

令和元年6月3日現在

機関番号：32612

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2017～2018

課題番号：17K15967

研究課題名(和文)オルガノイド培養を用いた胃癌ライブラリの構築と人工胃癌モデルの開発

研究課題名(英文) Investigation of the gastric carcinogenesis using gastric tumor organoid library and artificial cancer organoids.

研究代表者

南木 康作(Nanki, Kosaku)

慶應義塾大学・医学部(信濃町)・助教

研究者番号：30571137

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)：本研究はオルガノイド技術の応用から胃癌ライブラリーを構築し、その分子遺伝学的な解析結果と培養上の形質を比較検討した研究である。形状変化やニッチ要求性は多彩なゲノム・エピゲノム変化によって生じており、胃癌ではCDH1とTP53の両変異によって自律的な増殖が生じていることがわかった。両変異をゲノム編集技術で正常胃上皮に導入したところ、自律的な増殖の再現に成功した。さらに、線維芽細胞と共移植を行うことにより胃癌細胞をマウスに効率的に移植することに成功した。本研究で明らかとなった胃癌の自律的な増殖機構の解明により、胃癌の新規治療法につながることを期待できる。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究で構築した胃癌オルガノイドライブラリーは、これまでのin vitro研究で主に使用されてきた細胞株に比して、より臨床胃癌に近い特性を持ち、そのためがん研究の非常に有用なツールとなりうる。また、本研究で用いられた、ヒト胃癌オルガノイドを培養上の形質で分類し、それぞれの分類において見出した分子遺伝学的特性を正常上皮に再現し検証した方法は、これまでになかった新規の研究手法であり、他のがん腫や消化器疾患の研究進捗に非常に有用であると考えられる。

研究成果の概要(英文)：In this study, we constructed a stomach tumor organoid library using organoid culture technology, and compare its phenotype with each result of molecular genetic analyses. Transformation of its morphology and niche requirement were caused by various genome and epigenomic changes, and it was found that CDH1 and TP53 co-mutations caused autonomous growth in gastric cancer, CDH1 and TP53 mutations cause autonomous growth. For verification, we established CDH1/TP53 co-mutated engineered gastric organoids. The engineered organoids could grow autonomously. Furthermore, we improved the efficiency of the success rate of xeno-transplantation of gastric cancer organoids to immuno-deficient mice by co-transplantation with fibroblasts. It can be expected to lead to a new treatment for gastric cancer.

研究分野：消化器内科学

キーワード：胃癌 オルガノイド

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

1. 研究開始当初の背景

胃癌は他国に比べ特に本邦に多く、転移を有する進行癌では最新の化学療法を用いても平均生存期間が1年未満である予後不良の疾患であり、新規治療薬の開発が強く求められている。これまでの胃癌の治療薬開発には主に細胞株が用いられてきたが、細胞株は樹立効率が悪く樹立不可能な癌が多いため、多様性に富む臨床的な胃癌細胞との分子生物学的特性の乖離が問題点となっている。そのため、細胞株と臨床胃癌では薬剤の応答性が異なることも多く、臨床胃癌を疑似した実験ツールの確立が強く求められている。これまでにオルガノイド培養の応用によってヒト腸管上皮、大腸癌、さらに胃上皮幹細胞および胃癌細胞の半永続的な培養が報告されており(Sato T et al. *Gastroenterology*. 2011, Bartfeld S et al. *Gastroenterology*. 2015)。我々は大腸癌オルガノイドライブラリの構築に成功している(Fujii M et al. *Cell Stem Cell*. 2016)。

我々は大腸癌オルガノイドライブラリの培養過程において、癌の病期進行と共にニッチ因子の要求性が段階的に低下し、さらにニッチ因子の要求性(増殖優位性)が大腸癌のドライバー遺伝子変異(APC, KRAS, SMAD4, TP53)の蓄積に規定されていることを示した(Fujii M et al. *Cell Stem Cell*. 2016)。すなわち大腸癌においては adenoma-carcinoma-sequence に基づく変異の蓄積が、ニッチ因子非要求性発育という増殖優位性の獲得により癌化すると考えられる。しかしながら、胃癌においてはニッチ因子に關与するドライバー遺伝子変異の割合が少なく、ニッチ因子要求性に他の要素の關与が考えられる。そこで、胃がんオルガノイドライブラリーを構築し、その多角的解析におけるゲノム・エピゲノム・染色体変化の關連性を明らかにすることにより、胃癌の発癌メカニズムの解明、さらには新規治療ターゲットの確立につなげることが期待できると考え研究を遂行した。

