

令和 2 年 5 月 29 日現在

機関番号：32612

研究種目：基盤研究(C)（一般）

研究期間：2017～2019

課題番号：17K09395

研究課題名（和文）消化器がん幹細胞を標的とした創薬スクリーニング

研究課題名（英文）Drug discovery screening targeting gastrointestinal cancer stem cells

研究代表者

高野 愛（TAKANO, AI）

慶應義塾大学・医学部（信濃町）・研究員

研究者番号：50647584

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,500,000円

研究成果の概要（和文）：可視化したヒト消化器がん幹細胞を用いてHTSを行った。1stスクリーニングでは3セットの化合物ライブラリーを使用し、約3万化合物を検証した。2nd screeningでは、Dose-respondsの検証を行った。これらの結果からLGR5特異的殺傷能力のある、2つのHit化合物を選定しvalidationを行った。そのうちの1つである分子標的治療薬Aを検証した結果LGR5陽性細胞以外に効果があることがわかった。今回の結果では、ヒト消化器がん幹細胞特異的に効く薬は得られることができなかったが、今後はコントロール基準を設定しより精度の高い解析系、代替案を検討する必要がある。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究は、独自に開発したオルガノイド培養技術により、消化器がん組織を直接培養しその生物学的特性と遺伝子変異プロファイルを基に最も効果的な治療薬の組み合わせを個別に選択するという、極めてシンプルな研究であるが、実際の臨床に直結した研究である。多くの研究者が類似した研究開発に取り組んでいるものの、未だ誰も成功していない。つまり、本研究は独創的というよりは源流的な研究基盤開発といえる。我々の研究の成功により、国内外の研究者や製薬会社にとって、実用面での多大なインパクトがあり、必然的に本邦の臨床・産業・研究に与える影響は極めて大きい。

研究成果の概要（英文）： We conducted HTS screening using visualized human gastrointestinal cancer stem cells. In the 1st screening, 3 sets of compound libraries were used and about 30,000 compounds were verified. In the 2nd screening, validation of Dose-responds was performed. From these results, two Hit compounds that have LGR5-specific killing ability were selected. The molecular targeted therapeutic drug A, which is one of the selected compounds, was validated. As a result, it was revealed that it has an effect on cells other than LGR5-positive cells. From the results of this time, we could not obtain a drug that works specifically for human gastrointestinal cancer stem cells, but in the future it will be necessary to set control standards and study more accurate analysis systems and alternatives.

研究分野：オルガノイド研究

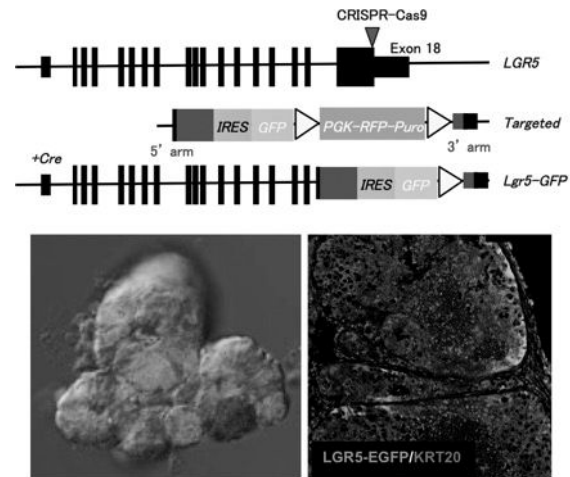
キーワード：オルガノイド 幹細胞 HTS 創薬スクリーニング がん幹細胞 消化器がん 化合物ライブラリー

1. 研究開始当初の背景

最近の進歩により高い腫瘍縮小効果(奏効率)を実現できるようになった。さらに最近、明確な治療ターゲットをもった分子標的治療薬によるがん治療開発が行われるようになり、それらの飛躍的な進歩によって予後の著しい改善につながっている。しかし、それらの治療による完全治癒は現時点では困難であり、依然、消化器がんは我が国のがん死亡率の55%以上を占めており、進行がんの根治治療法の開発は早急な課題となっている。

