

平成 30 年 6 月 27 日現在

機関番号：24701

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2016～2017

課題番号：16K18430

研究課題名(和文)オルガノイドを用いた消化管腫瘍の進展におけるKrasの役割

研究課題名(英文)Role of Kras mutations in intestinal tumor progression

研究代表者

小柳 潤 (Jun, Oyanagi)

和歌山県立医科大学・医学部・特別研究員

研究者番号：80716069

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,200,000円

研究成果の概要(和文)：家族性大腸腺腫症(FAP)患者由来腺腫より樹立したオルガノイドを用いて、網羅的遺伝子発現解析を行ったところ、密生型FAPと非密生型FAPにおいて発現の異なる遺伝子群を明らかにした。また、MEK阻害剤による薬効評価を行ったところ、今回見出した遺伝子群がRASシグナル阻害への感受性を規定している可能性が示唆された。

進行非小細胞肺癌における免疫チェックポイント阻害剤の治療効果と関連するバイオマーカーの探索を行った。その結果、治療効果と関連するタンパク質を見出すとともに、免疫関連有害事象の発生と関連するタンパク質を見出した。しかし、双方に関連するタンパク質で重複は認めなかった。

研究成果の概要(英文)：We established 42 organoid derived from surgically resected polyps from five familial adenomatous polyposis(FAP) patients. Comprehensive gene expression analysis revealed that some genes are differentially expressed between attenuated FAP(AFAP)-derived organoids and classical FAP(CFAP)-derived organoids. Drug sensitivity assay demonstrated that AFAP-derived KRAS mutant organoid are sensitive to MEK inhibitors although CFAP-derived KRAS mutant organoids are resistant. These data suggest that the differentially expressed genes regulate sensitivity to RAS signal inhibitors.

We explored predictive biomarkers for immune checkpoint inhibitors. Using multiplex assay system, 57 serum proteins were analyzed. We identified proteins associated with clinical benefits from nivolumab. We also identified proteins associated with onset of immune-related adverse events (irAEs). However, no overlapped proteins were identified between clinical benefits and irAE onset.

研究分野：腫瘍生物学

キーワード：オルガノイド リキッドバイオプシー

1. 研究開始当初の背景

最近の精力的な研究により、正常腸管上皮における幹細胞の存在が明らかになりつつあり、現在では Crypt Basal Columnar(CBC)細胞と+4細胞が幹細胞と考えられている。CBC細胞は Wnt シグナルの標的遺伝子である Lgr5、Ephb2、Smoc2 等をマーカーに持ち、陰窩底部において活発に分裂する細胞である。一方、+4細胞は Bmi1、Lrig1、Hopx 等をマーカーに持ち、パネート細胞の直上、陰窩底より4番目に存在する細胞である。この細胞は静止期にありほとんど分裂を生じないが、放射線により CBC 細胞が障害されると分裂を開始し、CBC 細胞へと分化する事から、リザーブ幹細胞としてはたらくと考えられている。過去のマウスモデルを用いた優れた研究から、Apc の不活化に起因する Wnt-beta カテニンシグナルの亢進により、腸管に多数の腺腫が発生する事が明らかになっている。また、Lgr5 発現細胞又は Lrig1 発現細胞特異的な Apc 不活化により腺腫が生じる事が明らかになり、これらの幹細胞が腫瘍の起源となる tumor initiating cells である事が示唆されている。このように、幹細胞における Apc 欠損が腫瘍発生において非常に重要な役割を担う事が予想される。大腸がんの発生・進展には adenoma-carcinoma sequence、すなわち APC をはじめ、KRAS、TP53、SMAD4 など複数の遺伝子変異を伴う事が重要であると考えられている(図1)。実際 Apc と Kras に変異をもつマウスは、Apc 変異のみのマウスと比較し生存期間が短い事から、Kras 変異が腫瘍の悪性進展に深く関与すると考えられる。しかし、その詳細は十分に明らかとはなっていない。これまで変異型 KRAS を標的とした薬剤の開発が行われてきたが、困難を極めており、現在まで承認に至った例はない。また、変異型 KRAS は患者の予後不良と相関する事から、変異型 KRAS を持つがんに対する効果的な治療法の開発が急務となっている。近年開発された消化管組織のオルガノイド培養法は、より生体に近い3次元培養法を用いるため、従来行われてきた単層培養系とは大きく異なる。腸管由来オルガノイドでは生体の絨毛-陰窩構造が再現され、幹細胞ヒエラルキーが維持されている事から、生体内の細胞系譜を in vitro で再現できるという最大の特徴を持ち、発がん機構の詳細な解析、新規治療薬のスクリーニングなどが可能となった。申請者らはこれまで Apc コンディショナルノックアウトマウスとそのオルガノイドを用いて Apc 不活化による腫瘍発生初期の幹細胞の動態を解析してきた。Apc 不活化によりオルガノイドは幹細胞特異的な遺伝子発現シグネチャーを示す事、陰窩に見られる幹細胞の分布が経時的にオルガノイド全体へと広がる事を見出した(Yao R et al., Oncogene 35:6109, 2016)。これらの先行研究を基盤とし、