2. 研究の目的

オルガノイド培養を胃癌に応用し、多種の胃癌オルガノイドを構築する。これらの培養に要する成長因子、および樹立した胃癌の分子遺伝学的特性を正常胃オルガノイドとの比較から明らかとする。さらに、見出された胃癌に必要なゲノム・エピゲノム変化を、遺伝子編集技術を応用して正常胃オルガノイドに導入することで発がん機序の解明を目指す。

3. 研究の方法

本研究は下記の要領で遂行した。

(1) 胃組織オルガノイド培養のプロトコルの効率化、(2) 胃癌オルガノイドライブラリの構築

治療あるいは検査を目的とした手術・内視鏡検査を受ける胃癌患者より、胃癌細胞および近傍の正常胃粘膜を採取する。取した組織は既に報告されている胃オルガノイド培養法(Bartfeld S et al. *Gastroenterology*. 2015)を基に、大腸癌オルガノイドライブラリ構築で用いられた(Fujii M et al. *Cell Stem Cell*. 2016)癌オルガノイド樹立の効率化を加え、さらに樹立時の検討から胃癌培養に最適化したプロトコルを確立する。胃癌オルガノイドは本研究の全期間を通じて樹立を行い、最終的に50ラインの胃癌オルガノイドの樹立を目標とする。

(3) 胃癌オルガノイドを用いたマルチオミックス解析

樹立した胃癌オルガノイドはそのカウンターパートとなる正常胃オルガノイドとともに培養・増殖を行い、mRNA および gDNA の採取を行う。採取された mRNA はマイクロアレイ(Affymetrix Prime View)を用いた遺伝子発現解析を行い、正常上皮と胃癌の上皮特異的な

遺伝子発現の差異を評価する。gDNA はコピーナンバー解析 (Cytoscan HD) , 全エキソームシーケンスによる遺伝子変異解析, マイクロサテライト解析を行う。

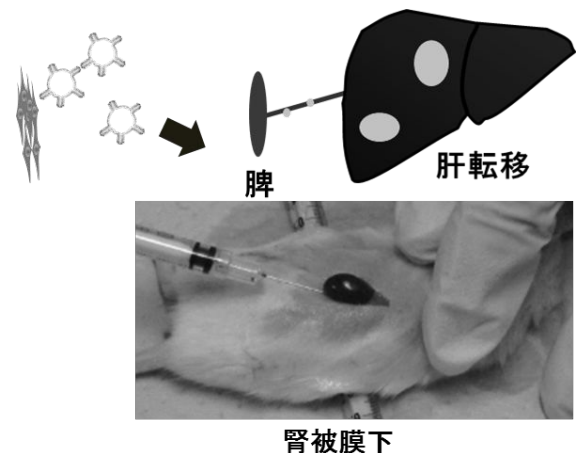
上記の解析結果と樹立したオルガノイドの培養に必要な成長因子を比較し, in vitro における増殖優位性に必要な遺伝子変異, 遺伝子発現変化を検討・抽出する。

(4) 正常胃オルガノイドへのゲノム編集, 遺伝子摂動導入

(3) で抽出した遺伝子変異リストを基に, CRISPR/CAS9 の sgRNA を設計し, 正常胃オルガノイドに増殖優位に必要な変異を導入する。遺伝子変異導入は同時に複数の変異を導入し, (3) で見出した増殖優位性を基に細胞の選択を行う (Wnt 非依存性の獲得であれば Wnt3a なしで培養を行う)。増殖優位性を得たオルガノイドに導入されている変異から, 増殖優位性に必須となる変異を同定する。

(5) 線維芽細胞との共培養系および免疫不全マウスへの効率的な異種移植系の確立, 人工胃癌の生着転移能評価

樹立した線維芽細胞を用いて, オルガノイドとの共培養の系を確立する。これまでのオルガノイド培養および線維芽細胞培養のプロトコルを基として, プロトコルを共培養に最適化する。線維芽細胞との共培養において不要となる成長因子の同定から, 線維芽細胞の胃癌ニッチとしての役割を明らかとする。また, 免疫不全マウスを用いたオルガノイドの異種移植系を用いて胃癌オルガノイドの腎被膜下生着能, 肝転移モデルにおける肝転移能を評価する。異種移植系においても線維芽細胞との同時移植を行うことで生着・転移能に差異がみられるかを明らかにする。(図)



