

令和 3 年 6 月 15 日現在

機関番号：72602

研究種目：基盤研究(B) (一般)

研究期間：2018～2020

課題番号：18H02684

研究課題名(和文) 遺伝性疾患を用いた遺伝的背景による大腸がん制御機構の解明

研究課題名(英文) Genetic- and Somatic-regulation of colorectal cancer

研究代表者

八尾 良司 (YAO, Ryoji)

公益財団法人がん研究会・がん研究所 細胞生物部・部長

研究者番号：80291095

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 13,500,000円

研究成果の概要(和文)：5名の家族性大腸腺腫症(FAP)から42個のオルガノイドを樹立し、造腫瘍性と薬剤感受性の制御機構を解析した。cFAPとaFAPの比較の結果、造腫瘍性とIFN/STATシグナルとの相関が明らかになり、FAPモデルマウスのStat1遺伝子をゲノム編集により欠損させると腫瘍数が減少した。MEK阻害剤に対する感受性の比較検討では、KRAS変異に加え、IFN/STATシグナル活性が高い患者由来オルガノイドが抵抗性を示すことが明らかになった。以上の結果により、KRAS遺伝子の体細胞変異に加え、遺伝的背景によるIFN/STATシグナル活性が、大腸がんの造腫瘍性と化学療法感受性に寄与する可能性が示された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

大腸がんは、遺伝子変異の蓄積により進展することが知られており、診断や治療法の選択の指標となっている。しかし、同一の遺伝子変異を持っていても転帰や化学療法の奏効率には、個人差がある。本研究では、遺伝的に多数の腫瘍を発生する家族性大腸腺腫症患者に生じた腫瘍からオルガノイドを樹立し、造腫瘍性と分子標的治療薬に対する感受性を検討した。その結果、遺伝的にIFN/STATシグナルが高い患者に生じた腫瘍は、造腫瘍性が高く、化学療法に対して抵抗性を示すことが明らかになった。

研究成果の概要(英文)：Familial adenomatous polyposis coli (FAP) is an autosomal-dominant inherited disease caused by germline mutations in the adenomatous polyposis coli (APC) gene. FAP patients are classified into two major groups based on clinical manifestations: classical FAP (CFAP) and attenuated FAP (AFAP). In this study, we established 42 organoids from three CFAP patients and two AFAP patients. Comprehensive gene expression analysis demonstrated a close association between IFN/STAT signaling and the phenotypic features of FAP patients. Genetic disruption of Stat1 in the mouse model of FAP reduced tumor formation. We found that enhanced IFN/STAT signaling in CFAP conferred resistance to MEK inhibitors. These findings reveal the crosstalk between RAS signaling and IFN/STAT signaling, which contributes to the tumor-forming potential and drug response. These results offer a rationale for targeting of IFN/STAT signaling and for the stratification of CRC patients.

研究分野：細胞生物学

キーワード：患者由来オルガノイド 大腸がん KRAS IFN/STATシグナル MEK阻害剤

1. 研究開始当初の背景

大腸がんは、発生初期に APC 遺伝子の不活化が生じ、その後ドライバー変異が蓄積することにより進展する。この過程で生じる体細胞変異は、次世代シーケンサー (NGS) を用いた網羅的解析により、全容が明らかにされている。しかし、がんの発生・進展、あるいは化学療法に対する反応性には、個人差があることが経験的に知られている。その重要な要因として

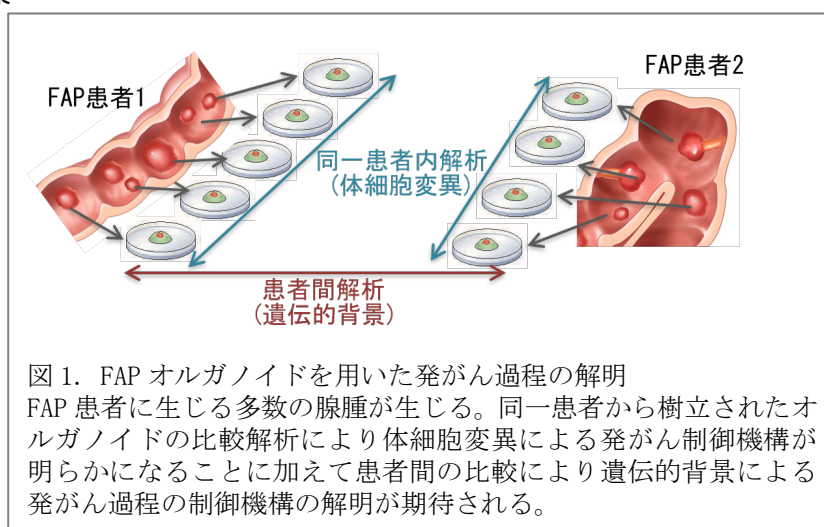


図1. FAP オルガノイドを用いた発がん過程の解明
FAP 患者に生じる多数の腺腫が生じる。同一患者から樹立されたオルガノイドの比較解析により体細胞変異による発がん制御機構が明らかになることに加えて患者間の比較により遺伝的背景による発がん過程の制御機構の解明が期待される。

