

【目的】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、遺伝子改変したマウス由来オルガノイド（OR）をヌードマウス皮下に接種して腫瘍原性を評価する『ハイブリッド型発がんモデル』の開発を進めてきた。本手法では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構成することで、多段階発がん過程を再現可能であり、基本的にGEMの結果と同等の結果が得られる。子宮内膜OR（EmOR）では変異型 *Kras* と *Cdkn2a* 発現抑制あるいは *Trp53* 欠失を組み合わせることで高率に癌肉腫が誘導可能であることを見出したが、過去のGEMでの結果と異なり腺癌の誘導には成功していなかった。一方、EmORの長期間培養後に同様の実験を行ったところ、偶然にも転移性腺癌が誘導された。その後、腫瘍由来ORや皮下接種前の遺伝子改変ORを詳細に解析したところ、*Tgfbr2*の段階的なコピー数変化が確認された。そこで本研究では*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と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。

【方法】3種類のGEM (*Kras*^{LSL-G12D/+}, *Kras*^{LSL-G12D/+}; *Tgfbr2*^{lox/lox}, *Kras*^{LSL-G12D/+}; *Tgfbr2*^{lox/+}) からEmORを作製し、レンチウイルスを用いてCreやshRNAを導入することで*in vitro*で遺伝子改変を行った。その後、遺伝子改変ORをヌードマウス皮下に接種し腫瘍原性を評価した。皮下腫瘍が確認された場合は、病理組織学的解析を行うとともに、腫瘍の一部からORを樹立し、ゲノムPCRやウェスタンブロッティングを実施し、皮下接種前ORと比較した。

【結果】EmORに変異型 *Kras* と *Tgfbr2* 両アレル欠失を組み合わせると、ヌードマウス皮下で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* 発現抑制をさらに追加したところ、*Cdkn2a* 発現抑制では肉腫成分のない転移性癌がほぼ全例で誘導されたが、*Pten*の方では転移誘導はごく一部に限られた。変異型 *Kras* と *Tgfbr2* 片側アレル欠失の組み合わせでは腫瘍化に不十分であったが、さらに *Cdkn2a* あるいは *Pten* 発現抑制を追加したところ、それぞれ主に癌肉腫と癌が誘導され、一部では転移も確認された。また、樹立した腫瘍由来オルガノイドでは野生型 *Tgfbr2* アレルが高頻度に欠失していた。以上のように、本研究では *Tgfbr2*, *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。

オルガノイドを用いたハイブリッド型発がんモデル

