

令和 2 年 6 月 12 日現在

機関番号：82606

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2017～2019

課題番号：17K15003

研究課題名(和文)オルガノイドを用いたがん関連遺伝子が引き起こすがんエピゲノム変化の解明

研究課題名(英文) Tumor development caused by epigenetic changes in cancer-related genes using organoids as a model

研究代表者

成瀬 美衣 (Naruse, Mie)

国立研究開発法人国立がん研究センター・研究所・研究員

研究者番号：80549923

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,300,000円

研究成果の概要(和文)：本研究ではオルガノイドが組織のメチル化を維持していることを、片親性発現遺伝子のような厳密にメチル化制御を受ける遺伝子の DMR を例に明らかにした。がん研究では抗がん剤抵抗性へのエピゲノムの関与等が注目されており、オルガノイドが、がんエピゲノム研究のモデルとしても有用であることを示した。さらに全ゲノムで親由来のゲノムまで区別した全ゲノムバイサルファイトシーケンスを可能とした。オルガノイドは *in vitro* で発がん過程を再現可能であり、これに前述の全ゲノムバイサルファイトシーケンス技術を利用することで、多段階発がん過程における遺伝子変異によるエピゲノム変化を詳細に明らかにすることができる。

研究成果の学術的意義や社会的意義

オルガノイドの片親性発現遺伝子の DMR を詳細に解析した報告はこれまでになく、オルガノイドが組織のエピゲノムの状態を厳密に維持したモデルであることを初めて示した。がん研究においてがん患者の全ゲノムシーケンスは多岐にわたり行われているが、結果には症例毎の違い、がん細胞の不均一性も含まれ、がん研究におけるモデルとしては扱いが困難な点がある。本研究では発がん過程のエピゲノム解析を、生体内に近く且つ簡便化したモデルとして行い、ヒトのがん研究に生かすため、父母由来のアレルを区別可能なマウス正常上皮から樹立し、エピゲノムの変化を感度良く検出可能な点が有用である。

研究成果の概要(英文)：In this study, we demonstrated that DNA methylation status for imprinted DMRs were maintained in organoids established from mice colon. In cancer research, it has been noted that epigenetic changes occurred in cancer cells play important roles in acquisition of anticancer drug resistance. Therefore, we demonstrated that organoids are also useful as models for cancer epigenome research. In addition, whole-genome bisulfite sequencing analyses enabled us to identify epigenetic changes during the carcinogenic process *in vitro*.

研究分野：分子生物学

キーワード：オルガノイド エピゲノム

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

日本国民の2人に1人はがんに罹患する時代になり、がん克服に向けて、がんの予防、治療法開発が精力的に行われている。これらの研究開発には、主に体外での培養が容易ながん細胞株が用いられてきた。しかし、がん細胞株の多くは分化マーカーの発現や薬剤代謝能など元の細胞の性質を維持していないことがあり、がん細胞株と患者の元の腫瘍との性質の違いから、がん細胞株を用いる前臨床研究データに基づく創薬は臨床応用に至らないケースが多い点が問題となっていた。

そのような問題が議論される中、近年、対象とする細胞をマトリゲルに包埋し、組織特異的な幹細胞ニッチに関わる増殖因子を整えた培地を添加することで生体内微小環境を再現することで、オルガノイドが樹立されるようになった。オルガノイドは生体内での分化マーカーなどの遺伝子発現や組織特異的な機能が保たれていることが示され、今後のオルガノイドを用いた創薬開発に期待が集まっている。

抗がん剤治療においては、元々の個人による感受性の違いのみでなく、反復投与の過程で感受性の低下や耐性が獲得されることがあり、用いる抗がん剤の選択や反復投与による患者への負担に対する効果が問題となっている。これらの感受性差や薬剤耐性差は、エピゲノムの個人差、抗がん剤の反復投与によるエピゲノム変化などが原因の一つと考えられている。

2. 研究の目的

発がん過程における個々のゲノム変化に伴うエピゲノムの変化を経時的に明らかにし、多段階発がん過程でどのようにエピゲノムが変化していくのかを明らかにする。これにより、遺伝子変異に伴うエピゲノム変化の発がんに及ぼす影響の重要性を明らかにする。その目的を果たすため、生体内の環境により近く、且つ簡便に発がん過程を再現可能で、経時的にサンプリング可能であるオルガノイドを用いることが最適と思われる。しかし、実際にどの程度オルガノイドが元の臓器のエピゲノム情報を維持しているかは明らかになっていない。そこで、インプリンティング遺伝子等既知のエピゲノムにより精密に遺伝子発現がコントロールされている遺伝子群を例に、臓器とオルガノイドのエピゲノム情報の比較を行い、オルガノイドのモデルとしての有用性についても詳細に明らかにすることを目的とする。