殊に、切除不能となった進行がんは多くの治療抵抗性細胞が出現し、完全に腫瘍細胞を排除することは極めて難しく、再発してしまうことが大きな問題である。がんの薬剤抵抗性の大部分は未解明であるが、がん幹細胞による薬剤耐性がそのメカニズムの一端を担うと考えられてきた。そこで近年、分子遺伝学的マーカーによる有効薬剤の予測を目指した Precision Medicine が注目されている。

申請者ら研究グループは世界で初めてマウス・ヒト腸管上皮幹細胞培養を確立した(Sato T et al. Nature 2009, Jung P. Sato T et al. Nature Medicine 2011)。現在、ヒト大腸・胃・肝臓・膵臓・小腸・胆管などの消化器組織を100%の効率で培養することができ、オルガノイド技術をヒト消化器がんに応用し発がんメカニズムと転移機構解明への洞察を得てきた(Matano et al. Nature Med 2015, Fujii et al. Cell Stem Cell 2016)。その結果、遺伝学的解析による Genotype 研究のみでは転移や薬剤耐性などの Phenotype の予測は困難であり、オルガノイドそのものを使った Phenotype 研究の積層が重要と考える。



申請者らは、患者大腸がんから樹立したオルガノイドにゲノム編集技術により、遺伝子ノックインを行う技術を開発した(Matano, Takano et al. Nature Medicine 2015)。本技術を用い、がん幹細胞マーカーである LGR5 遺伝子座に GFP などの蛍光タンパクマーカーのノックインを行うことに成功し、細胞系譜解析による幹細胞機能の証明に成功した(Shimokawa, Takano et al. Nature 2017)。また我々は、がんオルガノイド異種移植系を確立し(Fujii, Takano et al. Cell Stem Cell 2016)、既存化学療法薬の投与により LGR5 の発現上昇を確認した。

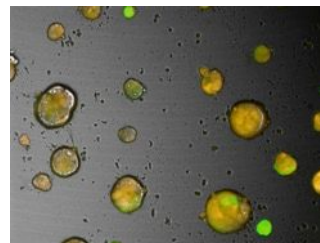
さらに我々は、上皮オルガノイドの 384 well plate での培養法を確立し、High Contents Analyzer (In Cell analyzer 6000)を用いた High Throughput 化合物スクリーニングを確立した(未発表)。作製した大腸がんオルガノイドに対して、既存の大腸がん治療薬及び 360 種類の Protein Kinase Inhibitor (PKI) library を用い、High Throughput Screening (HTS) を行った。その結果、抗腫瘍示す薬剤がいくつか得られた(未発表)。また、in vivo 検討においてヒト大腸オルガノイド株を移植したヌードマウスに対し、in vitro で効果を示した薬剤を全身投与し、実験終了時の薬剤投与群の対照群に対する抗腫瘍効果を評価した(未発表)。こうした経緯から、LGR5 蛍光マーカーを指標とした創薬スクリーニングにより、これまで困難であったがん幹細胞を標的とする全く新しい治療戦略を展開できると期待できる。

2. 研究の目的

申請者らの研究室において既に開発および培養が確立された患者由来の消化器がん(大腸がん)の3次元組織構造体(オルガノイド)を応用し、蛍光蛋白レポーターの導入によりがん幹細胞を可視化し、それらを用いた High Throughput Screening(HTS)に基づく新たな創薬スクリーニングの確立を目的とする。

3. 研究の方法

- (1) ヒト消化器がん患者から採取した生検組織から、がんオルガノイドを培養・増幅し、遺伝子操作技術を用いて可視化したがん幹細胞の樹立(右図: LGR5-tdTomato の可視化).



