

令和 2 年 6 月 7 日現在

機関番号：12601

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2017～2019

課題番号：17K15611

研究課題名（和文）EBV胃癌の発癌研究から治療戦略まで-iPS、オルガノイド、ゲノム編集を駆使して

研究課題名（英文）Establishment of EBV-associated gastric cancer models

研究代表者

国田 朱子 (Kunita, Akiko)

東京大学・大学院医学系研究科（医学部）・助教

研究者番号：50608768

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）：本研究では胃オルガノイドの安定した樹立法の確立と応用に取り組んだ。胃癌手術検体104症例より正常胃およびEBウイルス関連胃癌を含む胃癌オルガノイドの樹立を行なった。ヌードマウスの皮下にオルガノイドを移植しxenograftを樹立し組織像が手術検体の組織と類似した形態を保持している事が確認できin vivo胃癌モデルとして適切であることが証明された。今後薬剤スクリーニングのためにオルガノイドを用いる際には細胞レベルのみならずin vivoの検証にも用いることが可能となり胃癌の薬効評価に用いていきたい。

研究成果の学術的意義や社会的意義

胃癌は日本人に多い癌であり胃癌制圧の為の基礎研究が急務である。これまでに多くの胃癌ゲノムデータが蓄積されているものの胃上皮培養法の欠如により胃癌を端的に解析することが困難であり胃癌分子機構は未解明であった。本研究では新たな胃培養モデルであるオルガノイドモデルの樹立に成功しEBV胃癌モデル構築を試みた。本モデルはEBV胃癌以外の胃疾患研究についても応用が可能であり今後広い分野に渡り胃研究の基盤モデルとなると考えられる。

研究成果の概要（英文）：We have established a novel method for establishing gastric organoid. Gastric organoids were established from 104 gastric cancer cases. By combining a normal organoid and gene editing or Helicobacter pylori or Epstein-Barr virus infection, the model can be used for studying early neoplastic stages. Furthermore, as the organoid model recapitulates the primary tissue status, the GC organoid model can be used to screen drugs to guide patient treatment and to accelerate anti-cancer drug development.

研究分野：実験病理学

キーワード：胃癌 オルガノイド EBウイルス関連胃癌

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

(1) Epstein-Barr (EB) ウイルスはパーキットリンパ腫培養細胞中から発見され、最初のヒト腫瘍ウイルスとして注目された。EB ウイルス関連胃癌(EBV 胃癌)は胃癌全体の約 10%を占める。2014年に発表された The Cancer Genome Atlas (TCGA) プロジェクトによる胃癌ゲノムの網羅的解析では EBV 胃癌が胃癌の4つのサブタイプのうちの1つに分類されることが報告され EBV 胃癌が分子レベルで他の胃癌グループとは異なる独特のカテゴリーを構成していることが明らかとなった(Nature 2014;513:202-209)。

(2) EBV 胃癌における EB ウイルスの役割を理解するためには正常胃上皮細胞へ EB ウイルスを感染させる必要がある。しかしこれまでにヒト成人由来の正常胃上皮細胞株は樹立されていない。そこで本研究課題では近年確立された胃オルガノイド(Gastroenterology 2015; 148:126-136)を樹立する。オルガノイド培養法は胃から分離した腺管をディッシュ内で長期間三次元培養する手法であり元の胃上皮の構造や遺伝子発現を保ったまま維持可能な点が画期的である。

2. 研究の目的

(1) ヒト腫瘍ウイルス研究は、ヒト細胞での適当なモデルがなく、動物モデルも欠くため発癌、進展機構解明が阻まれてきた。このため本研究では iPS 細胞技術、オルガノイド培養、ゲノム編集といった先端研究手法を応用することによりブレイクスルーとなるモデルを作成し EBV 胃癌の新たな発癌・進展機構を解明することを目的とした。これらの手法は EBV 胃癌のみならず他の疾患研究にも応用が可能である。

(2) 本研究で開発した細胞株、オルガノイド、PDX (Patient-derived xenograft) モデルを利用して EBV 胃癌の予防と治療を目指した臨床応用へ向けた基盤作りを行うことを目的とした。

