レベルでの病態の再現により行うことが従来一般的であった。当研究グループでは遺伝子改変マウス (GEM) を代替・補完するために、マウス由来正常上皮オルガノイド (OR) にレンチウイルスを用いてヒトの各がん腫で高頻度のゲノム異常やシグナル経路の異常を再現し、ヌードマウス皮下で腫瘍原性を評価する『ハイブリッド型発がんモデル』の開発を消化器系がんや婦人科がんを進めてきた。本手法では多段階の発がんを再現可能で、同じ遺伝子異常の組み合わせであっても臓器によって誘導される腫瘍の組織型が異なる場合がある [1, 2]。子宮体がんモデルでは子宮内膜 OR (EmOR) に変異型 *Kras* と *Cdkn2a* 発現抑制あるいは *Trp53* 欠失を組み合わせることで癌肉腫が高率に誘導されることを見出した [3]。一方で、EmOR に *Pten* の発現抑制を誘導したところ、過去の GEM での結果とは異なり、*Pten* 発現抑制単独でも変異型 *Kras* と組み合わせても腫瘍化に至らなかった。そのため、EmOR からの発がん誘導自体には成功していたものの稀に一部のサブタイプのみでの作出に留まっていた。

そこで、EmOR の長期間培養後に変異型 *Kras* および *Pten* 発現抑制を組み合わせたと、偶然にも転移性腺癌が誘導された。この発がん・転移能は再現性があり、マウス腫瘍由来 OR の転移能は連続移植においても安定していたことから、EmOR を長期培養している過程で変異型 *Kras* および *Pten* 発現抑制と協調的に腫瘍形成を促進する異常を新規に獲得したことが示唆された。その後、その異常を同定するために遺伝子導入前 OR、皮下接種前の遺伝子改変 OR および腫瘍由来 OR を詳細に解析し、候補遺伝子として *Tgfbr2* を同定した。

以上をふまえ、本研究では *Tgfbr2* に着目し EmOR を用いたハイブリッド型発がんモデルを駆使して変異型 *Kras* と *Tgfbr2* 欠失に関連した発がん転移促進的な遺伝的相互作用および分子機構を解明することを目的に実験を行った。その結果、子宮内膜細胞に特定の遺伝子異常を導入することで発がん・転移を直接誘導可能なことが明らかとなった。

方法

1. マウス子宮内膜細胞のオルガノイド培養

10 週齢程度の雌マウスの両側子宮角を実体顕微鏡下で採取し細切後、2 U/ml dispase II および 1 mg/ml collagenaseP による酵素処理 (37°C、30 分) を行った。酵素処理後の細胞を PBS で洗浄しピペッティング後、無血性培地 Advanced DMEM/F-12 (50 ng/ml EGF、250 ng/ml R-spondin1、100 ng/ml Noggin、10 μ M Y27632、1 μ M Jagged-1、2.5 μ M CHIR-99021) に懸濁した。その細胞懸濁液を用いてマトリゲルによる OR 培養を行った。OR 培養の操作は基本的に以前報告したマトリゲル二層法 (Matrigel Bilayer Organoid culture (MBOC)) と同様である [3, 4]。

2. レンチウイルスを用いた *in vitro* 遺伝子導入

マウス EmOR への遺伝子導入は、以前報告したマウス腸管 OR へのレンチウイルスを用いた遺伝子導入と同様の方法で行った [5]。遺伝子組換えや shRNA による標的遺伝子の発現抑制の程度は、ゲノム PCR およびウェスタンブロッティングで確認した。

3. ノードマウス皮下における腫瘍原性評価および誘導された腫瘍の解析

遺伝子改変 EmOR (5×10^5 cells 相当) をマトリゲルと混和した上でノードマウスの両側あるいは片側に接種し、皮下腫瘍形成の有無を評価した。皮下腫瘍が確認された場合は病理組織的評価を行うとともに腫瘍の一部から腫瘍由来 OR を樹立し皮下接種前 OR と比較した。

結 果

1. TGF- β 経路の抑制は変異型 *Kras* と協調して発がんを誘導した

子宮体がんの発がんにおける TGF- β 経路の不活性化の重要性を検証するため、変異型 *Kras* を発現させた EmOR に sh*Luc*、sh*Smad4* および sh*Tgfr2* を導入した。変異型 *Kras* と sh*Luc* の組み合わせでは、我々の以前の報告 [3] と同様に基本的に腫瘍の発生には至らなかった。一方、変異型 *Kras* と sh*Smad4* あるいは sh*Tgfr2* の組み合わせでは充実性腫瘍を形成し、組織学的には腺癌で一部に扁平上皮への分化を伴う場合もあった (図 1)。

