

平成 30 年 7 月 25 日現在

機関番号：17501

研究種目：国際共同研究加速基金（国際共同研究強化）

研究期間：2016～2017

課題番号：15KK0351

研究課題名（和文）胃癌悪性化におけるDDX27発現亢進の機能的意義（国際共同研究強化）

研究課題名（英文）Overexpression of DDX27 in gastric cancer(Fostering Joint International Research)

研究代表者

塚本 善之（TSUKAMOTO, Yoshiyuki）

大分大学・医学部・助教

研究者番号：00433053

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 7,500,000円

渡航期間： 24ヶ月

研究成果の概要（和文）：オランダHubrecht研究所のClevers Groupと共同研究を行った。Clevers Groupは2009年に小腸組織の三次元培養（オルガノイド培養）に成功した（Sato et al, Nature 2009）。オルガノイド培養はその後、様々な臓器、癌や遺伝性疾患を含む病変部からも組織培養を可能にしたため、新たな疾患モデルとして注目されている。共同研究では、オルガノイドがコラーゲン内で融合することに着目し、これまでマイクロレベルの大きさだったオルガノイドをマクロレベルで培養することに成功した。この成果は将来的にIn vitroの薬剤評価系や移植複合体の開発に役立つことが期待される。

研究成果の概要（英文）：Principal investigator collaborated with Clevers Group (Hubrecht Institute, the Netherlands), where a three dimensional culture method for intestinal organoids has been established in 2009 (Sato et al, Nature 2009). In this study, we established macroscopic intestinal tubes from small cystic organoids by using floating collagen gels. The organoids cultured in soft-floating collagen fused together via collagen gel contraction and formed continuous tube structure. We found that the tubes contain stem and most types of the differentiated intestinal cells. In future, the macroscopic tubes might be used as an in vitro model of intestinal epithelium in investigations, such as drug effects and regenerative medicine.

研究分野：分子病理学

キーワード：オルガノイド

1. 研究開始当初の背景

近年、癌の基礎研究分野においてはマイクロアレイや次世代シーケンス法などにより遺伝子異常の網羅的解析が急速に発展しており、多数の癌関連遺伝子が同定・報告されている。しかし、それらを標的とした治療法は動物実験レベルでの前臨床試験では一定の効果を得られるものの、患者対象とした臨床試験で良い成績を残せるのはほんのわずかである。この原因として、阻害剤の開発段階というよりは、前臨床試験を臨床試験につなぐためのトランスレーショナルリサーチの段階が不十分であることが挙げられる。つまり、開発された分子標的薬で効果が期待できる患者のスクリーニングが適切に行われていないことが考えられる。代表者の基課題「胃癌悪性化における DDX27 発現亢進の機能的意義」も癌遺伝子に着目した治療法を目指しているため、同様な課題が当てはまる。私の受け入れ機関である Hubrecht Institute の Clevers Group はこの問題を解決するために、癌患者由来のオルガノイドによる薬剤スクリーニングのシステムを確立しつつある。

オルガノイドは幹細胞技術を応用した、組織の三次元培養である。2009 年に Clevers group の佐藤らがマウス小腸のオルガノイド培養を報告して以来 (Sato et al, Nature 2009)、大腸、胃、肝臓、膵臓、前立腺、乳腺、などのヒトとマウスのほぼ全身臓器について上皮組織由来オルガノイドの培養法が報告されている。さらに、癌患者、遺伝性疾患などの組織からも高効率で (大腸組織・大腸癌からは 80% 以上の成功率) 樹立することが可能であるため、従来の細胞株とは異なる新たな疾患モデルとして注目されている。

2. 研究の目的

代表者は受け入れ機関の持つ技術を基課題へ応用するために、まずはマウス腸管オルガノイド培養を使った新しいモデルの確立を目指した。また、それと並行し、ヒト癌由来オルガノイドを用いた培養技術の獲得と、薬剤感受性試験の条件決定を試みた。Clevers Group においてマウスおよびヒト由来オルガノイドの取り扱いについて実験手技的な部分だけで無く倫理面や臨床応用するためのストラテジーを経験することにより、国内におけるトランスレーショナルリサーチの確立へ役立てたいと考えた。