3. 研究の方法

(1) EBV 胃癌モデル実験系の構築 (オルガノイド、PDX システム)

EBV 胃癌の研究材料として EBV 胃癌手術検体および ESD 検体からオルガノイド樹立を試みた。樹立した EBV 胃癌オルガノイドを SCID マウス皮下へ移植した。

(2) 胃オルガノイド培養法 (樹立・保存) の確立

胃オルガノイド培養法として手術検体から迅速に樹立したもの他、一晚4度で保存した検体から樹立を行なった。またオルガノイド樹立時に頻繁に生じたカビの混入をできるだけ防ぐためのプロトコルを作成した。また樹立したオルガノイドの形態や病理学的検討のためパラフィンブロック作製のプロトコルを確立した。市販の細胞保存液を比較検討し凍結保存後の生着率が高い保存液を決定した。凍結検体から培養を開始する際のプロトコルを決定した。手術検体とオルガノイドのゲノム DNA を用い、固形がんによく変異のみられる 15 遺伝子について次世代シーケンスで比較解析した。

(3) 胃オルガノイドへの EBV 感染、遺伝子導入

(2) で確立した手法を用いて胃オルガノイドへ EB ウイルス感染を行なった。方法としては組み換え EB ウイルス液 を培地中に添加する実験およびマイクロインジェクション法を用いた。またエレクトロポレーション法及びレンチウイルスを用いオルガノイドへの遺伝子導入を行なった。

4. 研究成果

(1) EBV 胃癌オルガノイドと PDX モデルの樹立

EBV 胃癌 4 症例(手術検体 3 症例、ESD 検体 1 症例)から胃癌オルガノイドの樹立を行なった。樹立後 1 日後に生着が確認できたが 1 例はカビの混入により培養を停止し、2 例は樹立 1 週間後に増殖が認められなかった。1 例は 10 日間培養時の凍結ストックとパラフィンブロックを作製した。また 46 日間培養を続けた後 SCID マウスの皮下へ移植した。移植後 4 週で腫瘍の生着は確認できていないが引き続き観察を続ける。

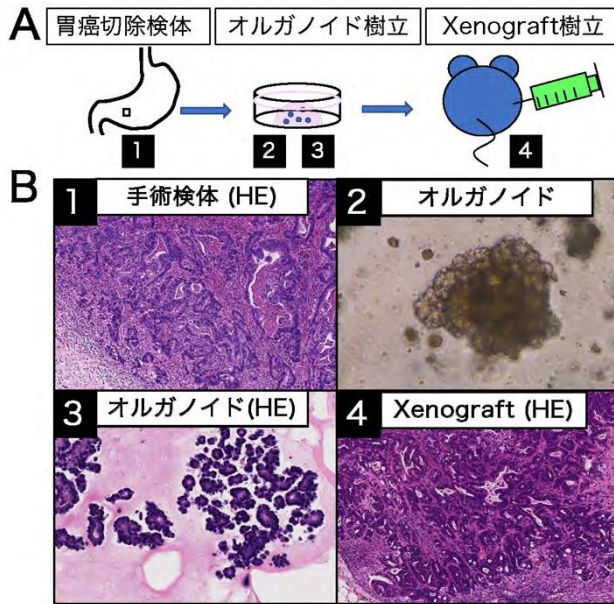
(2) 胃オルガノイド培養法 (樹立・保存) の確立

胃オルガノイドの樹立に関しては培地の改良を重ね、オルガノイド樹立の成功率がほぼ 100%となる方法を確立した。樹立の際に問題となったカビの混入についてはプリモシンを用いることで混入を抑制させることができた。胃オルガノイドは継代のタイミングを最適化し7ヶ月の長期培養に成功した。一方で胃癌オルガノイドの樹立に関しては樹立の成功率が 76.3%と改良の余地があり今後も引き続き最適化に取り組む。また、樹立の際に可能な限り検体採取後迅速に細胞回収を行なうことで成功率を上げることができ、検体採取 1 日後においても樹立が可能で保存法を見出した。