して遺伝的背景が挙げられるが、分子機構を解明するためには、家系調査やコホート研究による医療情報とゲノム情報の集約的解析が求められることに加え、実証実験は倫理的な制約が大きいため、十分に解明されているとは言い難い。

家族性大腸腺腫症(FAP)は、APC 遺伝子に生殖系列変異を持つ遺伝性疾患であり、消化管に生じる多数の腫瘍は、遺伝的背景を同一にし、かつ異なる体細胞変異をもつという特徴をもつ。FAP は、発生する腫瘍数や年齢などに基づき、病状がマイルドな attenuated type(aFAP)とシビアな classical type (cFAP)に分類される。FAP に生じた腫瘍オルガノイドの体系的な樹立・解析はこれまでに報告がなく、複数の患者からオルガノイドを樹立することができれば、体細胞変異に加えて、遺伝的背景によるがんの制御と化学療法に対する反応性の理解に貢献できると考えられた。

2. 研究の目的

大腸がんは、体細胞変異が生じることにより発生・進展するが、同じ体細胞変異のがんが全て同じ症状を示すわけではない。すなわち、がんの罹患や転帰は、患者間で不均一であり、このことが診断や治療を困難にする要因となっている。本研究課題では、FAP 患者からオルガノイドを樹立することにより、体細胞変異に加え、遺伝的背景によるがんの発生・進展機構を解明し、生物学的に実証することを第一の目的とした。

分子標的治療薬の開発により、がん治療法の選択肢が広がり、治療成績も向上している。しかし化学療法の奏効率にも遺伝的背景による患者間の不均一性が存在することから、効果が期待できる患者を正しく選択することは、治療法開発の上で、重要な課題となっている。本研究では、体細胞変異と遺伝的背景による MEK 阻害剤感受性の制御機構の解明を第二の目的とした。

3. 研究の方法

FAP 患者からオルガノイドを樹立し、凍結ストックを作製することにより、オルガノイドパネルを作製した。すべてのオルガノイドは、ゲノム(遺伝子変異および染色体異常)とトランスクリプトーム解析を行った。また、免疫不全マウスに移植することにより、造腫瘍性を検討した。MEK 阻害剤(selmetinib および trametinib)に対する薬剤感受性は、384 プレート上にシングルセルから再構成することにより均一なオルガノイドを作製し、MT 活性を指標にしたルシフェラーゼアッセイにより生存率を算出した。IFN/STAT シグナルの造腫瘍性制御解析を目的として、Apc コンディショナルノックアウト(cKO)マウスをゲノム編集により Stat1 遺伝子を欠損させ、腫瘍量を計測した。ゲノム編集により STAT1 欠損 FAP オルガノイドを作製し、EGFR 阻害剤、MEK 阻害剤に対する感受性を評価した。

4. 研究成果

- (1) FAP オルガノイドの樹立と造腫瘍性評価: 家族性大腸腺腫症と診断された 5 名の患者の手術検体から腫瘍を独立に採取し、計 42 個のオルガノイドを樹立した。すべてのオルガノイドを免疫不全マウス(NOG マウス)に皮下移植を行い、造腫瘍能を検討したところ、cFAP から樹立された 1 個のオルガノイドのみが腫瘍を形成した。
- (2) ゲノム解析: 大腸がんのリカレント変異遺伝子 69 個を独自にピックアップし、ターゲット

シーケンスを行った。2名の患者由来オルガノイドで APC 遺伝子の germline 変異を同定した。別の2名の患者では、germline 変異と思われる APC 遺伝子の N 末端に 30kb および 114kb の欠失を SNP アレイ解析で認めた。これらの変異に加え、それぞれのオルガノイドに特異的な APC 変異もしくは LOH が確認されている。KRAS 変異は、4名の患者由来オルガノイドに1つずつ計4個に認め、そのうち1つは造腫瘍性を示したクローンであった。さらに BRAF 変異が1個と FBXW7 変異が5個のオルガノイドで確認された。これらの結果は、大腸がんの発生過程では、APC 遺伝子の不活化に加え、KRAS、BRAF、FBXW7 が腫瘍発生初期に生じるものの、造腫瘍能獲得には十分でないことが明らかになった。

