

令和元年6月18日現在

機関番号：72602

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2016～2018

課題番号：16K14620

研究課題名(和文)大腸がん幹細胞の同定と細胞階層性・可塑性の解明

研究課題名(英文)Cellular diversity and hierarchy of colorectal cancer

研究代表者

八尾 良司(Yao, Ryoji)

公益財団法人がん研究会・がん研究所 細胞生物部・部長

研究者番号：80291095

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,900,000円

研究成果の概要(和文)：がん組織を構成する細胞集団の多様性は、がん組織の特性を規定する重要な要因であり、また治療抵抗性の大きな原因の一つである。本申請課題では、進行大腸がん手術検体から患者由来オルガノイドを樹立し、1細胞解析(scRNA-seq)により5つの細胞クラスターからなることを見出し、またDE解析により、幹細胞マーカーを同定した。ゲノム編集法により、幹細胞マーカー遺伝子座に可視化とcell-ablation実験を可能にするカセットを導入・解析した結果、本研究で同定された幹細胞が、がん組織の効率的な維持、増殖に必要な役割を果たしていることを見出した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

1細胞発現解析(scRNA-seq)により、進行大腸がん手術検体由来の三次元培養オルガノイドが、複数の細胞クラスターで構成されることが明らかになったことにより、がん組織の理解、さらにこれまで不可能であったヒトがん組織の解析が可能になった点で、高い学術的意義を有する。さらに、今後のがん治療法開発の理論的な根拠を与えることに加えて、オルガノイドが薬剤開発の研究リソースとして貢献できることを意味しており、社会的意義は大きい。

研究成果の概要(英文)：Cellular diversity of cancer tissue contributes to several biological aspects of cancer including resistance to chemotherapy. We have established patient-derived organoid from advanced colorectal cancer and have explored the cellular diversity. Single cell expression analysis (scRNA-seq) successfully identified five clusters determined by the distinct differentiation and proliferation markers. We have performed further detailed DE analysis, and have successfully identified the stem cell marker. The stem cells were visualized by genome editing of the organoid, and shown to have self-renew and multiple differentiation potentials. The ablation assay demonstrated that the stem cells were required for efficient maintenance and growth of the organoids. These observations demonstrated the cellular diversity and hierarchy of cancer tissue and may provide the cue to develop efficient therapeutics.

研究分野：細胞生物学

キーワード：大腸がん オルガノイド 1細胞解析

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19、CK - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

がん組織を構成する細胞集団の不均一性は、化学療法に対する治療抵抗性の一因であることが知られている。特に、がん幹細胞は、化学療法に対して抵抗性を示すことから、それぞれのがん種におけるがん幹細胞を同定し、その特性を明らかにすることは、奏効率の高い治療法の開発においても重要な課題である。

消化管組織においては、これまでに行われた多くの遺伝子改変マウスを用いた解析により、複数の幹細胞の存在が明らかにされている。これらは、少なくとも CBC (crypt base columnar cell) と +4 cell の 2 つのサブグループに分類される。前者は増殖能の高い cycling stem cell であり、後者はその reserver stem cell である。重要な事に、これらの消化管幹細胞は、+4 cell から CBC のみでなく、CBC から +4 cell に変換する事が示されており、それらの細胞階層性は可逆的である。

ヒト大腸がんは、APC 遺伝子の不活化が発がん過程の初期に生じ、その結果、消化管幹細胞の増殖が亢進することが知られている。しかし、その後のがん進展に伴う遺伝子変異の蓄積により、がん組織を構成する細胞集団がどのように変化するのかについては、明らかにされていない。

マウス消化管から樹立された 3 次元オルガノイド培養法は、生体組織の幹細胞から生じる様々な細胞集団の時空間的に再現することが示された。申請者は、大腸がん手術検体から 3 次元培養オルガノイドの樹立を進めており、これらは正常消化管に存在する様々な細胞の分化マーカーを発現していることを確認した。これらの結果から、これらを用いることにより、ヒト大腸がん組織に存在する細胞の多様性と階層性を明らかにする事ができると考えられた。