またオルガノイドの保存法も確立し、凍結保存後のオルガノイドについてもほぼ 100%に近い生存率を達成することができた。

(3)胃オルガノイド樹立

研究期間全体で胃癌 104 症例より胃オルガノイドの樹立を行なった。樹立した胃癌オルガノイドの中で増殖率の高い検体についてはヌードマウスの皮下にオルガノイドを移植し PDX の樹立を行なった(図参照)。樹立した PDX の組織像が手術検体の組織と類似した形態を保持している事が確認でき in vivo 胃癌モデルとして適切であることが証明された。今後薬剤スクリーニングのためにオルガノイドを用いる際には細胞レベルのみならず in vivo の検証にも用いることが可能となり胃癌の薬効評価に用いていきたい。



(図) オルガノイドを用いた胃癌モデルの構築

A 胃癌切除検体からのオルガノイドおよび xenograft 樹立の流れ。胃組織を分散後マトリゲルに包埋し WNT3A 等様々な因子を含む培養液で培養しオルガノイドを樹立した。胃癌オルガノイドを免疫不全マウスの皮下移植し xenograft を樹立した。

B オルガノイドの形態。ディッシュで培養中のオルガノイドは集塊を形成する(2)。オルガノイド培養(3)および xenograft(4)では手術検体(1)の組織像と同様の小型腺管や癒合腺構造が形成されていることが観察された。

(4)胃オルガノイドへの EB ウイルス感染、遺伝子導入

Akata システム(J Virol 1998; 72: 4371-4378)を用いてヒト胃上皮オルガノイドへ組み換え EB ウイルスを cell-to- cell で感染実験を行なった。また組み換え EBV のウイルス液を cell free の系でオルガノイドへ感染実験を行なった。さらにマイクロインジェクション法を用いて顕微鏡観察下でオルガノイドへの EBV 感染実験を行なった。いずれの検討においても EB ウイルス遺伝子の発言が確認できず、感染成立には至らなかった。今後引き続き条件検討を重ね感染成立を目指したい。他方遺伝子導入についてはエレクトロポレーション法及びレンチウイルスによる導入で 50%程度の導入が確認でき、今後引き続き遺伝子導入やゲノム編集を行い EBV 関連胃癌の発癌・進展に関与する遺伝子の同定を行う予定である。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計15件（うち査読付論文 15件 / うち国際共著 2件 / うちオープンアクセス 7件）

1. 著者名 Ushiku Tetsuo, Kunita Akiko, Kuroda Ryohei, Shinozaki-Ushiku Aya, Yamazawa Sho, Tsuji Yosuke, Fujishiro Mitsuhiro, Fukayama Masashi	4. 巻 33
2. 論文標題 Oxyntic gland neoplasm of the stomach: expanding the spectrum and proposal of terminology	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Modern Pathology	6. 最初と最後の頁 206 ~ 216
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1038/s41379-019-0338-1	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 -
1. 著者名 Fukayama Masashi, Abe Hiroyuki, Kunita Akiko, Shinozaki-Ushiku Aya, Matsusaka Keisuke, Ushiku Tetsuo, Kaneda Atsushi	4. 巻 476
2. 論文標題 Thirty years of Epstein-Barr virus-associated gastric carcinoma	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Virchows Archiv	6. 最初と最後の頁 353 ~ 365
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1007/s00428-019-02724-4	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 -
1. 著者名 Yasui Mariko, Kunita Akiko, Numakura Satoe, Uozaki Hiroshi, Ushiku Tetsuo, Fukayama Masashi	4. 巻 -
2. 論文標題 Cancer stem cells in Epstein Barr virus associated gastric carcinoma	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Cancer Science	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1111/cas.14435	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -
1. 著者名 Okamoto H*, Yoshimatsu Y*, Tomizawa T*, Kunita A*, Takayama R*, Morikawa T, Komura D, Takahashi K, Oshima T, Sato M, Komai M, Podyma-Inoue KA, Uchida H, Hamada H, Fujiu K, Ishikawa S, Fukayama M, Fukuhara T, Watabe T. (* equal contributor)	4. 巻 9
2. 論文標題 Interleukin-13 receptor 2 is a novel marker and potential therapeutic target for human melanoma.	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Sci Rep.	6. 最初と最後の頁 印刷中
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1038/s41598-019-39018-3	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -

1. 著者名 Nakayama A, Abe H, Kunita A, Saito R, Kanda T, Yamashita H, Seto Y, Ishikawa S, Fukayama M.	4. 巻 14
2. 論文標題 Viral loads correlate with upregulation of PD-L1 and worse patient prognosis in Epstein-Barr Virus-associated gastric carcinoma.	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 PLoS One	6. 最初と最後の頁 印刷中
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1371/journal.pone.0211358	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -

1. 著者名 Tanaka A, Ishikawa S, Ushiku T, Yamazawa S, Katoh H, Hayashi A, Kunita A, Fukayama M	4. 巻 9
2. 論文標題 Frequent CLDN18-ARHGAP fusion in highly metastatic diffuse-type gastric cancer with relatively early onset.	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Oncotarget	6. 最初と最後の頁 29336-29350
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.18632/oncotarget.25464	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -

1. 著者名 Fukayama M, Kunita A, Kaneda A	4. 巻 1045
2. 論文標題 Gastritis-Infection-Cancer Sequence of Epstein-Barr Virus-Associated Gastric Cancer.	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Adv Exp Med Biol.	6. 最初と最後の頁 437-457
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1007/978-981-10-7230-7_20	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -

1. 著者名 Kunita A, Morita S, Iriya TU, Goto A, Niki T, Takai D, Nakajima J, Fukayama M	4. 巻 8
2. 論文標題 MicroRNA-21 in cancer-associated fibroblasts supports lung adenocarcinoma progression.	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Sci Rep.	6. 最初と最後の頁 1276-1288
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1038/s41598-018-27128-3	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -

1. 著者名 Kunita A, Baeriswyl V, Meda C, Cabuy E, Takeshita K, Giraudo E, Wicki A, Fukayama M, Christofori G.	4. 巻 188
2. 論文標題 Inflammatory Cytokines Induce Podoplanin Expression at the Tumor Invasive Front.	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Am J Pathol.	6. 最初と最後の頁 1276-1288
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.ajpath.2018.01.016	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 該当する

1. 著者名 Kunita Akiko, Baeriswyl Vanessa, Meda Claudia, Cabuy Erik, Takeshita Kimiko, Giraudo Enrico, Wicki Andreas, Fukayama Masashi, Christofori Gerhard	4. 巻 188
2. 論文標題 Inflammatory Cytokines Induce Podoplanin Expression at the Tumor Invasive Front	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 The American Journal of Pathology	6. 最初と最後の頁 1276 ~ 1288
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.ajpath.2018.01.016	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

1. 著者名 Omori Keisuke, Morikawa Teppei, Kunita Akiko, Nakamura Tatsuro, Aritake Kosuke, Urade Yoshihiro, Fukayama Masashi, Murata Takahisa	4. 巻 244
2. 論文標題 Lipocalin-type prostaglandin D synthase-derived PGD2 attenuates malignant properties of tumor endothelial cells	5. 発行年 2017年
3. 雑誌名 The Journal of Pathology	6. 最初と最後の頁 84 ~ 96
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1002/path.4993	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 -

1. 著者名 Kaneko Mika K., Kunita Akiko, Yamada Shinji, Nakamura Takuro, Yanaka Miyuki, Saidoh Noriko, Chang Yao-Wen, Handa Saori, Ogasawara Satoshi, Ohishi Tomokazu, Abe Shinji, Itai Shunsuke, Harada Hiroyuki, Kawada Manabu, Nishioka Yasuhiko, Fukayama Masashi, Kato Yukinari	4. 巻 36
2. 論文標題 Antipodocalyxin Antibody chPcMab-47 Exerts Antitumor Activity in Mouse Xenograft Models of Colorectal Adenocarcinomas	5. 発行年 2017年
3. 雑誌名 Monoclonal Antibodies in Immunodiagnosis and Immunotherapy	6. 最初と最後の頁 157 ~ 162
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1089/mab.2017.0020	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 -

