

令和 3 年 6 月 21 日現在

機関番号：72602

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2018～2020

課題番号：18K07217

研究課題名(和文)オルガノイドの同所移植マウスモデルを用いた、ヒト大腸がん転移メカニズムの研究

研究課題名(英文) Study of the metastatic process in a mouse model transplanted with the organoids derived from human colorectal cancer.

研究代表者

柳沼 克幸 (YAGINUMA, Katsuyuki)

公益財団法人がん研究会・がん研究所 細胞生物部・研究員

研究者番号：40182307

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)：ヒト大腸がんオルガノイドをマウス大腸に同所移植し、原発巣腫瘍の形成と転移巣形成に至るモデルマウス実験系を構築した。同一患者由来の原発巣と肝転移巣からのオルガノイドを免疫不全(NSG)マウスの直腸粘膜下に同所移植したところ、オルガノイドの肝再発巣由来と原発巣由来によって転移巣形成能に違いがあり、RNA発現解析からは、転移巣の構成細胞の階層性に変化を生じていることが示された。組織学的には、組織像と転移に関するEMTマーカー発現の特徴を明らかにした。さらに、転移過程の中間段階の播種腫瘍細胞(DTC)の特性を知る上で画期的なDTC由来のオルガノイドの樹立に成功し、転移プロセスの詳細な解析を行った。

研究成果の学術的意義や社会的意義

大腸がんの転移モデルマウスとしては脾内移植や尾静脈などの異所移植があるが、これは転移プロセスの一部分だけを再現した方法であり、申請者らが構築した、大腸への同所移植による転移モデルマウス実験系は、より生理的に全体を再現する方法として優れている。このモデルマウスを用いることで、ヒト大腸がんの原発巣と転移巣の腫瘍細胞の多様性と階層性の解析が可能になり、さらに、播種腫瘍細胞由来のオルガノイドを分離できたことは、転移プロセスの詳細な分子メカニズムの解明に繋がるとともに、転移抑制の治療法の選択や予後予測の精度の向上が期待される。

研究成果の概要(英文)：To study the metastatic process, we established a mouse model orthotopically-transplanted with the organoids (PDOs) derived from primary, metastatic, recurrent tumors of the same patient. Although these mice developed colorectal tumors equally, lung metastasis was frequently observed in mice with PDO from the recurrent tumor. On the other hand, any macroscopic metastasis was not observed in mice with PDO from the primary tumor, suggesting that PDO from the recurrent tumor has higher metastatic ability than PDO from the primary tumor. We also focused on the expression of EMT markers, which is implicated in tumor cell invasion and metastasis. Furthermore, we successfully established the novel organoids originated from the disseminated cells in remote organs, which are assumed to be an intermediate state in the metastatic process and demonstrated the occurrence of lung metastasis by transplantation of these novel organoids even in a low incidence.

研究分野：実験腫瘍学

キーワード：大腸がん 転移モデルマウス 患者由来オルガノイド 播種腫瘍細胞 腫瘍幹細胞 EMT

1. 研究開始当初の背景

大腸がんの患者数は、増加の一途にあり、がん死亡原因の上位を占めることから、その克服を目指す研究は大きな社会的関心事となっている。特に、がんの転移は、治療とその予後を考える上で、克服すべき重大な問題である。これまでのがん研究では、腫瘍組織から二次元培養法を用いて樹立した「がん細胞株」を、細胞生物学的解析や薬剤感受性試験に資することにより治療法を探ることが主であった。ところが、この手法の問題は、「がん細胞株」が患者の臨床像とは大きくかけ離れてしまい、治療法開発でも有効な薬剤の開発には至らない点が多かった。一方、大腸がんモデルマウスとしては、複数の変異を組み合わせた遺伝子改変による試みがなされているが、再現性よく高頻度に転移するモデルマウスの作製には至っていない。二次元培養細胞の移植によるモデルマウスも、生体内の特性を十分反映しているとは言えず、その成果には問題点がある。本研究では、同一患者由来の原発巣と転移巣からオルガノイドを樹立して実験することで遺伝的背景による要因を排除できるため、体細胞変異による遺伝的变化と遺伝子発現の変化を正確に捉えることが可能であり、大腸がんの転移メカニズムの研究を進める上で大変有利である。

