

令和 3 年 6 月 18 日現在

機関番号：22701

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2018～2020

課題番号：18K07950

研究課題名(和文)オルガノイドを用いた大腸腫瘍化学予防効果の網羅的解析システムの開発

研究課題名(英文)Development of comprehensive analysis system for chemopreventive effect of colon tumor using organoid

研究代表者

日暮 琢磨(HIGURASHI, Takuma)

横浜市立大学・医学部・講師

研究者番号：90622580

交付決定額(研究期間全体):(直接経費) 3,400,000円

研究成果の概要(和文):大腸癌は全世界的に増加傾向であり、早急な対策が求められている。我々は新規培養技術であるオルガノイドを用いて正常上皮、腺腫、Sessile serrated adenoma/polyp (SSA/P)、大腸癌のそれぞれの発癌段階をオルガノイドで再現し、化学予防候補薬の薬理/機序解明を網羅的に解析するシステムの開発を行うことを目的として取り組んだ。ヒト由来の大腸オルガノイドの樹立および細胞バンクを作成した。またXenograft modelを用いてマウスへの移植にも成功した。化学予防薬のアスピリンおよびメトホルミンを用いて化学予防効果の相乗作用および機序の解明を行った。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究では大腸癌の一次予防、なかでも化学予防(Chemoprevention)に着目して研究を進め、化学予防薬候補のアスピリン、メトホルミンの予防効果の機序解析を行った。大腸癌の二次予防(早期発見、早期治療)は、これまで一定の成果を上げてはいるが、増加する大腸癌の罹患/死亡には対応しきれず、今後はより進んだ対策が求められている。そのため根本的な対策である一次予防(健康増進/疾病予防)が今後の大腸癌の罹患/死亡率の抑制や、高騰する医療費の抑制には、より重要となり、本研究の化学予防の取り組みはその一助となるものである。

研究成果の概要(英文):Colorectal cancer is on the rise worldwide, and urgent countermeasures are required. The purpose of our study was to develop a comprehensive analysis system to elucidate the pharmacology and mechanism of chemopreventive candidates by recapitulating the carcinogenic stages of normal epithelium, adenoma, sessile serrated adenoma/polyp (SSA/P), and colorectal cancer using organoids, a novel culture technique. The aim of this study was to develop a system for comprehensive analysis of the pharmacology/mechanism of chemopreventive candidate drugs by recreating each carcinogenic stage of colorectal cancer with organoids. We established human-derived colonic organoids and created a cell bank. We also succeeded in transplanting them into mice using the Xenograft model. We investigated the synergistic effects and mechanisms of chemoprevention using aspirin and metformin.

研究分野：消化器内科

キーワード：大腸癌 化学予防 オルガノイド アスピリン メトホルミン

## 1. 研究開始当初の背景

大腸癌は全世界的に増加傾向であり、特に本邦では、大腸癌は国立がん研究センターがん対策情報センターの部位別がん罹患数予測で 2015 年ついに男女合計で第 1 位(男性 4 位、女性 2 位) 部位別がん死亡数予測で男女計 2 位(男性 3 位、女性 1 位)と長期的に持続して増加を示しており、2017 年予測でも変わらず大腸がんの罹患率/死亡率は高く、早急な対策が求められている。分子標的薬や免疫チェックポイント阻害薬、新規抗がん剤などの進歩により大腸癌の生存期間の延長や、死亡率の低下は認めているものの、比例して医療費の増大も著しい。また、便潜血による健診や、内視鏡検査によるポリープ切除は大腸癌の死亡率を下げる事が報告されているが、大腸ポリープや癌を内視鏡治療した患者はその後大腸ポリープや癌の再発/新規発生が多いことが知られており問題となっている。これらの対策はがん予防における二次予防(早期発見、早期治療)にあたり、これまで一定の成果を上げてはいるが、増加する大腸癌の罹患/死亡には対応しきれず、今後はより進んだ対策が求められている。そのため根本的な対策である一次予防(健康増進/疾病予防)が今後の大腸癌の罹患/死亡率の抑制や、高騰する医療費の抑制には、より重要となる。本研究では大腸癌の一次予防、なかでも化学予防(Chemoprevention)に着目して研究を進める。化学予防とは、特定の栄養素や薬剤を用いて疾病を予防するという概念であり、既に循環器や神経内科領域では、心筋梗塞や脳梗塞の予防としてアスピリンなどの抗血小板薬を投与して積極的に予防を行っている。癌領域については、これまで早期発見や治療法に対する研究に注力されており、本概念については随分と取り組みが遅れてきたが、今後は疾病の予防に向けた取り組みが非常に重要である。