3. 研究の方法

F1 (C57BL/6 x JF1)マウスの作成

本研究では C57BL/6 マウスと亜種にあたる JF1 を交配し、F1 (C57BL/6 x JF1)マウスを作製する。これにより、C57BL/6、JF1 間の多型を利用し、父母間のエピゲノムの差まで詳細に分けてエピゲノムの変化を追跡することが可能である。JF1 は国立遺伝学研究所より分与していただき導入を行った。

F1 (C57BL/6 x JF1)マウスを用いた正常上皮オルガノイドを樹立

5 週齢の C57BL/6 x JF1 マウスより臓器 (大腸、肺) を摘出し、酵素的及び物理的な方法で細胞を分散し、マトリゲル に包埋し、最適化したサイトカイン類含有の培地を添加して三次元培養を行い、それぞれの臓器由来のオルガノイドを樹立及び凍結保存を行った。

F1 (C57BL/6 x JF1)マウスの臓器と、それを由来とするオルガノイドのインプリンティング遺伝子のメチル化の比較

F1 (C57BL/6 x JF1)マウスの臓器と、それを由来とするオルガノイドのゲノム遺伝子のメチル化

の比較を *Peg10*, *Igf2* を始めとしたインプリンティング遺伝子の DMR(Differentially Methylated Region)についてパイサルファイト処理済みの DNA を特異的なプライマーで PCR を行い、サンガーシーケンス法によりメチル化の確認を行った。

また、さらに上記のような情報をゲノム全体について得るため、全ゲノムパイサルファイトシーケンスを用いて網羅的に比較解析を行った。全ゲノムパイサルファイトシーケンス 及びその解析については 2019 年度先進ゲノム支援の支援課題に採択をしていただき、技術支援を東京大学鈴木穰先生、情報解析支援を浅井潔先生にご担当いただいている。

オルガノイドを用いたゲノム編集を利用した多段階発がん過程の再現

野生型オルガノイドに対して、ゲノム編集により *Apc* 遺伝子欠損、*p53* 遺伝子欠損、*Kras* に活性型変異(G12D)を順に導入する。CRISPR/Cas9 システムでは、ターゲット遺伝子配列と同じ 20bp を含む guideRNA および guideRNA の結合しているゲノム領域を認識し、DNA 二重鎖切断を引き起こす Cas9 タンパクによって構成される。CRISPR/Cas9 システムによって DNA 二重鎖切断を引き起こし、その際に各々 60bp の DNA 二重鎖切断部位の両側とホモロジーを持ち、中央部には導入したいノックイン配列を持つオリゴも同時に添加することで、自由にゲノム編集が可能となる。本研究課題においては、MIT の Feng Xiang 教授の作製した guideRNA および Cas9 タンパクを同時に発現する pX330 ベクターおよびノックイン用のオリゴ DNA をオルガノイドに Lipofectamine を用いて導入しゲノム編集を行なう。ゲノム編集後は、ターゲット部位を詳細に Sanger シーケンスを行い、正確にゲノム編集が行なわれたオルガノイドを用いて実験を進める。

オルガノイドを用いた多段階発がん過程におけるエピゲノム変化の同定

オルガノイドが臓器のメチル化情報を維持していることがわかった領域について、オルガノイドを用いた多段階発がん過程において経時的にサンプリングを行った試料についてメチル化解析を行う。メチル化解析の方法については前述と同様の方法で行う。

4. 研究成果

本研究において、マウス亜種間の多型を利用して父母アレルを区別することが可能な F1 (C57BL/6 x JF1)マウスを作成し、5 週齢雌 5 個体から、肺、大腸、についてオルガノイドを樹立した(図 1)。元の臓器、オルガノイドから DNA 抽出を行い、パイサルファイト処理後に各インプリンティング遺伝子(*Peg10*, *H19*, *Kcnq1ot1* 等)の DMR についてサンガーシーケンス 法により元の臓器と同様に父方、母方アレルでメチル化の頻度の異なる DMR が厳密に維持されていることを明らかにした。オルガノイドの片親性発現遺伝子の DMR を詳細に解析した報告はこれまでになく、オルガノイドが組織のエピゲノム の状態を厳密に維持したモデルであることを初めて示した。