2. 研究の目的

本研究課題では、ヒト大腸がん組織を構成する細胞集団の多様性と階層性に焦点をあて、以下の 3 点を明らかにする。

- (1) 1 細胞解析による大腸がん組織を構成する細胞種の解析と幹細胞の同定
- (2) 大腸がん幹細胞の幹細胞性(stemness)と多能性(pluripotency)の解明
- (3) 大腸がん幹細胞選択的除去(cell ablation)による細胞可塑性の検討

3. 研究の方法

大腸がん手術検体から作製されたオルガノイドの細胞多様性を解析するために、以下の 4 つの手法を用いた。

(1) 大腸がんオルガノイドの 1 細胞遺伝子発現解析

申請者が樹立したヒト大腸がん由来オルガノイドのマイクロアレイを用いた網羅的遺伝子発現解析を行った。さらに、1 細胞解析を行い、それぞれの細胞が発現するマーカー遺伝子とその組み合わせによる細胞の分類を行い、進行大腸がん由来のオルガノイドがどのような細胞で構成されているかについて詳細に検討した。

(2) ゲノム編集による幹細胞遺伝子座へのマーカー遺伝子のノックイン

ヒト大腸がんオルガノイドのマーカー遺伝子と自殺遺伝子の融合カセットを開発し、CRISPR/Cas9 を用いたゲノム編集の最適化を行う。さらに、1 細胞遺伝子発現解析により同定された大腸がん幹細胞マーカー遺伝子座に、融合カセットのノックインを行う。

(3) 幹細胞性・多分化能の実証

上記で作製された遺伝子改変オルガノイドから FACS により幹細胞を単離し、オルガノイドの再構成実験を行う。選択した細胞に幹細胞性がない場合はオルガノイドはできない。一方、オルガノイドが再構成された場合には、それを構成する細胞の細胞多様性を検討する。これらの解析により、特定のマーカーを発現する大腸がん細胞の幹細胞性と多分化能を明らかにする。

(4) 幹細胞選択的 Cell ablation 実験

上記で作製された遺伝子改変オルガノイドで、自殺遺伝子を誘導的に活性化させることにより、cell ablation 実験を行い、幹細胞除去による組織の変化を解析する。標識された細胞が、オルガノイド組織の増殖、維持に必須ながん幹細胞である場合には、組織が崩壊すると考えられる。一方、標的細胞を除去しても、オルガノイドが維持される場合には、そのメカニズムを

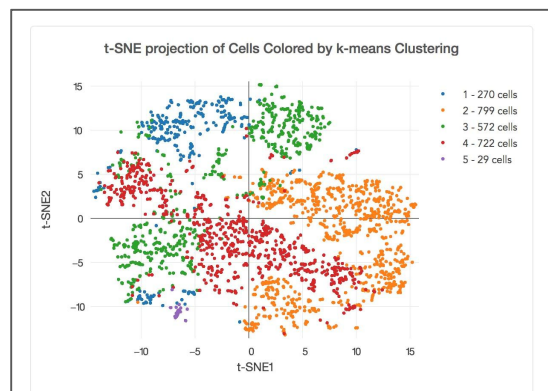


図 1. 大腸がんオルガノイドの 1 細胞発現解析。進行大腸がん手術検体から樹立されたオルガノイドを Chromium (10xGenomics 社) を用いて scRNA-seq 解析を行い、5 つのクラスターに分類した。