樹立したオルガノイドに対し、ゲノム編集技術を用いた遺伝子ノックアウト・ノックイン技術の導入を行う。がん幹細胞の可視化および細胞系譜解析のため、がん幹細胞のマーカ遺伝子である LGR5 遺伝子領域に蛍光蛋白ノックインを行う。作製したがん幹細胞可視化消化器癌を用いてがん幹細胞を標的とした治療薬の効果を検討する。

- (2) 可視化したヒト消化器がん幹細胞の High Throughput Screening (HTS)の開発(右図参照).

幹細胞を可視化したオルガノイドの大量培養

Sorter を使用した single cell ソーティング

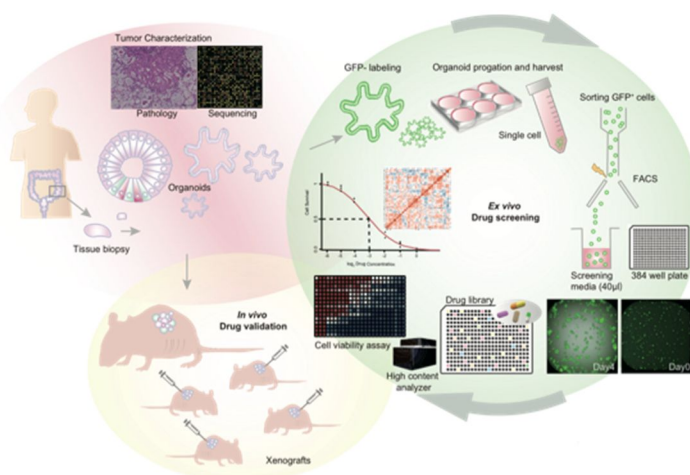
384 well plate を使用した 10 万~30 万化合物ライブラリーを用いたスクリーニング

High contents analyser を用いた画像撮影及び解析

IC50 など細胞増殖抑制効果の解析

Hit 化合物の選定

A schematic of the organoid drug screen workflow



- (3) Hit 化合物の in vitro Validation と in vivo 治療効果検証.

384 plate を用いた濃度依存的細胞増殖抑制効果の検証

ヌードマウスを用い,organoid の Xenograft を行い in vivo での薬剤効果の検証

4. 研究成果

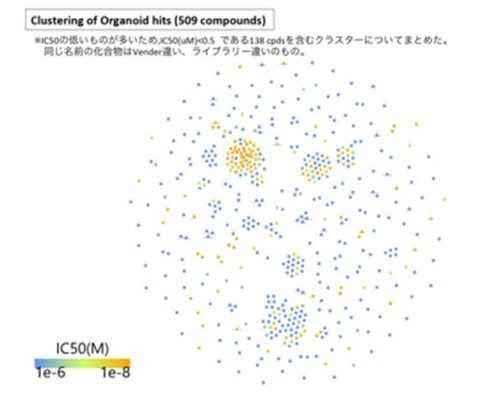
可視化したヒト消化器がん幹細胞を用いて High Throughput Screening (HTS)を行った。1st スクリーニングで使用した化合物は ライブラリー(A)9600 compounds(検証濃度 10 μM), ライブラリー(B)19,449 compounds(検証濃度 5 μg/ml), ライブラリー(C)3880 compounds(検証濃度 10 μM)を各 2 回検証, 2nd screening では、Dose- responds(10 μM(5 μg/ml)から 4 倍希釈、5

各ライブラリーのHit化合物数						
Library	ライブラリー(A) 9600 compounds		ライブラリー(B) 19,449 compounds		ライブラリー(C)3880 compounds	
	10μM	9,600 cpds	5μg/ml	19,449 cpds	10μM	3,880 cpds
1 st HTS	> 60% (Hit rate)	184 (1.9%)	> 70%	422* (2.2%)	> 75%	159 (4.1%)
Retest	> 50% (Reproducibility)	149 (81.1%)	> 60%	319 (75.6%)	> 65%	129 (81.1%)
IC50値が算出 可能な化合物		141		289		109
Frequent Hit or 重複した化合物		117		285		107