Apc 不活化と Kras 活性化変異を誘導できるマウス及びその腸管由来のオルガノイドを樹立した。

また、申請者の異動に伴い、2017年度より実施計画を変更して研究を行った。

免疫チェックポイント阻害剤を用いた治療は各癌種において効果を発揮している。抗がん剤併用など様々な臨床試験が行われており、良好な治療成績をおさめていることから、がん治療にさらなるパラダイムシフトを起こしつつある。非小細胞肺癌の免疫チェックポイント阻害剤として PD-1 抗体が用いられており、そのリガンドである PD-L1 の腫瘍組織における発現率がコンパニオン診断に用いられている。しかし、PD-L1 陰性例においても長期効果が得られる症例が存在することから、更なるバイオマーカーの必要性が高まっている。

2. 研究の目的

本研究ではコンディショナルノックアウトマウスとその腸管由来オルガノイド、さらにヒト家族性大腸腺腫症(FAP)患者由来組織よりオルガノイドを樹立し、それらを用いて Apc 不活化に続く Kras 活性化変異が腫瘍の悪性進展に与える影響を明らかにし、新規治療法を開発することを目的とした。

次年度の研究では、進行非小細胞肺癌患者におけるニボルマブの治療効果と関連するバイオマーカーをタンパク質レベルで探索する事を目的とした。

3. 研究の方法

本研究ではコンディショナルノックアウトマウス腸管より、Apc 不活化、Kras 活性化、Apc 不活化と Kras 活性化の双方を in vitro において誘導可能なオルガノイドを樹立し、Kras の活性化が与える影響を網羅的遺伝子解析により解析する。

また、家族性大腸腺腫症患者由来の組織を用いてオルガノイドを樹立し、それぞれのオルガノイド毎に遺伝子発現解析をおこなう。また、ターゲットリサーチエンス、SNP アレイ解析を行い、それぞれのオルガノイドにおける遺伝子変異を解析する。3次元培養系における増殖評価系を確立するとともに、遺伝子発現解析および遺伝子変異解析結果をもとに、KRAS 活性化変異オルガノイドの増殖を効果的に抑制する薬剤の探索を行う。

バイオマーカーの探索では、38名の化学療法治療歴を有する細胞肺癌患者において、病勢進行または許容できない毒性が生じるまでニボルマブ単剤治療を行った。治療開始前および治療開始4週後に採血を行い、血清を採取した。Luminex xMAP システムを用いて、これらの血清中に含まれるタンパク質をマルチプレックスで分析する。また、ニボルマブ治療による免疫関連有害事象の発生と関連するマーカーの探索も同時に行う。

4. 研究成果

Kras 活性化変異に伴う変化を調べるために、コンディショナルロックアウトマウス腸管由来のオルガノイドの樹立を試みた。Apc 不活化には Apc コンディショナルアリルを、Kras 活性化には Kras コンディショナルアリルを用い、Apc 不活化及び Apc 不活化+Kras 活性化をコンディショナルに誘導できるオルガノイドを樹立できた。これらのオルガノイドを用いて網羅的遺伝子発現解析を行ったところ、Apc 不活化のみのオルガノイドに対し Apc 不活化と Kras の活性化の両方を誘導すると、低酸素応答遺伝子群及び上皮-間葉転換 (Epithelial-Mesenchymal Transition: EMT) 関連遺伝子群の発現が顕著に上昇している事が認められた。

インフォームドコンセントを得た FAP 患者より提供された腺腫よりオルガノイドの樹立を試みた。密生型 FAP (CFAP) 患者 3 名、非密生型 FAP (AFAP) 患者 2 名より 42 個の腺腫でオルガノイドの樹立に成功した。それぞれのオルガノイドを用いてターゲットシークエンスにより遺伝子変異解析を行った。その結果、APC 遺伝子における生殖細胞系列変異が 2 症例のオルガノイドで同定された。生殖細胞系列変異が同定されなかった 3 症例のオルガノイドに対し SNP アレイ解析を行った。その結果、2 症例のオルガノイドでプロモーター領域の欠損を認めた。また、ほとんどのオルガノイドの APC 遺伝子において、異なるセカンドヒット変異が検出されたことから、それぞれのオルガノイドは発生起源が異なることが明らかになった。ドライバー遺伝子である TP53 や KRAS 遺伝子の変異頻度は孤発性大腸がんでは報告されている変異頻度よりも低く、PIK3CA や SMAD4 などの遺伝子変異は認めなかった。