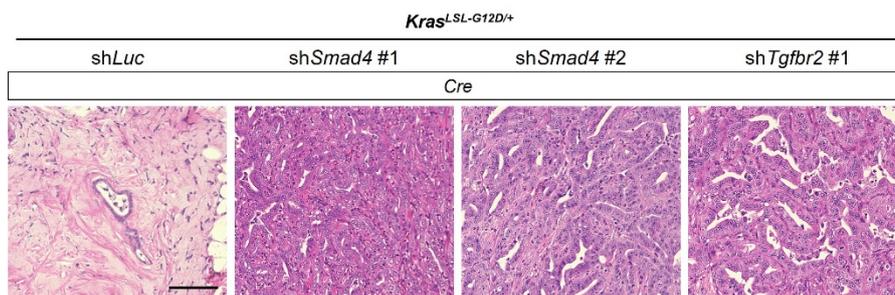


図 1. EmOR における変異型 *Kras* および TGF- β 経路抑制による発がん誘導
遺伝子改変した EmOR をノードマウスに皮下に接種して誘導された病変の
H&E 染色 (スケールバー: 100 μ m)。

2. 変異型 *Kras* と *Tgfr2* 両アレル欠失および *Cdkn2a* 発現抑制は高頻度に転移性がんを誘導した

変異型 *Kras* と TGF- β 経路の抑制で誘導された腫瘍では転移は確認されなかったため、直接転移性がんを誘導するには更なる遺伝子異常であることが示唆された。そこで、*Kras*^{LSL-G12D/+}; *Tgfr2*^{flx/flx} マウス由来の EmOR を用いて更なる検討を行った。まず変異型 *Kras* と *Tgfr2* 両アレル欠失による腫瘍原性を評価したところ、研究 1 の結果と同様に扁平上皮への分化を伴う腺癌が誘導されたが、転移は確認されなかった。そこで *Cdkn2a* あるいは *Pten* の発現抑制をさらに追加したところ、充実性腫瘍を形成し組織学的には扁平上皮への分化を伴う腺癌であり、*Cdkn2a* 発現抑制を組み合わせた場合においても肉腫成分は確認されなかった。さらに、*Cdkn2a* あるいは *Pten* 発現抑制を追加した場合にはリンパ節や肺への転移がみられ、その頻度は *Cdkn2a* 発現抑制を追加した場合で、より高頻度であった (表 1)。

表 1. *Kras*^{LSL-G12D/+}; *Tgfb2*^{flox/flox} EmOR からの発がん誘導および転移の評価

Genotype of EmOR	Lentiviral infection		Ex. n	SCT	Histology			Metastasis	
	1st	2nd			AC	Mixed	SCC	LN	Lung
<i>Kras</i> ^{LSL-G12D/+} ; <i>Tgfb2</i> ^{flox/flox}	pLKO.1	—	2	0	—	—	—	0/2	0/2
	Cre	—	2	2	0	2	0	0/2	0/2
	Cre	shLuc	6	6	2	4	0	1/6	0/6
	Cre	shCdkn2a #1	6	6	3	3	0	5/6	5/6
	Cre	shCdkn2a #2	3	3	1	2	0	3/3	2/3
	Cre	shPten #1	5	5	1	1	3	0/5	1/5
	Cre	shPten #2	3	3	0	3	0	1/3	0/3

SCT: 皮下腫瘍、AC: 腺癌、SCC: 扁平上皮癌、Mixed: AC と SCC の両成分が 30%以上、LN: リンパ節。

3. 変異型 *Kras* と *Tgfb2* 片側アレル欠失および *Cdkn2a* 発現抑制は転移を伴う癌肉腫および癌を誘導した

子宮体がんの発がんおよび転移と *Tgfb2* との関連を更に検証するため、*Kras*^{LSL-G12D/+}; *Tgfb2*^{flox/+} マウス由来の EmOR を用いて実験を行った。まず変異型 *Kras* と *Tgfb2* 片側アレル欠失による腫瘍原性を評価したが、腫瘍形成は確認されなかった。そこでさらに *Cdkn2a* あるいは *Pten* の発現抑制を追加したところ、腫瘍形成が確認された。組織学的には研究 2 の結果と類似していたが、*Cdkn2a* を追加した場合には癌肉腫の場合が多かった。リンパ節や肺への転移についても研究 2 の結果と同様に *Cdkn2a* を追加した方が高頻度であった。また、腫瘍由来 OR では高頻度に野生型 *Tgfb2* アレルが欠失しており、*Tgfb2* 両アレルを欠失した細胞が優位に選択されている可能性が示唆された (表 2)。

