

平成26年度（第47回）がん研究助成金研究報告書

新規肝内胆管がんモデルを用いた分子標的治療抵抗性の分子機構解明と克服法の開発

千葉県がんセンター 研究所発がん制研究部 部長 筆宝義隆

背景と目的

がん特異的遺伝子産物に対する分子標的薬は、“oncogene addiction”に基づくその劇的な治療効果と副作用の少なさから近年の創薬開発の主流となっている。しかし、投与後の耐性株出現が高頻度で見られることから、その対策法の確立が喫緊の課題となっている。耐性化のメカニズムとしては、(1)当該遺伝子変異の再導入による薬剤結合部位の構造変化、(2) Kras 変異などによる他のシグナル経路の活性化、などが臨床検体の解析から明らかにされているが、耐性化の研究に最適化されたモデル系が未開発のため、詳細な分子機構の解明およびその克服法の確立は未だ不十分な状態に留まっている。

申請者は以前、三次元初代培養下のマウス正常腸管上皮オルガノイドに、レンチウイルスを用いて極めて高い効率で遺伝子導入を行いヌードマウス皮下に接種することで、短期間に腫瘍が誘導可能であることを報告した (Onuma et al, PNAS, 2013)。腫瘍は大腸がん類似の腺がんの組織像を呈し、導入する遺伝子異常の組み合わせと観察されるがん化への協調作用の関係も遺伝子改変マウスを用いた過去の研究結果とほぼ同様であることから、オルガノイドを用いた初の発がんモデルとして評価されている (Lancaster et al, Science, 2014)。さらに、同様の手法により Kras 依存的な新規肝内胆管がんモデルの開発も進めている。

最近ヒト胆管がんで FGFR2 融合遺伝子が新規に同定され、Kras 変異と相互排他的であることが報告された (Arai et al, Hepatology, 2013)。治療標的候補として期待を集めているが、同融合遺伝子を有する胆管がん細胞株はこれまでに報告されていない。そこで、FGFR2 融合遺伝子ドライバーとする胆管がんオルガノイドをまず作成した後に、FGFR2 阻害剤投与や Kras 活性化により誘導される治療抵抗性モデルを確立し、それを利用して分子標的治療薬耐性化の分子機構解明と克服法開発を目指すことを本研究の目的とした。

結果

(1)Kras 変異をドライバーとするマウス胆管がんオルガノイドの作成

マウスから肝臓を採取し、酵素処理などにより単一細胞の集団を得た。マトリゲルと非血清培地を用いた 3 次元培養を 2 週間行う過程で、非上皮細胞はすべて死滅あるいは除去され純粋な上皮細胞オルガノイドを得た。これらは CK19 陽性で Alb 陰性であることから胆管上皮細胞の集団と考えられた。LSL-KrasG12D マウス由来の肝臓オルガノイドに対してレンチウイルスで Cre-recombinase を導入し Kras 変異の発現を誘導した。このオルガノイドをヌードマウスに移植しても皮下腫瘍を形成しないため、Cdkn2a, Pten, p53, Apc など各種癌抑制遺伝子に対する shRNA を追加導入した上でヌードマウス皮下へ採取した。6 – 8 週間後に解剖して皮下腫瘍および腫瘍が形成されていることを確認した。組織学的な解析の結果、いずれも腺癌類似の組織像であり、一部の病変は前癌病変相当の乳頭状増殖を示し、囊胞を伴う症例も複数認めた。これらの結果より Kras 変異をドライバーとする肝内胆管癌モデルを確立したと結論した。

(2)FGFR2 融合遺伝子をドライバーとするマウス胆管がんオルガノイドの作成

同様に、肝臓由来オルガノイドに FGFR2 融合遺伝子をレトロウイルスで導入し、次いでレンチウイルスベクターを用いて各種がん抑制遺伝子に対する shRNA を導入した。ヌードマウス皮下に 5×10^5 の細胞に相当するオルガノイドを接種したところ、5-6 週間後に shLuc ではわずかに皮下腫瘍が形成されたものの、shCdkn2a の導入では腫瘍径の有意な増大を認めた。これら皮下腫瘍は組織学的には中分化の胆管癌に相当する所見を示した。これらの皮下腫瘍を再び 3 次元培養で上皮細胞を純化して胆管癌オルガノイドの細胞株を 2 種類得た。GFP を導入した正常胆管オルガノイド 1 例と FGFR2-AHCYL1 をドライバーとする胆管癌オルガノイド 2 例について FGFR2 の阻害薬である PD173074 および BGJ398 を投与したところ、正常胆管オルガノイドでは増殖抑制効果が極めて弱かったのに対して胆管癌オルガノイドでは強い増殖抑制効果を示した。このことから、これらのがん細胞株が確かにドライバー遺伝子に依存する oncogene addiction の状態にあることが示唆された。