3. 研究の方法

マウス小腸オルガノイド (Slorg) の単離

- 1) マウス小腸を切り出し、内容物を洗い出し、PBS で洗浄する。
- 2) 30 分乾 EDTA で処理をする
- 3) 激しく攪拌する。
- 4) 遊離した腺管 (クリプト) をフィルターで

回収する。

- 5) クリプトをカウントし、200 個を 20 μ l マトリゲルで包埋する
- 6) 幹細胞のニッチ因子 (Rspodin, Noggin, EGF) を含む幹細胞培地で培養する

マトリゲル培養

- 1) マトリゲル内に包埋された Slorg をガラスキャピラリーで激しくピペティングする
- 2) 破碎されたオルガノイドを懸濁する
- 3) 遠心し、マトリゲルへ包埋して培養する

コラーゲン培養

- 1) マトリゲル内に包埋された Slorg をガラスキャピラリーで激しくピペティングする
- 2) 破碎されたオルガノイドを培地で懸濁する
- 3) 遠心で回収し、軟性コラーゲン (0.75 μ g/ml Type I collagen) へ包埋する。
- 4) コラーゲンと Slorg 複合体が固まった後、チップから放出する培地にて複合体を浮遊状態にし、培養する

免疫染色

- 1) マトリゲルもしくはコラーゲンへ包埋した Slorg を 4% パラホルムアルデヒドで固定する
- 2) パラフィン包埋ブロックを作製し、そこからマイクロトームで 4 μ m の切片を作製する。
- 3) キシレンでパラフィンを取り除き、エタノールで水和する。
- 4) ペルオキシダーゼ処理
- 5) ブロッキング
- 6) 一次抗体は以下の抗原に対するものを使用した
Ki67 (細胞増殖マーカー)、カテニン (Wnt シグナル活性マーカー)、Lysozyme (パネート細胞マーカー)、Chromogranin A (内分泌細胞マーカー)
- 7) PBS 洗浄後、二次抗体反応
- 8) DAB にて発色

リアルタイム PCR

- 1) マトリゲルもしくはコラーゲンへ包埋した Slorg から RNA を回収する。
- 2) 回収した RNA を逆転写し、cDNA を作製する
- 3) SYBR Green を用いて定量的 PCR を行う

4. 研究成果

Slorg のマトリゲル培養とコラーゲン培養の比較

Slorg についてマトリゲルを用いた 3 次元培養と浮遊性の軟コラーゲンを用いた培養の比較を行った。図 1 に示されるように、マトリゲル内では多数のパディング構造が観察されたが、コラーゲン内ではそれぞれの Slorg が融合し、長い管構造を構築することが分かった。



図1. マトリゲル培養とコラーゲン培養の比較

管構造形成のメカニズム

次に、コラーゲン内で Slorg が管構造を形成するメカニズムを解析するため、オルガノイド融合の可能性を検討した。この実験では 2 種類のトランスジェニックマウス由来の Slorg が用いられた。1 つは赤色の蛍光を持ち、もう 1 つは緑色の蛍光を持つ。これらを混ぜ合わせることで、管構造を形成するのに単一の細胞からの増殖が必要か、もしくはオルガノイド同士の融合が必要か、を解析した。図 2 に示すように、2 種類のオルガノイドは互いに融合し合うことが分かった。

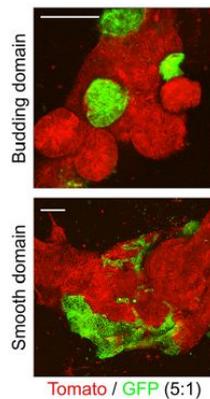


図2. オルガノイド融合

さらに、融合のメカニズムとして、ゲル収縮を検討した。図 3 に示されるように、Slorg が包埋されていない場合、マトリゲルとコラーゲンゲルはいずれも収縮しなかった。しかし、Slorg を包埋すると、マトリゲルは全く収縮が認められなかったのに対し、コラーゲンゲルは 40%ほど収縮することが分かった。以上の結果より、浮遊性軟コラーゲン内の Slorg はゲル収縮により互いの距離が接近することで融合が促進され、大きな管構造を形成することが推測された。

