

平成 30 年 6 月 12 日現在

機関番号：15401

研究種目：研究活動スタート支援

研究期間：2016～2017

課題番号：16H06999

研究課題名(和文)オルガノイド、CRISPR/Cas9を用いた腸型・胃型胃癌モデルの樹立

研究課題名(英文) Establishment of the model of intestinal and gastric type gastric cancer using CRISPR/Cas9 and organoid

研究代表者

坂本 直也 (Sakamoto, Naoya)

広島大学・医歯薬保健学研究科(医)・助教

研究者番号：20571798

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,300,000円

研究成果の概要(和文)：手術検体から採取した腸上皮化生、固有胃腺から、培養条件、FACSを用いて選別することで、それぞれのオルガノイドの樹立を行っている。胃がんの特徴的な遺伝子異常を導入するべく、CRISPR/Cas9を用いて、段階的な遺伝子編集を行なっている。腸型粘液、胃型粘液形質を有する胃がんオルガノイドを樹立し、5-FU、オキサリプラチンの感受性を検討し、腸型胃癌が胃型胃癌と比較し、5-FU耐性である傾向が確認された。

研究成果の概要(英文)：We have established the organoids from intestinal metaplasia and fundic/pyloric gland by using the selection of culture condition and FACS, and then try to introduce several genomic abnormalities that are characteristic especially in gastric cancer (GC) using CRISPR/Cas9 system. We also generated the organoids from GC cases with intestinal and gastric mucin phenotype, respectively. It was found that GC organoids with intestinal mucin phenotype showed more significant resistance against 5-FU than GC organoids with gastric mucin phenotype.

研究分野：病理学

キーワード：オルガノイド CRISPR/Cas9 ゲノム編集

1. 研究開始当初の背景

胃癌罹患患者数の約6割はアジア地域で占められており、わが国において非常に頻度の高い悪性腫瘍である。胃癌は免疫組織学的な粘液発現のパターンにより、MUC2 もしくは CD10 陽性の腸型胃癌、MUC5AC もしくは MUC6 陽性の胃型胃癌に大別される。腸型胃癌、胃型胃癌では、背景に存在する遺伝子・分子異常を含めた pathogenesis が大きく異なることが知られており、当研究室では、トランスクリプトーム解析により、Reg IV、OLFM4 等、腸型・胃型胃癌それぞれの発生・進展に寄与する胃癌関連遺伝子を多数同定してきた。

2009年に、マウスの小腸幹細胞からオルガノイドと呼ばれる生体内の組織に類似した構造を *in vitro* で培養する技術が報告されて以来、様々な臓器のオルガノイドが樹立されている。またヒト正常結腸オルガノイドに対し、CRISPR/Cas9 を用いて大腸癌症例に好発する代表的な遺伝子変異を導入することにより、*in vitro* での大腸癌モデルの樹立が報告されている。胃に関しても、2013年にマウス、ヒトの正常固有胃腺オルガノイドの樹立、ウイルスベクターを用いた遺伝子編集による胃癌オルガノイドの樹立が報告されている。

2. 研究の目的

1) ヒト腸上皮化生及び固有胃腺からそれぞれオルガノイドを樹立し、CRISPR/Cas9 を用いて実際の胃癌症例に好発する遺伝子異常を導入することで、腸型胃癌、胃型胃癌オルガノイドモデルを樹立することを目指す。

2) 腸型胃癌、胃型胃癌オルガノイドモデルを網羅的、体系的に解析し、腸型・胃型胃癌の発生・進展に sufficient な遺伝子異常を明らかにすることを目指す。

3. 研究の方法

1) 腸上皮化生、固有胃腺のオルガノイドの樹立

まず胃癌外科的切除材料もしくは胃内視鏡生検標本から、腸上皮化生、正常固有胃腺のサンプルを採取した。ヒト腸上皮化生は小腸、結腸オルガノイドの培養条件、固有胃腺は胃の条件下で培養した。適宜 FACS による sorting で両者を厳密に選別して解析を進めた。加えて、それぞれのオルガノイドを各種染色標本により、形態学的、免疫組織学的に検討し、腸上皮化生及び固有胃腺としての特性を確認した。