(3)胆管オルガノイドに対する FGFR2 融合遺伝子の弱い発がん性

一方、その後実験を繰り返す過程で、こうした腫瘍形成は若いマウス由来のオルガノイド

を長期培養後に実験に用いた場合にのみで見られることが判明し、腫瘍形成率は6回の実験中2回に留まった。Kras変異をドライバー遺伝子とした場合、shCdkn2aの導入により100%の確率で腫瘍が得られることを考慮すると、FGFR2融合遺伝子のがん遺伝子としての発がん性はKras変異よりも有意に低いことが示唆された。比較のためにFGFR2融合遺伝子をNIH3T3細胞に導入した際には、in vitroでも形質転換様の細胞形態変化を示し、短期間でヌードマウス皮下に巨大な腫瘍を作成したことから、用いた胆管オルガノイド自体が相対的に発がん抵抗性であることも示唆された。皮下腫瘍が誘導されなかつた場合でも胆管オルガノイドにFGFR2融合遺伝子は確かに挿入され、mRNAが発現していることは確認されたものの、タンパクレベルではNIH3T3細胞と比較して顕著に発現が低かった。このことが発がん性の低下に関連していることが示唆されたため、p53KOやPik3ca変異の細胞を用いて同様の実験を行ったものの、やはり腫瘍形成を認めなかつた。肝内および肝外胆管癌の両方でKras変異が検出されるのに対して、FGFR2融合遺伝子は肝内胆管がんでのみ検出されることを考慮すると、肝臓の微小環境または肝細胞へのある程度の分化傾向がFGFR2融合遺伝子による発がんに必要であることが示唆された。

(4) FGFR2阻害剤投与またはKras活性化により出現する耐性クローニングの解析

FGFR2阻害剤は正常胆管細胞の増殖には影響を与えないが、FGFR2融合遺伝子をドライバーとする胆管がん細胞株には増殖抑制効果を示すことが確認されたことから、分子標的薬としての性質を備えていると考えられる。抗腫瘍効果の実体は細胞周期の停止であり、細胞死は誘導しないため阻害剤存在下での長期間培養により耐性クローニングオルガノイドの出現が予想される。一方、LSL-KrasG12Dマウス由来の細胞に対しては、Cre-recombinase遺伝子をレンチウイルスで導入することにより任意のタイミングでKrasを活性化することが可能である。そこで、同細胞を用いてFGFR2融合遺伝子をドライバーとする胆管がん細胞株をあらかじめ作成しておき、Kras活性化によりFGFR2阻害剤抵抗性を誘導される実験を計画した。しかしながら、LSL-KrasG12Dマウス由来胆管オルガノイド細胞を用いた実験では上述の様にFGFR2融合遺伝子による発がんの誘導が困難であり、同遺伝子に依存した腫瘍は得られなかつた。そのため、LSL-KrasG12Dマウス由来オルガノイドを用いたFGFR2阻害剤抵抗性がん細胞株の作出に至らなかつた。

考察

FGFR2 融合遺伝子は肝内胆管上皮の発がんにおけるドライバー遺伝子となりうることが分かったが、その活性は Kras 変異よりは有意に低く、また肝臓の微小環境または肝細胞への分化を必要とする可能性が示唆された。そのため、培養条件の最適化が必要と考えられ、現在肝細胞への分化を誘導する条件において発がん誘導が可能か検討を続けている。

学会発表

- (1) Yoshitaka Hippo, Masako Ochiai, Kaoru Orihashi, Yoshiaki Maru, Tetsuya Matsuura, Toshio Imai. A Novel Cell-based Model for Intrahepatic Cholangiocarcinoma (英語口演). 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
- (4)筆宝義隆（ワークショップ）「オルガノイドを用いた胆道上皮発がん過程の解析」第 24 回肝細胞研究会（旭川）2017 年 6 月
- (5) 泉谷昌志、吉原靖典、丸喜明、落合雅子、松浦哲也、今井俊夫、筆宝義隆（ポスター）「変異遺伝子の *in vitro* 再構成による胆管細胞発がんの誘導」第 77 回日本癌学会学術総会（大阪）2018 年 9 月

論文発表

- (1) Ochiai M, Yoshihara Y, Maru Y, Tetsuya M, Izumiya M, Imai T, Hippo Y. Kras-driven heterotopic tumor development from hepatobiliary organoids. *Carcinogenesis*. doi: 10.1093/carcin/bgz024. [Epub ahead of print] 2019