## 2. 研究の目的

これまで大腸癌の化学予防を検討した臨床試験がいくつか行われており、代表的なものでは、アスピリンや NSAIDs (特に COX-2 阻害薬)の試験が過去に数多く行われた。NSAIDs は大腸腫瘍の予防効果は認められたものの消化管出血や心血管疾患のリスクを上げてしまうことが後に判明し、予防法としては確立していない(Cancer Prev Res. 2008)。低用量アスピリンは大腸腺腫の発生を減らす効果は複数の論文で報告されているが(N Engl J Med. 2003 6;348(10):891-9. Gut. 2014 ;63(11):1755-9) 単独での効果はそれほど強くなく、また抗血小板作用を有するため万人に対して推奨できるという位置づけにはまだなっていない。そのため、化学予防の確立のために新規薬剤の開発や既存薬剤のドラッグリポジショニングが必要とされている。化学予防薬は抗がん剤と違い、ほぼ健康な人に長期間投与することになるため、何より安全性が重要であるが、ドラッグリポジショニングでは薬剤の安全性データが揃っていないことが多いため、安全性試験という薬剤開発でもっとも時間とコストがかかる部分を省略できるというメリットがある。

糖尿病の治療薬のひとつであるメトホルミンは 1920 年代に合成された非常に歴史のある薬であるが、近年、糖尿病患者で服用者は非服用者と比較して癌の発生が低いという報告が複数ある。我々は、このメトホルミンに注目し、大腸癌がんモデルマウスに対し、メトホルミンは AMP activated kinase (AMPK)を介し大腸癌に対し抑制的に働くことを動物実験で証明した(Cancer Sci. 2008;99(11):2136-41, Molecular Carcinogenesis. 2010;49(7):662-671)。これらの知見をもとに、メトホルミンの化学予防研究の集大成として大腸ポリープ(腺腫や早期癌)を内視鏡切除した患者を対象にメトホルミンとプラセボを用いた RCT を実施し 1 年間の介入で新規病変の出現をどれくらい抑制できるかを検証する第 3 相試験を行った。メトホルミンを用いた大腸腫瘍の化学予防の臨床試験は世界で初であり、その取り組みは国内、世界で高い評価を受け、新聞にも取り

上げられた(Higurashi T, et al. Lancet Oncol. 2016;17(4):475-83)。

しかし、本研究の弱点としては、プロジェクトの計画から結果まで多くの時間と労力、コストを要したことがあげられる。さらに用量反応試験や、メトホルミンが大腸の carcinogenesis においてどの段階でどのように作用しているのかなどの詳細な機序解析は臨床試験において検証することは限界があり、これまで行っていない。これまでの癌研究は、ヒト大腸癌の組織サンプルから遺伝子を抽出し解析を行うものが中心であり、その遺伝子を大腸癌細胞株に knock in/knock down し機能解析を行っていたが、大腸癌細胞株は既に様々な異常が起きている細胞であり、実際の臨床における大腸癌を反映しておらず十分な検討ができていない状況であった。

我々はこの課題を克服するために、新規培養技術であるオルガノイドに着目し、メトホルミンによる大腸腫瘍予防の詳細な機序解明のための実験を計画した。オルガノイドは 2009 年にオランダ Hubercht 研究所 Hans Clevers 教授、慶応大学 佐藤俊朗教授らのグループにより開発された新しい培養技術で、EGF や R-spondin といった幹細胞に必要な様々な増殖因子を培養液に補い立体培養することで生体内の組織と類似した構造を体外で形成させる技術である。この技術を用いて、ヒトから採取した正常上皮、腺腫、Sessile serrated adenoma/polyp (SSA/P)、大腸癌からオルガノイドを作成し、そこにメトホルミンを投与し、発癌のどの段階でどのような機序で化学予防効果を発揮するのかを解明する。まずはメトホルミンを入口としてオルガノイドによる大腸腫瘍化学予防の機序解明の実験系を確立させ、その後、これまで数多くの報告のあるアスピリンやメトホルミン+アスピリンなどに解析対象を広げていくことにより、これまでに多く報告があるものの、予防機序やその効果のエビデンスがまだ低い薬剤へと応用し、多種多様な候補薬に対して、スクリーニング的に化学予防効果を検証していくことができる。