- (3) **トランスクリプトーム解析**：42 クローンのマイクロアレイによるトランスクリプトーム解析を行った。遺伝的背景に着目し患者間の比較を行った結果、interferon alpha response、interferon gamma response が最も発現変動が高い遺伝子セットとして同定された。興味深いことに、これらの遺伝子の発現量は、病態と高い相関を示し、症状が重篤な cFAP で高く、軽微な aFAP で低いことが明らかになった。IPA によるナレッジデータベースの検索でも Interferon signaling が最も高い相関を示し、中でも STAT1 とその下流の遺伝子群の発現量が cFAP で亢進していた。これらの結果から、FAP 患者の病態は、それぞれの患者がもつ固有の IFN/STAT シグナル活性が影響する可能性が示唆された。
- (4) **IFN/STAT シグナルによる造腫瘍性制御**：Apc 遺伝子欠損により生じる消化管腫瘍における IFN/STAT シグナルの関与を検討するために、Apc 遺伝子 cKO と Lgr5-CreERT2 アリルをもつマウス受精卵を用いて、ゲノム編集により Stat1 遺伝子欠損を行った。Stat1 ホモ欠損マウスは、正常に生まれ、体重や外見上の異常は確認されなかった。しかしタモキシフェン投与により生じる腫瘍は、数、サイズともに減少していた。これらの結果から、IFN/STAT シグナルが、消化管腫瘍発生を正に制御することが示された。
- (5) **MEK 阻害剤に対する感受性評価**：免疫不全マウスの皮下移植において、造腫瘍性を示したオルガノイドは、IFN/STAT シグナルが最も高く、さらに KRAS 変異を有していたことから、この二つのシグナルのクロストークを検討した。その結果 STAT1 タンパク質の Ser727 のリン酸化が KRAS 変異により亢進しており、KRAS 変異が STAT1 を恒常的に活性化する可能性が示唆された。そこで KRAS の下流分子である MEK の阻害剤である selmetinib と trametinib に対する感受性を検討した。その結果、KRAS 変異をもつクローンのうち、cFAP 由来のクローンのみが、抵抗性を示すことが明らかになった。さらに、STAT1 をゲノム編集により欠損させることにより、MEK 阻害剤に対する抵抗性が解除されることを確認した。

本研究では、大腸がん発生に影響する遺伝的背景因子として、IFN/STAT シグナルを同定することができた。消化管腫瘍モデルマウスでは Stat1 欠損により腫瘍数・サイズが減少する。さらに、IFN/STAT シグナルは、MEK 阻害剤に対する感受性にも関わることが

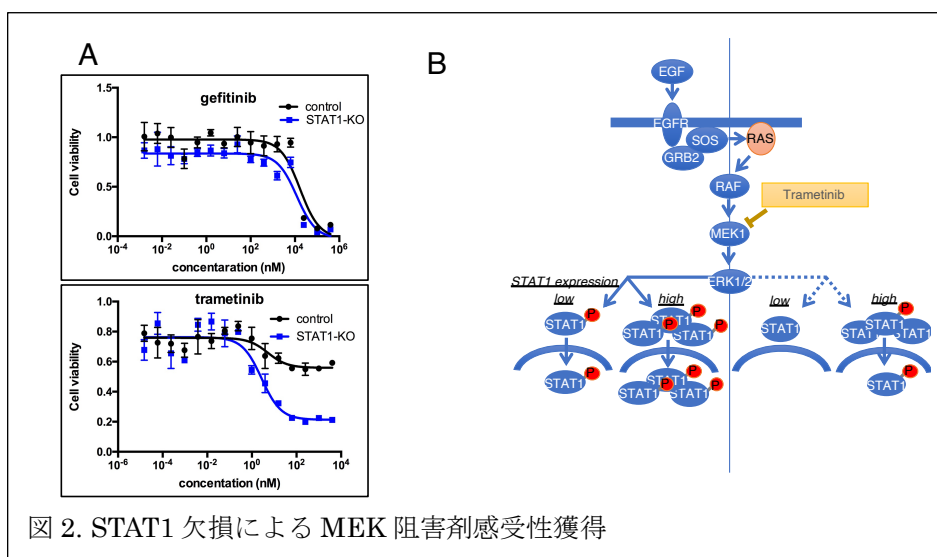


図 2. STAT1 欠損による MEK 阻害剤感受性獲得

示された。以上の結果は、IFN/STAT シグナルを標的とすることにより、消化管腫瘍を抑制するとともに、MEK 阻害剤に対する感受性を向上させる可能性を示している。