検討する。

4. 研究成果

(1) 大腸がんオルガノイドの1細胞遺伝子発現解析

がん研有明病院で手術が行なわれた大腸がん検体から樹立されたオルガノイドの中から、悪性度が高いがん組織から樹立されたオルガノイドの1細胞遺伝子発現解析を行なった。当該研究申請時には、C1 AutoPrep System(Fluidigm社)を用いて1細胞をキャプチャーし、溶解、cDNAの作製、前増幅を行い、BiomarkHD (Fluidigm社)を用いたハイスループットナリアルタイムPCRにより、intestinal cell signatureの発現解析を行う予定であった。しかし、本研究課題採択後Chromium (10xGenomics)のドロップレットscRNA-seqが国内で利用可能となったため、新学術領域研究先端ゲノム解析研究推進プラットフォームの支援を受け、解析手法を変更した。得られたデータは、Filtering、Gene ceilingなどの前処理の後、t-SNE やMDSを用いてdimensional reductionを行なった。さらに各クラスターを構成する細胞集団の発現遺伝子についてDE解析を行い、すでに正常消化管組織や大腸がんでは報告されている幹細胞マーカーや分化マーカーなどの遺伝子群をマップし、各クラスターの細胞階層性を検討した。その結果、ヒト大腸がんは、幹細胞様クラスター、2つの増殖活性が高いクラスター、2つの分化形質持つクラスターに分けることができることが明らかになった(図1)。さらに、幹細胞様クラスターを構成する細胞集団の発現遺伝子を詳細に解析することにより、大腸がん幹細胞マーカーを同定した。

(2) ゲノム編集による幹細胞遺伝子座へのマーカー遺伝子のノックイン

1細胞解析のバイオインフォマティクスをもとに作成された細胞多様性モデルの実証実験を行うために、効率的なオルガノイドのゲノム編集法を確立した。一般的に、相同組換え型のゲノム編集は、分裂細胞のもつ高い相同組換え活性に基づき行われるため、分裂活性が低い幹細胞の遺伝子組み換えには適さないと考えられた。そこで、非相同末端結合型のゲノム編集技術を用いて、高効率に幹細胞に変異を導入することを試みた(図2)。自殺遺伝子については、当初チミジンキナーゼ遺伝子を予定していたが、inducible Caspase9がより効率良く、細胞死を誘導することが報告された。そこで、ドナーには、IRES-EGFP-P2A-iCas9カセットを作成・使用した。これらの条件検討により、オルガノイド幹細胞のゲノム編集の最適化を行った。

(3) 幹細胞性・多分化の実証

最適化されたゲノム編集法を用いて、scRNA-seqにより同定された大腸がんオルガノイドの幹細胞マーカー遺伝子座の3' UTRにIRES-EGFP-P2A-iCas9カセットを挿入した。サザンブロットにより目的の変異のみが導入されていることを確認した後、幹細胞性と多分化能についての検討を行った。具体的にはFACSによりEGFP陽性細胞を単離し、シングルセルからのオルガノイドの再構成実験

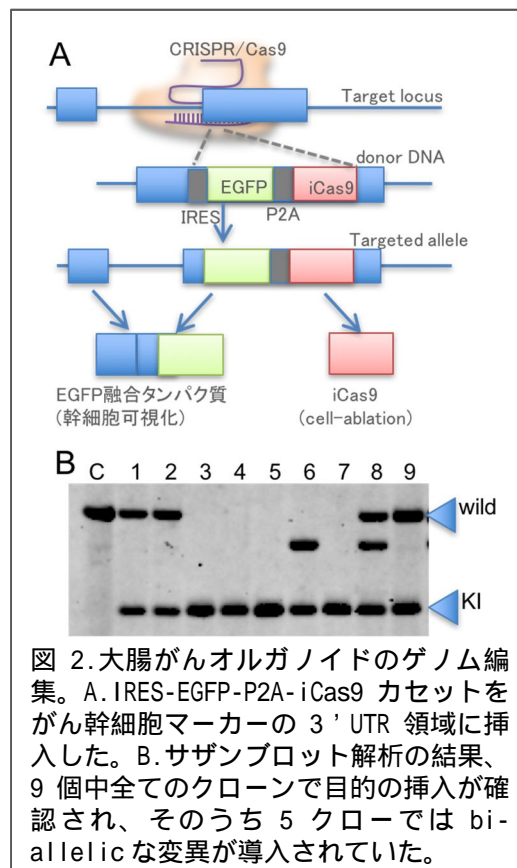


図2. 大腸がんオルガノイドのゲノム編集。A. IRES-EGFP-P2A-iCas9カセットをがん幹細胞マーカーの3' UTR領域に挿入した。B. サザンブロット解析の結果、9個中全てのクローンで目的の挿入が確認され、そのうち5クローでは bi-allelic な変異が導入されていた。