オルガノイドを用いて大腸の各発癌過程における薬剤の化学予防効果を検討する研究はこれまでになく、非常に革新的であり、本システムが確立できた際にはドラッグリポジショニングにつなげることができ、メトホルミン以外の種々の薬剤の予防効果の検討が詳細かつ迅速にできるようになりその意義は大きい。

### 3. 研究の方法

本研究では、ヒトより採取した正常上皮、腺腫、SSA/P、大腸癌より作成したオルガノイドをマトリゲルに培養し、まずメトホルミンを positive control として投与実験を行い、細胞増殖スピード、細胞増殖マーカー、遺伝子発現、蛋白のリン酸化などを解析し、各発癌過程における網羅的な解析システムを確立させる。続いて、オルガノイドをマウスに移植する xenograft model を作成し、更にその効果を in vivo で確認する。

続いて、このオルガノイドを用いた大腸腫瘍化学予防効果の網羅的解析システムを用いて、これまで比較のエビデンスの多いアスピリンでも同様の実験を行いメトホルミンとの予防効果を比較したり、メトホルミン単独に対して、アスピリン+メトホルミンを併用することによる効果なども検討する。さらに多種多様な候補薬にまで対象を拡大させて、臨床応用可能な薬剤のスクリーニングを行いたい。

#### < 研究計画 2018 年度 >

ヒトから採取した大腸正常上皮、大腸腺腫、SSA/P、大腸癌からのオルガノイドを作成し、マトリゲル中で 継代培養、増殖因子投与、メトホルミン投与の条件で増殖スピード、細胞増殖マーカー、蛋白/遺伝子発現を免疫組織学的、生化学的に解析を行う。続いて、作成したオルガノイドを用いて xenograft model を作成し、メトホルミンを腫瘍を移植したマウスに経口投与し in vivo での解析も行う。これらを通して、オルガノイドを用いた大腸腫瘍化学予防効果の網羅的解析システムの確立を目指す。本検討は横浜市立大学肝胆膵消化器病学大学院生松浦哲也先生

を協力研究者として行う。

< 2019 年度以降 >

2018 年度の計画に引き続いてオルガノイドを用いた大腸腫瘍化学予防効果の網羅的解析システムの確立を行う。解析システムが確立したら、アスピリンやメトホルミンとアスピリンとの組み合わせ、多種多様な候補薬に対して本システムを用いてスクリーニングを行い、臨床応用への糸口を導き出す。

#### 4 . 研究成果

ヒト由来の大腸オルガノイド（正常上皮、大腸腺腫、SSA/P、大腸癌）の樹立に成功し、大腸癌の発癌過程のオルガノイドバンクの作成を行った。さらにオルガノイドをヌードマウスの皮下に移植し vivo 解析も行う実験手技を確立した。大腸腫瘍化学予防効果が報告されているアスピリンおよびメトホルミンを用いて抗腫瘍効果を検討する実験を行ったところ、両剤を併用することにより synergy 効果を発揮し、より強力な予防効果を示した。現在はその機序について詳細な解析を行い、更に Xenograft model で vivo における抗腫瘍効果の発現について解析を行っている。