(4) で作成した人工胃癌オルガノイドは, オルガノイド単体あるいは線維芽細胞との同時移植を行い, 生着・転移能の獲得の有無によって癌化したことを確認する。

4. 研究成果

オルガノイド培養技術を胃がんに応用し, ヒト胃がん患者より 37 例の胃がんオルガノイドライブラリを構築した。胃がんは膵がんにおける KRAS や大腸がんにおける APC のような単独のドライバー遺伝子変異は持たないため, 検討の結果, (1) EGF/FGF10 の除去 (2) ROCK 阻害薬を用いずに単細胞継代 (3) TGF β の添加と ALK 阻害薬の除去 (4) MDM2 阻害薬の添加, の方法によって胃がんオルガノイドを効率的に選択培養できることを明らかとした。このオルガノイドライブラリを用いて, 形質解析, 次世代シーケンサーを用いた遺伝子変異解析, 遺伝子発現解析, 染色体異数性解析, メチル化解析を行った。36 例の胃がんオルガノイド解析では, 24 例は増殖因子の一つである Wnt リガンド依存性に増殖する胃がんであり, 12 例が Wnt 非依存性増殖を示す胃がんであることがわかった。12 例の Wnt 非依存性胃がんオルガノイドのうち 6 例は, Wnt シグナル経路の抑制因子である APC の遺伝子変異あるいはタンパク喪失によって Wnt シグナルの恒常活性化が生じていた。残りの 6 例では, Wnt シグナルの活性化なしで増殖し, 特徴的な遺伝子 (WRi genes) の発現変化とメチル化異常が生じている

ことが分かった。また、Wnt 依存性胃がんオルガノイドをさらに解析した結果、24 例中 15 例で R-spondin 非依存性の増殖を示した。これらのうち 5 例は既に知られている *RNF43/ZNRF3* の遺伝子変異および発現低下が生じていたが、残りの R-spondin 非依存性胃がんはこれらの遺伝子変異は見られなかった。そこで、R-spondin 非依存性胃がんに集積している遺伝子変異を統計学的に解析したところ、*CDH1* と *TP53* の両遺伝子変異が有意に生じていることがわかった。これらの両遺伝子変異がニッチ非依存性に関与していることを検証するため、CRISPR/Cas9 によるゲノム編集を応用し、正常胃細胞に *CDH1/TP53* の両遺伝子変異を導入したところ、R-spondin 非依存性の獲得を再現することに成功した。さらに、樹立した胃がんオルガノイドが生体内で増殖することを示すため、超免疫不全マウスの腎被膜下に異種移植を行ったところ、マウス生体内で生着・増殖することが確認された。R-spondin 非依存性胃がんは Wnt リガンドに高い依存性を示すことから、Wnt をターゲットとした治療の有効性の確立のため、R-spondin 非依存性胃がんオルガノイドを移植した超免疫不全マウスに、Wnt 産生阻害薬である Wnt-C59 を投与したところ腫瘍縮小効果がみられた。

本研究は、Wnt 阻害という現行治療にない治療法が、胃がん治療において有効である可能性を示した。また、本研究の研究戦略である phenotype を基軸としたスクリーニングで同定した genotype を、ゲノム編集技術の応用によって再現性を検証する研究手法は、今後のがん研究において有用であると考えられるため、他のがん種についても同様の研究手法を用いて解析を行いたいと考えている。

5 . 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計 3 件)

1. Nanki K, Toshimitsu K, Takano A, Fujii M, Shimokawa M, Ohta Y, Matano M, Seino T, Nishikori S, Ishikawa K, Kawasaki K, Togasaki K, Takahashi S, Sukawa Y, Ishida H, Sugimoto S, Kawakubo H, Kim J, Kitagawa Y, Sekine S, Koo BK, Kanai T, Sato T. Divergent Routes toward Wnt and R-spondin Niche Independency during Human Gastric Carcinogenesis. *Cell* 査読あり . 2018 Aug 9;174:856-869.e17.
DOI: 10.1016/j.cell.2018.07.027.
2. Seino T, Kawasaki S, Shimokawa M, Tamagawa H, Toshimitsu K, Fujii M, Ohta Y, Matano M, Nanki K, Kawasaki K, Takahashi S, Sugimoto S, Iwasaki E, Takagi J, Itoi T, Kitago M, Kitagawa Y, Kanai T, Sato T. Human Pancreatic Tumor Organoids Reveal Loss of Stem Cell Niche Factor Dependence during Disease Progression. *Cell Stem Cell* 査読あり . 2018 Mar 1;22:454-467.e6.
DOI: 10.1016/j.stem.2017.12.009.
3. Sugimoto S, Ohta Y, Fujii M, Matano M, Shimokawa M, Nanki K, Date S, Nishikori S, Nakazato Y, Nakamura T, Kanai T, Sato T. Reconstruction of the Human Colon Epithelium In Vivo. *Cell Stem Cell* 査読あり . 2018 Feb 1;22:171-176.e5.
DOI: 10.1016/j.stem.2017.11.012.

〔学会発表〕(計 1 件)

1. 南木康作、佐藤俊朗、金井隆典、オルガノイドによる胃がんニッチ非依存性獲得機構の解明、第 105 回日本消化器病学会総会、2019 年

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。