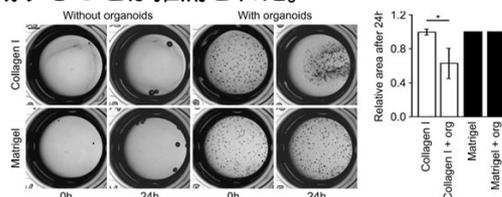


図3. ゲル収縮解析

管腔型 Slorg の細胞系譜

次に、管腔型 Slorg 内にどのような分化型細胞が存在するか、免疫組織染色および電子顕微鏡により観察した。図 4A に示されるように、管腔型 Slorg は空洞を維持しながら、継ぎ目の無い構造であることが分かった。さらに、図 4B,C に示されるように、小腸上皮を形成する主な細胞系譜を持つことが分かった。

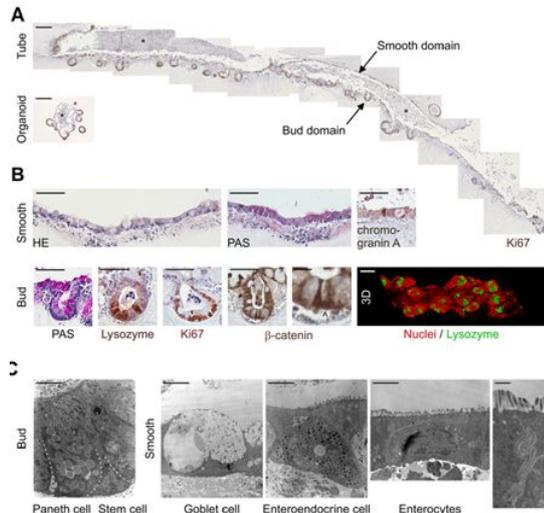


図4. 管腔型Slorgの組織学的解析

以上の研究より、浮遊型軟コラーゲン内で作製された管腔型 Slorg は従来のマトリゲル内で作製されるオルガノイドに比べ、大型でありながら、機能的な分化細胞および幹細胞を持つことが示唆された。将来的に、Invitroでの薬剤評価系や機能を持つ移植細胞として応用されることを期待する。

この研究を通してオルガノイド技術を身につけるとともに、国際的な研究上の連携を持つことに成功した。さらに、代表者は受け入れ機関においてヒト癌組織からのオルガノイド樹立法および薬剤感受性解析の方法を取得した。今回形成された国際的な連携を維持し、将来的に代表者が所属する機関で癌オルガノイドによるトランスレーショナルリサーチを展開する際に、レベルの高い国際的な研究環境を維持していきたい。

5. 主な発表論文等 (研究代表者は下線)

[雑誌論文](計2件)

1. Sachs N, Tsukamoto Y, Kujala P, Peters PJ, Clevers H. (全5名)

Intestinal epithelial organoids fuse to form self-organizing tubes in floating collagen gels.

2017, Development 査読有

Mar 15;144(6):1107-1112.

doi: 10.1242/dev.143933.

2. Mizutani T, Tsukamoto Y, Clevers H (全
3名)

Oncogene-inducible organoids as a
miniature platform to assess cancer
characteristics.

2017, J Cell Biol 査読有

Jun 5;216(6):1505-1507.

doi: 10.1083/jcb.201704014.

〔学会発表〕(計0件)

〔図書〕(計0件)

〔産業財産権〕

出願状況(計0件)

名称:

発明者:

権利者:

種類:

番号:

出願年月日:

国内外の別:

取得状況(計0件)

名称:

発明者:

権利者:

種類:

番号:

取得年月日:

国内外の別:

〔その他〕

<http://www.med.oita-u.ac.jp/byori2/index.htm>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

塚本 善之 (TSUKAMOTO, Yoshiyuki)

大分大学・医学部・助教

研究者番号: 00433053

(2) 研究協力者

〔主たる渡航先の主たる海外共同研究者〕

Hans, CLEVERS

ヒュブレヒト研究所・クレバースグルー

プ・グループリーダー