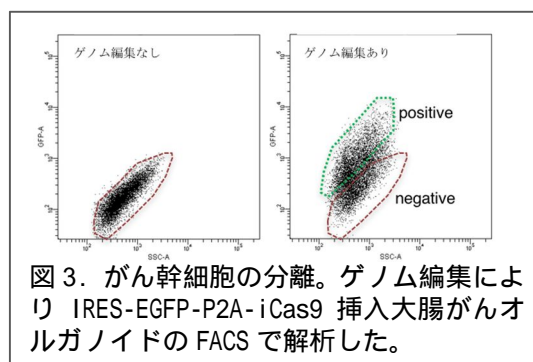


図3. がん幹細胞の分離。ゲノム編集により IRES-EGFP-P2A-iCas9 挿入大腸がんオルガノイドの FACS で解析した。

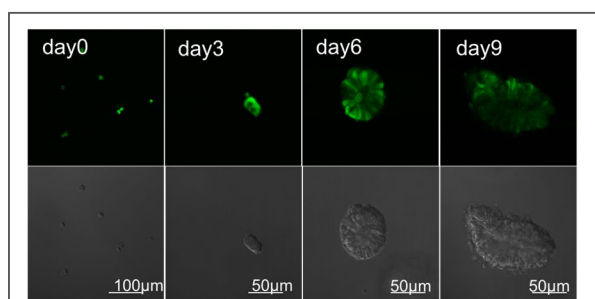


図4. オルガノイドの再構成。FACSによりがん幹細胞を単離し、1細胞からオルガノイドを再構成した。

を行なった(図3)。その結果、本研究課題により同定されたがん幹細胞は、自己複製能があること、さらにオルガノイドを再構成することができ、1細胞解析で同定された複数の細胞集団を生み出すことが明らかになった(図4)。これらの結果は、進行大腸がんにおいても、組織は多様な細胞集団により構成され、一定の階層性を持つことが明らかになった。

(4) 幹細胞選択的 Cell ablation 実験

上記で作成されたゲノム編集オルガノイドを iCas9 の二量体化を促進しアポトーシスを誘導する AP20187 を作用させ、幹細胞特異的な細胞除去を行なった(図5)。タイムラプス顕微鏡下の観察で、EGFP 陽性細胞は 24 時間で消失した。さらにオルガノイド全体の増殖も著しく阻害されたことから、本研究課題で同定されたがん幹細胞が、がん組織の効率的な維持、増殖に重要な役割を果たしている可能性が明らかになった。

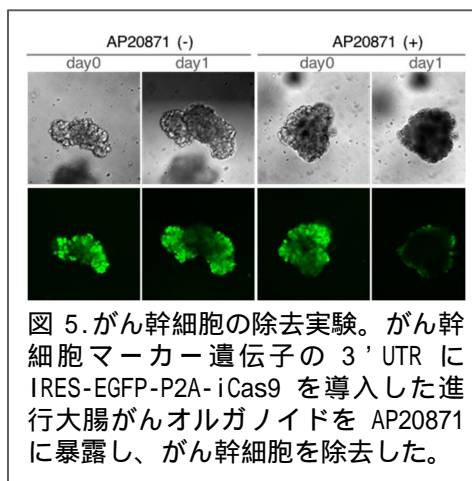


図 5.がん幹細胞の除去実験。がん幹細胞マーカー遺伝子の 3' UTR に IRES-EGFP-P2A-iCas9 を導入した進行大腸がんオルガノイドを AP20871 に暴露し、がん幹細胞を除去した。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計3件)

“TUFT1 interacts with RABGAP1 and regulates mTORC1 signaling.”, Kawasaki N, Isogaya K, Dan S, Yamori T, Takano H, Yao R, Morishita Y, Taguchi L, Morikawa M, Heldin CH, Noda T, Ehata S, Miyazono K, Koinuma D, Cell Discovery, 4, 1-16 (2018)