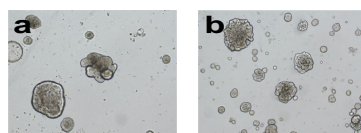


図1. オルガノイドの樹立

JF1 x B6 マウス大腸より樹立したオルガノイド (a),
JF1 x B6 マウス肺より樹立したオルガノイド (b)

がん研究では、エピゲノム の不安定性や、抗がん剤抵抗性へのエピゲノム の関与が注目されており、*in vivo* のエピゲノム情報を、がん研究での利用が高まっているオルガノイドで維持できていることを証明することは大変重要である。現状の解析ではオルガノイドが組織のエピゲノムの全体を維持したモデルであるかは証明できていない。また、発がん過程のエピゲノムの変化についても検出する場合も一部のゲノム箇所を解析するのみでは検出し逃す可能性がある。

そこで、全ゲノムバイサルファイトシーケンス において父母アレルを分けた状態で DMR を検出できるかの検討を行い、一部の確認した DMR についてはサンガーシーケンス と同様の結果を得られることを示した (図 2)。さらに既知でない DMR も含め、全ゲノムでの検証を行うため、2019 年度より先進ゲノム支援の支援課題に採択をしていただき、技術支援を東京大学鈴木 穰先生、情報解析支援を浅井潔先生にご担当いただき、本解析を進めており、当初予定していた既知の DMR の検証のみでなく、全ゲノムに渡ってのオルガノイドのメチル化情報を得ることで、オルガノイドのがん研究のツールとしての利用はさらに強力なものとなる。また、ゲノム編集により遺伝子変異を導入し、大腸がんの多段階発がん過程を再現したオルガノイドの経時的なエピゲノム変化の追跡においても、複数の DMR を調べるだけでなく、全ゲノムの DNA メチル化情報が得られれば、大腸がんの多段階発がんにおけるエピゲノム の変化を詳細に明らかにすることができる。

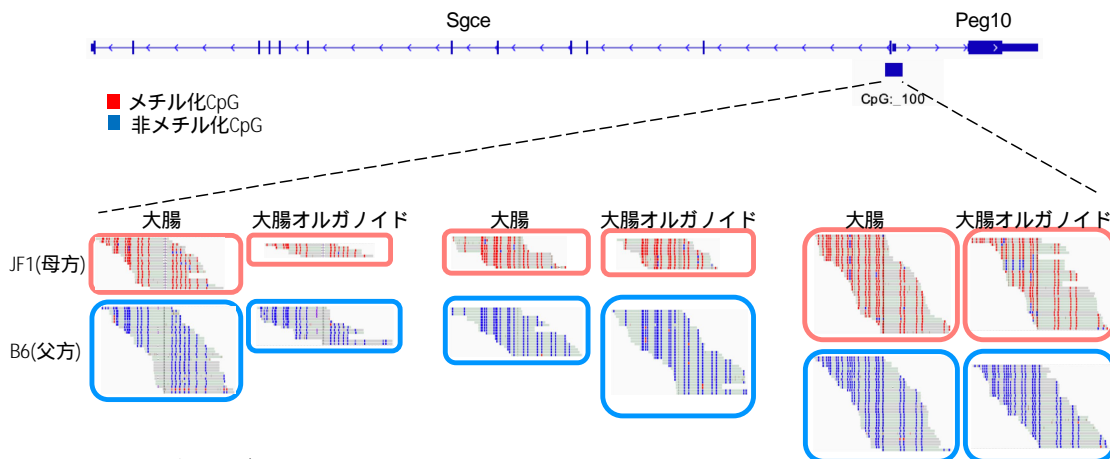


図2. 全ゲノムバイサルファイトシーケンス によるDMR解析
父性発現インプリンティング遺伝子 *Peg10* のDMRは臓器(大腸)と同様にオルガノイドでも DMRが維持されている

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計1件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 1件）

1. 発表者名 Mie Naruse
2. 発表標題 Safety evaluation of anticancer drugs using PDX (patient-derived xenograft) and solid cancer-derived organic culture systems
3. 学会等名 UTOX 15th International Congress of Toxicology (国際学会)
4. 発表年 2019年

〔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
--	---------------------------	-----------------------	----