【引用文献】

- (1) Sakahara, M., Okamoto, T., Oyanagi, J., Takano, H., Natsume, Y., Yamanaka, H., Kusama, D., Fusejima, M., Tanaka, N., Mori, S., *et al.* (2019). IFN/STAT signaling controls tumorigenesis and the drug response in colorectal cancer. *Cancer Sci* *110*, 1293-1305.
- (2) Osumi, H., Muroi, A., Sakahara, M., Kawachi, H., Okamoto, T., Natsume, Y., Yamanaka, H., Takano, H., Kusama, D., Shinozaki, E., *et al.* (2020). Evaluation of the RAS signaling network in response to MEK inhibition using organoids derived from a familial adenomatous polyposis patient. *Scientific reports* *10*, 17455.
- (3) Okamoto, T., duVerle, D., Yaginuma, K., Natsume, Y., Yamanaka, H., Kusama, D., Fukuda, M., Yamamoto, M., Perraudeau, F., Srivastava, U., *et al.* (2021). Comparative Analysis of Patient-Matched PDOs Revealed a Reduction in OLFM4-Associated Clusters in Metastatic Lesions in Colorectal Cancer. *Stem cell reports* *16*, 1-14.

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計6件（うち査読付論文 6件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 6件）

1. 著者名 Okamoto Takuya, duVerle David, Yaginuma Katsuyuki, Natsume Yasuko, Yamanaka Hitomi, Kusama Daisuke, Fukuda Mayuko, Yamamoto Mayuko, Perraudau Fanny, Srivastava Upasna, Kashima Yukie, Suzuki Ayako, Kuze Yuuta, Takahashi Yu, Ueno Masashi, Sakai Yoshiharu, Noda Tetsuo, Tsuda Koji, Suzuki Yutaka, Nagayama Satoshi, Yao Ryoji	4. 巻 16
2. 論文標題 Comparative Analysis of Patient-Matched PDOs Revealed a Reduction in OLFM4-Associated Clusters in Metastatic Lesions in Colorectal Cancer	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Stem Cell Reports	6. 最初と最後の頁 954 ~ 967
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.stemcr.2021.02.012	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 Osumi Hiroki, Muroi Atsushi, Sakahara Mizuho, Kawachi Hiroshi, Okamoto Takuya, Natsume Yasuko, Yamanaka Hitomi, Takano Hiroshi, Kusama Daisuke, Shinozaki Eiji, Ooki Akira, Yamaguchi Kensei, Ueno Masashi, Takeuchi Kengo, Noda Tetsuo, Nagayama Satoshi, Koshikawa Naohiko, Yao Ryoji	4. 巻 10
2. 論文標題 Evaluation of the RAS signaling network in response to MEK inhibition using organoids derived from a familial adenomatous polyposis patient	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Scientific Reports	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) 10.1038/s41598-020-74530-x	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 Sakahara Mizuho, Okamoto Takuya, Oyanagi Jun, Takano Hiroshi, Natsume Yasuko, Yamanaka Hitomi, Kusama Daisuke, Fusejima Mishio, Tanaka Norio, Mori Seiich, Kawachi Hiroshi, Ueno Masashi, Sakai Yoshiharu, Noda Tetsuo, Nagayama Satoshi, Yao Ryoji	4. 巻 110
2. 論文標題 IFN/STAT signaling controls tumorigenesis and the drug response in colorectal cancer	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Cancer Science	6. 最初と最後の頁 1293 ~ 1305
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1111/cas.13964	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 Weng Jane S., Nakamura Takanori, Moriizumi Hisashi, Takano Hiroshi, Yao Ryoji, Takekawa Mutsuhiro	4. 巻 2
2. 論文標題 MCRIP1 promotes the expression of lung-surfactant proteins in mice by disrupting CtBP-mediated epigenetic gene silencing	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Communications Biology	6. 最初と最後の頁 227
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1038/s42003-019-0478-3	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 Ito Chizuru, Akutsu Hidenori, Yao Ryoji, Yoshida Keiichi, Yamatoya Kenji, Mutoh Tohru, Makino Tsukasa, Aoyama Kazuhiro, Ishikawa Hiroaki, Kunimoto Koshi, Tsukita Sachiko, Noda Tetsuo, Kikkawa Masahide, Toshimori Kiyotaka	4. 巻 9
2. 論文標題 Odf2 haploinsufficiency causes a new type of decapitated and decaudated spermatozoa, Odf2-DDS, in mice	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Scientific Reports	6. 最初と最後の頁 14249
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1038/s41598-019-50516-2	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 Abe Yuichi, Tada Asa, Isoyama Junko, Nagayama Satoshi, Yao Ryoji, Adachi Jun, Tomonaga Takeshi	4. 巻 8
2. 論文標題 Improved phosphoproteomic analysis for phosphosignaling and active-kinome profiling in Matrigel-embedded spheroids and patient-derived organoids	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Scientific Reports	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) 10.1038/s41598-018-29837-1	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 -