AFAP と CFAP の臨床病態の違いを明らかにするため、樹立されたオルガノイドにおいてマイクロアレイによる網羅的遺伝子発現解析を行い、Gene set enrichment analysis を行った。その結果、AFAP-CFAP 間で発現が大きく異なる遺伝子群を複数見出した。AFAP 群においてそれらの遺伝子群の発現は負の相関を示し、CFAP 群では正の相関を示していた。また、pathway 解析を行ったところ、遺伝子 X の発現が CFAP において 2.1 倍高く、その標的遺伝子の発現も高いことが明らかになった。遺伝子 X はあるシグナル伝達系に参与する転写因子であり、この結果は遺伝子 A が制御するシグナルが FAP の臨床的特徴と相関する事を示している。

また、KRAS 変異をもつオルガノイドにおいては EMT 関連遺伝子群、および低酸素応答遺伝子群の発現が KRAS 野生型オルガノイドに比して高いことが明らかとなり、コンディショナルロックアウトマウス由来オルガノイドにおける結果と一致した。

KRAS 変異オルガノイドの増殖を効果的に抑制する薬剤を探索するため、3 次元培養系

における増殖評価系を確立した。この評価系を用いて、EGFR-RAS シグナルに注目し、各オルガノイドにおける薬剤感受性を評価した。

EGFR 阻害剤 gefitinib を用いたところ、KRAS 変異オルガノイドにおいて耐性を認め、これまでに報告された結果と一致した。一方、MEK 阻害剤 Trametinib を用いて評価を行ったところ、AFAP 由来の KRAS 変異オルガノイドにおいては感受性を認めたが、CFAP 由来の KRAS 変異オルガノイドでは耐性を示していた。また、別の MEK 阻害剤である Selumetinib においても同様の結果が得られた。この結果は遺伝子 A が制御するシグナルが RAS シグナル阻害の感受性を規定している可能性を示唆している。その可能性を検討するため、遺伝子 A の阻害剤を併用することで MEK 阻害剤への感受性が変化するかを検討した。その結果、CFAP 由来の KRAS 野生型オルガノイドにおいて MEK 阻害剤への感受性が高くなることを見出した。一方、KRAS 変異オルガノイドにおいてはそのような効果を認めなかった。今回用いた阻害剤の特異性が低い可能性を考え、CRISPR-Cas9 による KRAS 変異型オルガノイドにおける遺伝子 A のロックアウトを試みたが、申請者の異動に伴い解析には至らなかった。

免疫チェックポイント阻害剤ニボルマブの治療効果に関連する新規バイオマーカーの探索を行った。インフォームドコンセントを得た既治療信仰非小細胞肺癌患者 38 名より治療開始前および治療開始 4 週後の血液の提供を受け、血清を分離した。この血清を用いて、計 57 の血清中タンパク質を Luminex xMAP システムでマルチプレックスに解析した。最良効果は部分奏功 (PR)、安定 (SD)、進行 (PD) に分類した。その結果、治療開始前の PR 群において Follistatin 濃度が有意に低値であった。また、PR 群においては、治療に伴い IL-8 濃度が有意に低下した。さらに、治療開始前の Follistatin および IL-8 濃度は無増悪生存期間と有意に負の相関を示した。IL-8 の血清中濃度と免疫チェックポイント阻害剤の奏功との関連性については 2017 年に報告があり、本研究の結果は既報と同様の結果となった。

また、ニボルマブによる免疫関連有害事象 (immune-related adverse events: irAEs) との関連性を同一コホートにおいて解析した。その結果、治療開始前ではいずれのタンパク質でも irAE 発症の有無で有意な差を認めなかった。一方、irAE 発症群において治療開始 4 週後の G-CSF、Rantes 濃度が有意に高値であり、Leptin 濃度は有意に低値であった。免疫チェックポイント阻害剤にきいんする免疫関連有害事象と治療効果に相関を認める報告がなされているが、本研究において治療効果に関連するマーカーと irAE 発症に関連するマーカーの間に重複は認めなかった。

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 0 件)

〔学会発表〕(計 3 件)

1. Yao R, Oyanagi J, Nagayama S, Noda T. Suppression of intestinal tumors by targeting the mitotic spindle of intestinal stem cells. 第75回日本癌学会学術総会 J-2004, 2016年10月6-8日(横浜)
2. Yao R, Oyanagi J, Nagayama S, Noda T. FAP organoids as tools to explore the CRC tumorigenesis. 第76回日本癌学会学術総会 J-2097, 2017年9月28-30日(横浜)
3. Oyanagi J, Koh Y, Akamatsu H, Kanai K, Hayata A, Tokudome N, Akamatsu K, Nakanishi M, Ueda H, Yamamoto N. Serial evaluation of multiple serum protein levels in non-small-cell lung cancer patients treated with nivolumab. AACR-NCI-EORTC International Conference on Molecular Targets and Cancer Therapeutics, October 26-30, 2017, Philadelphia, USA

〔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：
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：
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

小柳 潤 (Oyanagi Jun)

和歌山県立医科大学 内科学第三講座

特別研究員

研究者番号：80716069

(2)研究分担者
なし

(3)研究協力者
なし