2. 研究の目的

本研究では、大腸がんの同一患者の原発巣と転移巣から樹立したオルガノイドを利用して、転移モデルマウスを作製し、大腸がん転移の分子機構を解明することを目的とする。具体的には、モデルマウスを用いた生物学的なアプローチにより、転移に関わる遺伝子を同定し、その機能的な役割を明らかにする。本研究計画は、本邦一の手術件数を誇るがん研有明病院と密接な連携により、同一患者由来の原発巣と転移巣をペアで解析できる点で、他にはない独自性を有している。

3. 研究の方法

モデルマウスの作製には、超免疫不全(NSG)マウスを用いた。移植するオルガノイドにはルシフェラーゼ遺伝子を導入し、発光イメージングによる経時的観察を行った。移植法としては、肛門からの直腸脱転法と直腸内視鏡と連動したマニピュレーターを用いた方法によって、オルガノイド懸濁液を直腸粘膜下に注入した。腫瘍組織の組織学的解析には、蛍光免疫染色法を適用し、また、mRNA発現解析には、ACD社のRNAscope Multiplex Fluorescent Reagentキットを利用したIn situ RNA hybridizationを行った。一細胞RNA発現解析(scRNA-seq)は、Chromium system(10x Genomics)を用いて行った。

4. 研究成果

(1) オルガノイドの同所移植によるモデルマウス実験系の構築

本研究では、ヒト大腸がん転移の分子機構を解明することを目的として、遺伝的背景を同じにする、同一患者由来の原発巣、肝転移巣、肝再発巣から三種のオルガノイドを調製し、さらに、このオルガノイドにGFP遺伝子とルシフェラーゼ遺伝子を導入して増殖と転移過程を追跡する標識マーカーとした。超免疫不全マウス(NSG)の直腸粘膜下に同所移植することで腫瘍発生モデルマウスを作製し、発光イメージングによる経時的観察を行った。その結果、それぞれのオルガノイドの直腸移植巣では、オリジナルの臨床検体に類似した組織像を再現することが確認された。また、原発巣オルガノイドを移植したモデルマウスで転移は認められないのに対して、肝再発巣オルガノイドでは高頻度に肺転移が見られた

ことから、このマウスモデルでは、移植するオルガノイドの転移能の差異を再現できることが判明した。原発巣由来と転移巣由来のオルガノイドの1細胞発現解析(scRNA-seq)からは、原発巣と転移巣で、その構成細胞集団の階層性に変化を生じていることが示唆された。このことは、原発巣由来と転移巣由来オルガノイドを移植した、モデルマウス腫瘍組織の In situ RNA hybridizationで、オルガノイドと同様に、幹細胞マーカー(OLFM4)の発現が転移巣腫瘍で大きく減少していることでも確認された。

(2) モデルマウス腫瘍の EMT state の解析と転移能

腫瘍細胞の転移過程には、上皮間葉転換(EMT)が関係することから、同一患者由来のオルガノイド原発巣腫瘍について、EMT関連マーカーの免疫組織学的解析を行って、モデルマウスにおける腫瘍の転移頻度とEMTマーカー発現の特徴を明らかにした。EMTは、上皮系細胞から間葉系細胞に変換する二段階プロセスではなく、過渡的段階の hybrid stateがあることが明らかにされている。

解析の結果は、転移頻度の高い腫瘍組織ではLate hybrid EMTマーカーのFsp1発現細胞の出現頻度が上昇していることが示され、Late hybrid EMT と転移巣形成能の関連性が示唆された(図1)。