〔学会発表〕 計17件 (うち招待講演 0件 / うち国際学会 3件)

1. 発表者名 八尾 良司
2. 発表標題 体細胞変異と遺伝的背景による大腸がん薬剤感受性制御機構
3. 学会等名 第77回日本癌学会学術総会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 岡本 拓也
2. 発表標題 患者由来大腸がんオルガノイドを用いた転移モデルマウス
3. 学会等名 第77回日本癌学会学術総会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 八尾 良司
2. 発表標題 大腸がん組織を構成する細胞集団の多様性と階層性
3. 学会等名 第1回鹿児島がん代謝セミナー
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 八尾 良司
2. 発表標題 IFN/STAT signaling controls tumorigenesis of colorectal cancers
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 岡本 拓也
2. 発表標題 Mouse model of metastatic colorectal cancer by orthotopic transplantation of patient derived organoids
3. 学会等名 AACR Annual Meeting 2019 (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 八尾 良司
2. 発表標題 Comparative analysis of patient-derived organoids from primary colorectal cancer and matched metastatic and recurrent lesions.
3. 学会等名 Cell Symposium: Engineering Organoids and Organs (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 八尾 良司
2. 発表標題 Patient derived organoid bank as a platform to investigate colorectal cancer.
3. 学会等名 基盤医学持論・特徴あるプログラム「Cancer Science Course」
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 八尾 良司、長山 聡、鈴木 穰
2. 発表標題 進行大腸がんオルガノイドの1細胞解析
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 岡本 拓也、柳沼 克幸、長山 聡、八尾 良司
2. 発表標題 大腸がん同所移植モデルマウスを用いた転移の再現
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 長山 聡、岡本 拓也、八尾 良司
2. 発表標題 大腸癌発生と薬剤感受性におけるIFN/STATシグナル伝達系の関与
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 八尾 良司
2. 発表標題 Computational modeling of ERK signaling in patient-derived organoids established from colorectal cancer.
3. 学会等名 数理腫瘍学 国際研究ネットワークの構築 テーマ「生命科学と数理科学の融合」
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 八尾 良司
2. 発表標題 がん患者由来オルガノイドを用いた研究
3. 学会等名 第79回日本癌学会学術総会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 柳沼 克幸、岡本 拓也、長山 聡、八尾 良司
2. 発表標題 ヒト大腸がんオルガノイド同所移植マウスモデルにおける転移腫瘍の発生とEMTマーカーの発現
3. 学会等名 第79回日本癌学会学術総会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 岡本 拓也、柳沼 克幸、長山 聡、八尾 良司
2. 発表標題 患者由来大腸がんオルガノイド同所移植マウスモデルにおける転移播種細胞の同定
3. 学会等名 第79回日本癌学会学術総会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 長山 聡、岡本 拓也、八尾 良司
2. 発表標題 大腸癌組織を構成する細胞集団の多様性
3. 学会等名 第79回日本癌学会学術総会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 八尾 良司
2. 発表標題 患者由来オルガノイドを用いた大腸がんの発生、転移・再発機構の解明
3. 学会等名 患者由来がんモデル講演会 -基礎研究から臨床応用まで-
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 八尾 良司
2. 発表標題 患者由来オルガノイドを用いた大腸がん組織の細胞不均一性の解明
3. 学会等名 第20回日本再生医療学会総会
4. 発表年 2021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
研究 分 担 者	足立 淳 (ADACHI Jun) (20437255)	国立研究開発法人医薬基盤・健康・栄養研究所・医薬基盤研 究所 創薬デザイン研究センター・プロジェクトリーダー (84420)	

6. 研究組織（つづき）

	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	長山 聡 (NAGAYAMA Satoshi) (70362499)	公益財団法人がん研究会・有明病院 消化器外科・医長 (72602)	

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関