“Improved phosphoproteomic analysis for phosphosignaling and active-kinome profiling in Matrigel-embedded spheroids and patient-derived organoids.”, Abe Y, Tada A, Isoyama J, Nagayama S, Yao R, Adachi J and Tomonaga T, Scientific reports, 8(1): 11401 (2018)

“IFN/STAT signaling controls tumorigenesis and the drug response in colorectal cancer.”, Sakahara M, Okamoto T, Oyanagi J, Takano H, Natsume Y, Yamanaka H, Kusama D, Fusejima M, Tanaka N, Mori S, Kawachi H, Ueno M, Sakai Y, Noda T, Nagayama S, Yao R, Cancer Science, 110(4), 1293-1305 (2019)

〔学会発表〕(計9件)

「家族性大腸腺腫症オルガノイドを用いた発がん機構解明」, 八尾 良司, 小柳 潤, 長山 聡, 野田 哲生, 第 76 回日本癌学会学術総会, (神奈川県, 横浜市), 平成 29 年 9 月 28 日-30 日

「同一症例からの原発巣および転移巣由来のオルガノイドを利用した機能解析」, 長山 聡, 八尾 良司, 第 76 回日本癌学会学術総会, (神奈川県, 横浜市), 平成 29 年 9 月 28 日-30 日

「発がん過程におけるストレス獲得耐性」, 石川 冬木, 八尾 良司, 若林 雄一, 第 76 回日本癌学会学術総会, (神奈川県, 横浜市), 平成 29 年 9 月 28 日-30 日

「TUFT1-RABAP1 を介した小胞輸送制御による mTORC1 シグナルの新規活性化機構の解析」, 川崎 夏実, 磯谷 一暢, 旦 慎吾, 矢守 隆夫, 高野 洋志, 八尾 良司, 田口 瑠奈, 森川 真大, 野田 哲生, 江幡 正悟, 宮園 浩平, 鯉沼 代造, 第 76 回日本癌学会学術総会, (神奈川県, 横浜市), 平成 29 年 9 月 28 日-30 日

「肝臓オルガノイドを用いた肥満誘導性肝臓がん発症モデルの構築及び、がんの起源細胞の解明」, 窪田 達寛, 安藤 達也, 福井 優也, 渡辺 喜洋, 小澤 崇之, 蒲池 史卓, 八尾 良司, 佐藤 俊朗, 大谷 直子, 第 76 回日本癌学会学術総会, (神奈川県, 横浜市), 平成 29 年 9 月 28 日-30 日

「体細胞変異と遺伝的背景による大腸がん薬剤感受性制御機構」, 八尾 良司, 小柳 潤, 長山 聡, 野田 哲生, 第 77 回日本癌学会学術総会, (大阪府, 大阪市), 平成 30 年 9 月 27 日-29 日

「患者由来大腸がんオルガノイドを用いた転移モデルマウス」, 岡本 拓也, 八尾 良司, 柳沼 克幸, 長山 聡, 第 77 回日本癌学会学術総会, (大阪府, 大阪市), 平成 30 年 9 月 27 日-29 日

“IFN/STAT signaling controls tumorigenesis of colorectal cancers”, Yao R, 11th AACR-JCA Joint Conference: Biology to Precision Medicine, Feb 8-12, 2019, Hawaii, USA

“Mouse model of metastatic colorectal cancer by orthotopic transplantation of patient derived organoids”, Okamoto T, AACR Annual Meeting 2019, March 29-April 3, 2019, Atlanta, USA

〔図書〕(計0件)

〔産業財産権〕

出願状況（計 0 件）

取得状況（計 0 件）

〔その他〕

ホームページ等

https://www.jfcr.or.jp/laboratory/department/cell_biology/index.html

6．研究組織

(1) 研究分担者

該当なし

(2) 研究協力者

該当なし

科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属されます。