2) CRISPR/Cas9 を用いた遺伝子変異の導入

The Cancer genome Atlas (TCGA) を中心に、胃がんにおける次世代シーケンス解析のデータを比較し、より高頻度に遺伝子

変異が見られる遺伝子を抽出し、driver mutation の候補遺伝子とした。

腸型胃癌の樹立においては、腸上皮化生オルガノイドに対して、APC deletion もしくは CTNBB1 mutation/ TP53 mutation (R175H, R273H) の導入を試みた。胃型胃癌の樹立に際しては、固有胃腺由来オルガノイドに対し、ARID1A, CDH1, MLH1, TGFBR2, ACVR2A の異常を導入を試みた。

3) 遺伝子編集により樹立した腸型・胃型胃癌オルガノイドモデルと、胃癌症例から樹立したオルガノイドの比較

実際の胃癌症例からオルガノイドを樹立し、免疫組織学的に腸型・胃型形質を確定した。それぞれ各5例程度のオルガノイドに関して、4)と同様に遺伝子発現プロファイル、染色体レベルの異常の検討を行う。

4) 腸型・胃型胃癌オルガノイドモデルにおける薬剤感受性の検討

本検討で樹立した腸型・胃型胃癌オルガノイドモデルを用いて、胃癌の化学療法に用いられる代表的な薬剤 (S-1, オキサリプラチン、シスプラチン等) に対する薬剤感受性を検討する。加えて、ラムシルマブ、トラスツズマブ等の分子標的薬に対する感受性も検討し、現在までに報告されている胃癌の化学療法のデータと比較する。

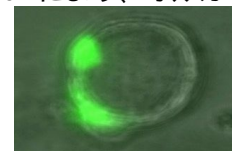
4. 研究成果

1) 腸上皮化生、固有胃腺オルガノイドの樹立

手術検体から採取した腸上皮化生、固有胃腺領域からオルガノイドの樹立を行い、Wnt/Noggin/R-spondin を中心とするニッチ因子を中心とし、p38 inhibitor や Nicotinamide、TGF- β inhibitor 等を加える腸条件では腸上皮化生オルガノイドが樹立でき、FGF10 等を加える胃条件では固有胃腺のオルガノイドの樹立に成功した。SOX2、PDX1、CDX2 の発現の有無により、FACS で sorting することにより、より厳密に腸上皮化生オルガノイド、固有胃腺オルガノイドを分離することに成功した。

2) CRISPR/Cas9 を用いた遺伝子変異の導入

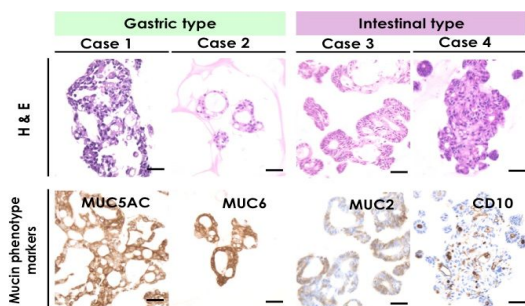
上記1)で樹立した腸上皮化生、固有胃腺のオルガノイドに対し、Guide RNA を組み込んだ vector を用いて、electroporation によって形質導入を行った。Guide RNA の設計は、cloning は Feng Zhang らが確立し、Addgene 上に公開している protocol に基づいて行った。EGFP 標識できる vector により、オルガノイド内に vector が取り込まれたことを確認した上で (右図)、現在段階的な遺伝子変異の導入を進めている。



3) 胃がん切除症例からのオルガノイドの樹立

立と胃型、蝶形粘液形質の検討

外科的に切除された胃がん症例の癌部のサンプルを用いて、オルガノイドを樹立を試みた。上記の腸上皮化生、固有胃腺のオルガノイドの分離、培養に用いた腸条件、胃条件でそれぞれ培養し、それぞれの条件で樹立腸条件、胃条件で樹立に成功した胃がんオルガノイドの組織切片を作成し、腸型粘液、胃型粘液形質を有する胃がんオルガノイドの樹立に成功したことを、それぞれ免疫染色で確認した。(下図)