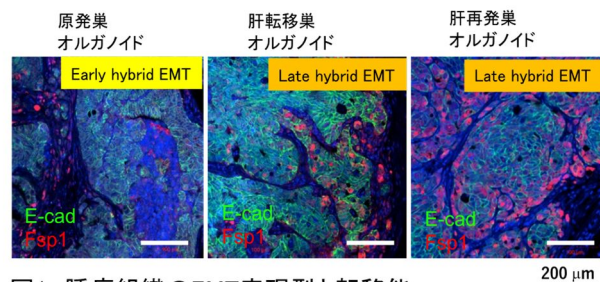


図1 腫瘍組織のEMT表現型と転移能

Late hybrid EMTのマーカーFsp1の発現は、肝転移巣由来と肝再発巣由来オルガノイドで上昇していた。Ecad: E-cadherin (緑), Fsp1: Fibroblast specific protein (赤)

(3) 転移巣における播種腫瘍細胞(DTC)の解析と DTC オルガノイドの分離

原発巣由来オルガノイドの腫瘍では、モデルマウスに転移巣形成が見られないことから、遠隔臓器組織における播種腫瘍細胞(DTC: disseminated tumor cell)の解析を行なった。その結果、腫瘍幹細胞の播種自体は起きるものの、その後の増殖進展がなく転移巣の形成に至らないことが観察された(図2)。そこで、播種された腫瘍細胞

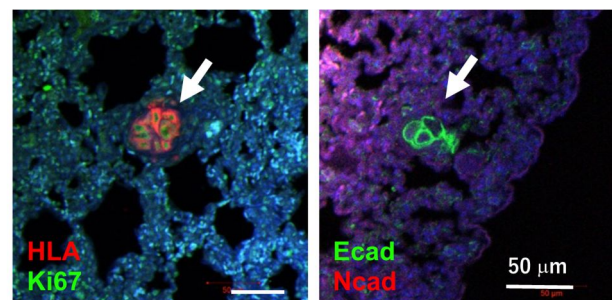


図2 播種腫瘍細胞(DTC)の検出

オルガノイド細胞の播種は確認され、微小塊は認められるが、大きな増殖巣には至っていない。

の特性を明らかにする目的で、この段階にある腫瘍細胞(DTC)の分離を試み、DTC由来のオルガノイドを2系統(DTC-1、DTC-2)樹立することに成功した。興味深いことに、このDTCオルガノイドのモデルマウス移植を行ったところ、DTC-1では転移巣を形成したのに対して、DTC-2では転移巣形成が起きないことが判明し、それぞれが転移プロセスの僅かに異なる段階に位置していることが示唆された。このような転移過程の中間的段階に相当するDTCオルガノイドを分離できたことは、画期的成果であり、今後、scRNA-seqによるRNA発現解析を行うとともに、モデルマウスを用いた機能の解析結果を合わせることで、転移巣の形成を左右する分子機構の解明を進めている。

5. 主な発表論文等

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

1. 著者名 T.Okamoto, D.duVerle, K.Yaginuma, Y.Natsume, H.Yamanaka, D.Kusama, M, Fukuda, M. Yamamoto, F.Perraudeau, U.Srivastava, Y. Kashima, A.Suzuki, Y.Kuze, Y.Takahashi, M.Ueno, Y.Sakai, T.Noda, K.Tsuda, Y.Suzuki, S.Nagayama, and R.Yao.	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 -

〔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 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 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 Reproducibility of metastasis of colorectal cancer using the orthotopic transplantation mouse model.
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、鈴木稯、八尾良司
2. 発表標題 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 新学術領域研究「細胞ダイバース」第2回若手ワークショップ
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Takuya Okamoto, Katsuyuki Yaginuma, Satoshi Nagayama, Ryoji Yao
2. 発表標題 Mouse model of metastatic colorectal cancer by orthotopic transplantation of patient-derived organoids
3. 学会等名 The AACR Annual Meeting 2019 (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 岡本 拓也, 八尾 良司, 柳沼 克幸, 長山 聡
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

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

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
---------	---------