1. 著者名 Kawazu Masahito, Kojima Shinya, Ueno Toshihide, Totoki Yasushi, Nakamura Hiromi, Kunita Akiko et.al.	4. 巻 13
2. 論文標題 Integrative analysis of genomic alterations in triple-negative breast cancer in association with homologous recombination deficiency	5. 発行年 2017年
3. 雑誌名 PLOS Genetics	6. 最初と最後の頁 e1006853
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1371/journal.pgen.1006853	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 -

1. 著者名 Kaneko Mika K., Nakamura Takuro, Kunita Akiko, Fukayama Masashi, Abe Shinji, Nishioka Yasuhiko, Yamada Shinji, Yanaka Miyuki, Saidoh Noriko, Yoshida Kanae, Fujii Yuki, Ogasawara Satoshi, Kato Yukinari	4. 巻 36
2. 論文標題 ChLpMab-23: Cancer-Specific Human-Mouse Chimeric Anti-Podoplanin Antibody Exhibits Antitumor Activity via Antibody-Dependent Cellular Cytotoxicity	5. 発行年 2017年
3. 雑誌名 Monoclonal Antibodies in Immunodiagnosis and Immunotherapy	6. 最初と最後の頁 104 ~ 112
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1089/mab.2017.0014	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 -

1. 著者名 Kaneko Mika K., Yamada Shinji, Nakamura Takuro, Abe Shinji, Nishioka Yasuhiko, Kunita Akiko, Fukayama Masashi, Fujii Yuki, Ogasawara Satoshi, Kato Yukinari	4. 巻 6
2. 論文標題 Antitumor activity of chLpMab-2, a human-mouse chimeric cancer-specific antihuman podoplanin antibody, via antibody-dependent cellular cytotoxicity	5. 発行年 2017年
3. 雑誌名 Cancer Medicine	6. 最初と最後の頁 768 ~ 777
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1002/cam4.1049	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 -

〔学会発表〕 計6件 (うち招待講演 0件 / うち国際学会 1件)

1. 発表者名 国田朱子、市村香代子、日比谷孝志、深澤京、西田秀、沼倉里枝、牛久綾、大島正伸、深山正久、牛久哲男
2. 発表標題 胃炎マウスモデルを用いたLMP-2Aによる胃癌発生
3. 学会等名 EBウイルス研究会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 久米絢子、牛久綾、国田朱子、深山正久、牛久哲男
2. 発表標題 EBV関連腫瘍における宿主の免疫状態およびmicroRNA発現異常の意義の解明
3. 学会等名 第78回 日本癌学会学術総会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 山内直子、国田朱子、森田茂樹、日向宗利、牛久綾、深山正久
2. 発表標題 肺癌における肥満細胞浸潤に関する臨床病理学的検討
3. 学会等名 第108回 日本病理学会総会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Akiko Kunita, Miyako Fukasawa, Shu Nishida, Hiroyuki Abe, Tetsuo Ushiku, Masashi Fukayama
2. 発表標題 Establishment of human gastric organoids as a model of early neoplastic stages
3. 学会等名 11th AACR-JCA Joint Conference on Breakthroughs in Cancer Research: Biology to Precision Medicine (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 中山敦仁、阿部浩幸、国田朱子、深山正久
2. 発表標題 EBV関連胃癌におけるウイルスコピー数とその臨床病理学的意義
3. 学会等名 第15回EBウイルス研究会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 山田慎二、国田朱子、深山正久、西岡安彦、加藤幸成
2. 発表標題 ポドブラニンに対するがん特異的認識抗体の抗腫瘍効果および安全性評価
3. 学会等名 第27回日本がん転移学会学術集会・総会
4. 発表年 2018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
--	---------------------------	-----------------------	----