#### 論文発表

1. Kato S, Fushimi K, Yabuki Y, Maru Y, Hasegawa S, Matsuura T, Kurotaki D, Suzuki A, Kobayashi N, Yoneda M, Higurashi T, Enaka M, Tamura T, Hippo Y, Nakajima A. Precision modeling of gall bladder cancer patients in mice based on orthotopic implantation of organoid-derived tumor buds. *Oncogenesis*. 2021;10(4):33
2. Tachikawa J, Chiba H, Okada N, Arimoto J, Ashikari K, Kuwabara H, Nakaoka M, Higurashi T, Goto T, Nakajima A. Impact of obesity in colorectal endoscopic submucosal dissection: single-center retrospective cohort study. *BMC Gastroenterol*. 2021;21(1):74.
3. Tanabe H, Higurashi T, Takatsu T, Misawa N, Yoshihara T, Goto S, Arimoto J, Ashikari K, Taniguchi L, Chiba H, Nakajima A. Effects of colorectal endoscopic submucosal dissection on postoperative abdominal symptoms: a prospective observational study. *Surg Endosc*. 2021 Jan 27. doi: 10.1007/s00464-020-08278-w. Epub ahead of print.
4. Higurashi T, Arimoto J, Ashikari K, Takatsu T, Misawa N, Yoshihara T, Matsuura T, Fuyuki A, Ohkubo H, Nakajima A. The efficacy of a leukotriene receptor antagonist in the treatment of human rectal aberrant crypt foci: a nonrandomized, open-label, controlled trial. *BMC Cancer*. 2020;20(1):770
5. Arimoto J, Chiba H, Ashikari K, Fukui R, Tachikawa J, Suto T, Kawano N, Niikura T, Kuwabara H, Nakaoka M, Ida T, Higurashi T, Goto T, Nakajima A. Safety and efficacy of cold snare polypectomy for pedunculated (Ip) polyps measuring less than 10 mm in diameter. *Int J Colorectal Dis*. 2020 May;35(5):859-867. doi: 10.1007/s00384-020-03547-5.
6. Higurashi T, Arimoto J, Ashikari K, Takatsu T, Misawa N, Yoshihara T, Matsuura T, Fuyuki A, Ohkubo H, Nakajima A. The efficacy of aspirin and metformin combination therapy in patients with rectal aberrant crypt foci: a double-blinded randomized controlled trial. *BMC Cancer*. 2020 Oct 29;20(1):1043. doi: 10.1186/s12885-020-07564-z.

## 5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計8件（うち査読付論文 8件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 5件）

|   |                           |
|---|---------------------------|
| 1. 著者名<br>Umezawa Shotaro, Higurashi Takuma, Komiya Yasuhiko, Arimoto Jun, Horita Nobuyuki, Kaneko Takeshi, Iwasaki Motoki, Nakagama Hitoshi, Nakajima Atsushi  | 4. 巻<br>110               |
| 2. 論文標題<br>Chemoprevention of colorectal cancer: Past, present, and future  | 5. 発行年<br>2019年           |
| 3. 雑誌名<br>Cancer Science  | 6. 最初と最後の頁<br>3018 ~ 3026 |
| 掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子)<br>10.1111/cas.14149   | 査読の有無<br>有                |
| オープンアクセス<br>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<br>-                 |
| 1. 著者名<br>Arimoto Jun, Chiba Hideyuki, Higurashi Takuma, Fukui Ryo, Tachikawa Jun, Misawa Noboru, Ashikari Keiichi, Niikura Toshihiro, Kuwabara Hiroki, Nakaoka Michiko, Goto Tohru, Nakajima Atsushi                             | 4. 巻<br>34                |
| 2. 論文標題<br>Risk factors for incomplete polyp resection after cold snare polypectomy   | 5. 発行年<br>2019年           |
| 3. 雑誌名<br>International Journal of Colorectal Disease   | 6. 最初と最後の頁<br>1563 ~ 1569 |
| 掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子)<br>10.1007/s00384-019-03347-6  | 査読の有無<br>有                |
| オープンアクセス<br>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<br>-                 |
| 1. 著者名<br>Ohkubo Hidenori, Yoshihara Tsutomu, Misawa Noboru, Ashikari Keiichi, Fuyuki Akiko, Matsuura Tetsuya, Higurashi Takuma, Imajo Kento, Hosono Kunihiro, Yoneda Masato, Kobayashi Noritoshi, Saito Satoru, Nakajima Atsushi | 4. 巻<br>102               |
| 2. 論文標題<br>Relationship between Stool Form and Quality of Life in Patients with Chronic Constipation: An Internet Questionnaire Survey  | 5. 発行年<br>2019年           |
| 3. 雑誌名<br>Digestion   | 6. 最初と最後の頁<br>147-154     |
| 掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子)<br>10.1159/000502815   | 査読の有無<br>有                |
| オープンアクセス<br>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<br>-                 |
| 1. 著者名<br>Komiya Yasuhiko, Shimomura Yumi, Higurashi Takuma, Sugi Yutaka, Arimoto Jun, Umezawa Shotaro, Uchiyama Shiori, Matsumoto Mitsuharu, Nakajima Atsushi  | 4. 巻<br>68                |
| 2. 論文標題<br>Patients with colorectal cancer have identical strains of Fusobacterium nucleatum in their colorectal cancer and oral cavity   | 5. 発行年<br>2018年           |
| 3. 雑誌名<br>Gut   | 6. 最初と最後の頁<br>316661      |
| 掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子)<br>10.1136/gutjnl-2018-316661  | 査読の有無<br>有                |
| オープンアクセス<br>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<br>-                 |