Case 1 はスキルス胃がんであり、癌関連線維芽細胞の役割が重要とされる組織型においても、上皮部分のみをオルガノイドとして樹立することに成功し、その後も継続して継代培養を行っている。

4) 腸型・胃型胃癌オルガノイドモデルにおける薬剤感受性の検討

代表的な3例ずつに関して、5-FU、オキサリプラチンの感受性を検討した。腸型胃癌由来オルガノイドが胃型胃癌オルガノイドと比較し、5-FU 耐性である傾向が確認された。

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文](計11件)

査読: 全て有0

1. Sekino Y, Sakamoto N, 他 8 名 2 番目, Transcribed ultraconserved region Uc.63 promotes resistance to docetaxel through regulation of androgen receptor signaling in prostate cancer, *Oncotarget*. 8;94259-94270. 2017

2. Oue N, Sakamoto N, 他 7 名 7 番目, Overexpression of the Transmembrane Protein IQGAP3 Is Associated with Poor Survival of Patients with Gastric Cancer *Pathobiology*. 85(3):192-200. 2018

3. Shigematsu Y, Sakamoto N, 他 8 名 4 番目, Overexpression of the transmembrane protein BST-2 induces Akt and Erk phosphorylation in bladder cancer. *Oncology letter*, 14(1): 999-1004. 2017

4. Mukai S, Sakamoto N, 他 12 名 7 番目 Overexpression of PCDHB9 promotes peritoneal metastasis and correlates with poor prognosis in patients with gastric cancer *J Pathol*, 243(1) 100-110, 2017

5. Pham QT, Sakamoto N, 他 8 名 6 番目 The Expression of BTS-2 Enhances Cell Growth and Invasiveness in Renal Cell Carcinoma *Anticancer Res*. 37(6): 2853-2860. 2017

6. Honma R, Sakamoto N, 他 5 名 3 番目 Expression and function of Uc.160+, a transcribed ultraconserved region, in gastric cancer. *Gastric Cancer*; 20(6): 960-969. 2017

7. Taniyama D, Sakamoto N, 他 8 名 6 番目 Long-term follow-up study of gastric adenoma; tumor-associated macrophages are associated to carcinoma development in gastric adenoma. *Gastric Cancer*. 20(6): 929-939. 2017

8. Sakamoto N, Fearon ER 他 15 名 1 番目 BRAF^{V600E} cooperates with CDX2 inactivation to promote serrated colorectal tumorigenesis. *Elife*. 6: pii: e20331, 2017

9. Hattori T, Sakamoto N 他 3 名 4 番目 Clinicopathological significance of SPC18 in colorectal cancer: SPC18 participates in tumor progression. *Cancer Science*. 108(1): 143-150, 2017

10. Sekino Y, Sakamoto N 他 7 名 5 番目 KIF1C induces resistance to docetaxel and is associated with survival of patients with prostate cancer. *Urol Oncology*. 84(1): 16-24, 2017

[学会発表](計3件)

1. Sakamoto Naoya, Stem cell derived organoid: a promising tool for basic and clinical research. *Cridging Gaps in Oncology*. 2017

2. 本間りりの、坂本直也、他 4 名 2 番目: A gastric cancer organoid library provides a hopeful resource for drug screening. *日本癌学会*. 2017.

3. 坂本直也、CRISPR/Cas9 による胃型・腸型胃がんオルガノイドモデルの樹立及び薬剤感受性の検討、*日本消化器癌発生学会(国際学会)*、2017

〔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〕

ホームページ等

6. 研究組織

(1) 研究代表者

坂本 直也 (Sakamoto Naoya)
広島大学・医歯薬保健学研究科(医)・助教
研究者番号：20571798

(2) 研究分担者

()

研究者番号：

(3) 連携研究者

()

研究者番号：

(4) 研究協力者

()