IC50値の分布			
	Total Core	NPDePo	Known
IC50 < 1μM	22	133	41
1μM IC50 < 5μM	65	115	53
5μM IC50 < 10μM	29	27	12
10μM IC50	1	10	1
Total	117	285	107 (cpds)

点)を同じく2回検証した。それぞれの IC50(μM)を算出し、IC50 が計算できないものに関しては除去した(右図参照)。

ヒットした化合物について、構造の類似性でクラスタリングを行い、注目化合物を選定した。



これらの結果から LGR5 特異的殺傷能力のある Hit 化合物として、zinc pyrithione という化合物が得られたため、validation を行ったが、キレート作用で細胞がバラバラになり自家蛍光が出ているだけであることがわかった。もう一つの Hit 化合物として分子標的治療薬 A を検証したが、その結果 LGR5 陽性細胞以外に効果があることがわかった。今回の結果では、ヒト消化器がん幹細胞特異的に効く薬は得られることができなかった。

本研究において予定していた結果を得ることができなかったが、その原因に、幹細胞特異的に効果のある薬の選定基準があげられる。今後はコントロール基準を設定し、より精度の高い解析系、代替案を検討する必要がある

本研究は、独自に開発したオルガノイド培養技術により、消化器がん組織を直接培養し、その生物学的特性と遺伝子変異プロファイルを基に最も効果的な治療薬の組み合わせを個別に選択するという、極めてシンプルな研究であるが、実際の臨床に直結した研究である。多くの研究者が類似した研究開発に取り組んでいるものの、未だ誰も成功していない。つまり、本研究は独創的というよりは源流的な研究基盤開発といえる。我々の研究の成功により、国内外の研究者や製薬会社にとって、実用面での多大なインパクトがあり、必然的に本邦の臨床・産業・研究に与える影響は極めて大きいと考えられる。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計3件（うち査読付論文 1件/うち国際共著 1件/うちオープンアクセス 0件）

1. 著者名 Fujii Masayuki, Matano Mami, Toshimitsu Kohta, Takano Ai, Mikami Yohei, Nishikori Shingo, Sugimoto Shinya, Sato Toshiro	4. 巻 23
2. 論文標題 Human Intestinal Organoids Maintain Self-Renewal Capacity and Cellular Diversity in Niche-Inspired Culture Condition	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Cell Stem Cell	6. 最初と最後の頁 787 ~ 793.e6
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) https://doi.org/10.1016/j.stem.2018.11.016	査読の有無 無
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Nanki Kosaku, Toshimitsu Kohta, Takano Ai, Fujii Masayuki, Takahashi Sirirat, Sukawa Yasutaka, Ishida Hiroki, Sugimoto Shinya, Kawakubo Hirofumi, Kim Jihoon, Kitagawa Yuko, Sekine Shigeki, Koo Bon-Kyoung, Kanai Takanori, Sato Toshiro	4. 巻 174
2. 論文標題 Divergent Routes toward Wnt and R-spondin Niche Independency during Human Gastric Carcinogenesis	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Cell	6. 最初と最後の頁 856 ~ 869.e17
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) https://doi.org/10.1016/j.cell.2018.07.027	査読の有無 無
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Shimokawa M, Ohta Y, Nishikori S, Matano M, Takano A, Fujii M, Date S,2, Sugimoto S, Kanai T, Sato T.	4. 巻 11
2. 論文標題 Visualization and targeting of LGR5+ human colon cancer stem cells.	5. 発行年 2017年
3. 雑誌名 Nature	6. 最初と最後の頁 187-192
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1038/nature22081	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 該当する

〔学会発表〕 計0件

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
研究分担者	股野 麻未 (Marano Mami) (20439889)	慶應義塾大学・医学部(信濃町)・研究員 (32612)	
研究分担者	佐藤 俊朗 (Sato Toshiro) (70365245)	慶應義塾大学・医学部(信濃町)・教授 (32612)	