|  |                   |
|--|-------------------|
| 1. 著者名<br>Higurashi Takuma, Nakajima Atsushi         | 4. 巻<br>9         |
| 2. 論文標題<br>Metformin and Colorectal Cancer           | 5. 発行年<br>2018年   |
| 3. 雑誌名<br>Frontiers in Endocrinology                 | 6. 最初と最後の頁<br>622 |
| 掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子)<br>10.3389/fendo.2018.00622 | 査読の有無<br>有        |
| オープンアクセス<br>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<br>-         |

|  |                  |
|--|------------------|
| 1. 著者名<br>Kato Shingo, Fushimi Kentaro, Yabuki Yuichiro, Maru Yoshiaki, Hasegawa Sho, Matsuura Tetsuya, Kurotaki Daisuke, Suzuki Akihiro, Kobayashi Noritoshi, Yoneda Masato, Higurashi Takuma, Enaka Makiko, Tamura Tomohiko, Hippo Yoshitaka, Nakajima Atsushi | 4. 巻<br>10       |
| 2. 論文標題<br>Precision modeling of gall bladder cancer patients in mice based on orthotopic implantation of organoid-derived tumor buds  | 5. 発行年<br>2021年  |
| 3. 雑誌名<br>Oncogenesis  | 6. 最初と最後の頁<br>33 |
| 掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子)<br>10.1038/s41389-021-00322-1   | 査読の有無<br>有       |
| オープンアクセス<br>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<br>-        |

|  |                    |
|--|--------------------|
| 1. 著者名<br>Higurashi Takuma, Arimoto Jun, Ashikari Keiichi, Takatsu Tomohiro, Misawa Noboru, Yoshihara Tsutomu, Matsuura Tetsuya, Fuyuki Akiko, Ohkubo Hidenori, Nakajima Atsushi | 4. 巻<br>20         |
| 2. 論文標題<br>The efficacy of aspirin and metformin combination therapy in patients with rectal aberrant crypt foci: a double-blinded randomized controlled trial                   | 5. 発行年<br>2020年    |
| 3. 雑誌名<br>BMC Cancer   | 6. 最初と最後の頁<br>1043 |
| 掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子)<br>10.1186/s12885-020-07564-z   | 査読の有無<br>有         |
| オープンアクセス<br>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<br>-          |

|  |                   |
|--|-------------------|
| 1. 著者名<br>Higurashi Takuma, Arimoto Jun, Ashikari Keiichi, Takatsu Tomohiro, Misawa Noboru, Yoshihara Tsutomu, Matsuura Tetsuya, Fuyuki Akiko, Ohkubo Hidenori, Nakajima Atsushi | 4. 巻<br>20        |
| 2. 論文標題<br>The efficacy of a leukotriene receptor antagonist in the treatment of human rectal aberrant crypt foci: a nonrandomized, open-label, controlled trial                 | 5. 発行年<br>2020年   |
| 3. 雑誌名<br>BMC Cancer   | 6. 最初と最後の頁<br>770 |
| 掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子)<br>10.1186/s12885-020-07266-6   | 査読の有無<br>有        |
| オープンアクセス<br>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<br>-         |

〔学会発表〕 計2件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 1件）

|  |
|--|
| 1. 発表者名<br>日暮琢磨、松浦哲也、加藤真吾、中島淳                  |
| 2. 発表標題<br>アスピリンとメトホルミンの組み合わせによる大腸腫瘍の化学予防効果の検討 |
| 3. 学会等名<br>第77回日本癌学会学術総会                       |
| 4. 発表年<br>2018年                                |

|  |
|--|
| 1. 発表者名<br>Higurashi T, Matsuura T, Kato S, Nakajima A   |
| 2. 発表標題<br>THE CHEMOPREVENTIVE EFFECT OF COMBINATION TREATMENT OF ASPIRIN AND METFORMIN FOR COLORECTAL CARCINOGENESIS. |
| 3. 学会等名<br>UEGW2018（国際学会）  |
| 4. 発表年<br>2018年  |

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

| 氏名<br>(ローマ字氏名)<br>(研究者番号) | 所属研究機関・部局・職<br>(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 |
|---------|---------|
|---------|---------|