表 2. *Kras*^{LSL-G12D/+}; *Tgfb2*^{flox/+} EmOR からの発がん誘導および転移の評価

Genotype of EmOR	Lentiviral infection		Ex. n	SCT	Carcinoma			CS	Metastasis	
	1st	2nd			AC	Mixed	SCC		LN	Lung
<i>Kras</i> ^{LSL-G12D/+} ; <i>Tgfb2</i> ^{flox/+}	pLKO.1	—	2	0/2	—	—	—	—	0/2	0/2
	Cre	—	2	0/2	—	—	—	—	0/2	0/2
	Cre (long latency)	—	2	2/2	1	1	0	0	0/2	0/2
	Cre	shLuc	4	3/4	2	1	0	0	0/4	0/4
	Cre	shCdkn2a #1	4	4/4	0	1	0	3	3/4	2/4
	Cre	shCdkn2a #2	1	1/1	0	1	0	0	0/1	0/1
	Cre	shPten #1	4	4/4	0	2	2	0	2/4	1/4
Cre	shPten #2	1	1/1	0	1	0	0	0/1	0/1	

SCT: 皮下腫瘍、AC: 腺癌、SCC: 扁平上皮癌、Mixed: AC と SCC の両成分が 30%以上、LN: リンパ節。

考 察

本研究では *Tgfb2*、*Cdkn2a* および *Pten* が変異型 *Kras* を発現した子宮内膜細胞の発がんや転移において重要な役割を担っていることが明らかとなった。我々は以前 EmOR に変異型 *Kras* と *Cdkn2a* 発現抑制では癌肉腫が誘導可能なことを報告 [3] しているが、そこに *Tgfb2* の両アレルの欠失を追加すると癌肉腫ではなく、転移性癌が誘導された。一方で *Tgfb2* の片側アレル欠失を追加した場合には高頻度に癌肉腫が誘導され、転移も確認される場合があった。TGF- β による上皮間葉転換 (EMT) の主な制御因子である *Snail* の誘導は、活性化 Ras シグナルとの協調に大きく依存していたことが報告されている [6]。このことから、*Tgfb2* 存在下でのみ変異型 *Kras* を発現した子宮内膜細胞で EMT が起こり、肉腫成分が発生したことが示唆された。今回樹立した転移モデルは安定的に皮下腫瘍を形成し、自発的にリンパ節および肺に転移する。したがって、新たなマウスがん

転移モデルとして様々な研究に貢献することが期待される。

共同研究者・謝辞

本研究は、千葉県がんセンター研究所の筆宝義隆所長との共同研究として実施しました。また、多大なご支援を賜りました公益財団法人上原記念生命科学財団に、この場を借りて深く感謝申し上げます。

文 献

- 1) Matsuura T, Maru Y, Izumiya M, Hoshi D, Kato S, Ochiai M, Hori M, Yamamoto S, Tatsuno K, Imai T, Aburatani H, Nakajima A, Hippo Y. Organoid-based ex vivo reconstitution of Kras-driven pancreatic ductal carcinogenesis. *Carcinogenesis*. 2020 Jun 17;41(4):490-501. doi: 10.1093/carcin/bgz122. PMID: 31233118.
- 2) Maru Y, Tanaka N, Tatsumi Y, Nakamura Y, Yao R, Noda T, Itami M, Hippo Y. Probing the tumorigenic potential of genetic interactions reconstituted in murine fallopian tube organoids. *J Pathol*. 2021 Oct;255(2):177-189. doi: 10.1002/path.5752. Epub 2021 Jul 21. PMID: 34184756.
- 3) Maru Y, Tanaka N, Tatsumi Y, Nakamura Y, Itami M, Hippo Y. Kras activation in endometrial organoids drives cellular transformation and epithelial-mesenchymal transition. *Oncogenesis*. 2021 Jun 25;10(6):46. doi: 10.1038/s41389-021-00337-8. PMID: 34172714.
- 4) Onuma K, Ochiai M, Orihashi K, Takahashi M, Imai T, Nakagama H, Hippo Y. Genetic reconstitution of tumorigenesis in primary intestinal cells. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2013 Jul 2;110(27):11127-32. doi: 10.1073/pnas.1221926110. Epub 2013 Jun 17. PMID: 23776211.
- 5) Maru Y, Onuma K, Ochiai M, Imai T, Hippo Y. Shortcuts to intestinal carcinogenesis by genetic engineering in organoids. *Cancer Sci*. 2019 Mar;110(3):858-866. doi: 10.1111/cas.13938. Epub 2019 Feb 3. PMID: 30637899.
- 6) Horiguchi K, Shirakihara T, Nakano A, Imamura T, Miyazono K, Saitoh M. Role of Ras signaling in the induction of snail by transforming growth factor-beta. *J Biol Chem*. 2009 Jan 2;284(1):245-253. doi: 10.1074/jbc.M804777200. Epub 2008 Nov 14. PMID: 19010789.