

令和 3 年 6 月 17 日現在

機関番号：15401

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2018～2020

課題番号：18K08694

研究課題名(和文)大腸癌のサブクラス分類に対応するマウスモデルとオルガノイドの確立とその臨床応用

研究課題名(英文) Establishment of mouse models and organoids corresponding to colorectal cancer molecular subtypes and their clinical application

研究代表者

檜井 孝夫 (Hinoi, Takao)

広島大学・病院(医)・特任教授

研究者番号：10444689

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)：大腸癌のサブクラス分類としてMolecular Consensus Subtype (MCS) の1-4型があり臨床像や治療法が異なる。私共は各CMS分類を再現する新規大腸癌マウスモデルを作製しており、これまでCMS1とCMS2を確立した。本研究では、CMS3とCMS4モデルを確立する目的で、Kras変異型、Braf変異型マウスの腫瘍をKras/Braf野生型マウスの腫瘍と比較したところGreb1がKRAS-BRAF経路の新規標的遺伝子として同定された。またCMS4モデルがPten欠損マウスで作製され、オルガノイドでもCMS4の形質が保たれており、有用なマウスモデルであることが示唆された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

大腸癌は罹患数が最も多い癌であり女性の癌死亡の第1位であり対策が急務である。大腸癌の臨床像や治療法を4つ亜型(サブタイプ)に分類したMolecular Consensus Subtype (MCS) の1-4型が欧米でも採用されつつある。私共は各CMS分類を再現する新規大腸癌マウスモデルを作製しており、これまでCMS1とCMS2を確立した。本研究では、治療抵抗性のCMS3とCMS4モデルを確立した。CMS3モデルではGreb1が新規治療標的として同定された。CMS4モデルでも、腫瘍の特性や治療法の検索が可能となった。これらのマウスモデルは大腸癌の基礎研究や新規治療法の探索に有用と思われる。

研究成果の概要(英文)：Consensus molecular subtypes(CMS) is the new colorectal cancer classification system based on gene expression profiles. Previously, we generated CMS1 mouse model characterized by MSI-high and CMS2 model characterized by CIN phenotype. In this study we generated GEMMs which recapitulate CMS3 (the metabolic phenotype) model characterized by the dysregulation of metabolic pathways with the activation of KRAS pathway and CMS4(mesenchymal subtype) model. In CMS3 model, we studied colonic neoplasia that has KrasG122V/BrafV600E mutation with Apc inactivation and compared gene expression profiles among Kras/Braf WT, Kras-mutated, and Braf-mutated mouse colon tumors to seek new molecular targets corresponding to the KRAS-BRAF-MAPK axis. We found Greb1 was the most upregulated gene in Braf-mutated tumors, suggesting the potential target of Wnt and RAS signaling pathway. We also established GEMM mouse with CMS4 subtypes and organoids, indicating the phenotype of CMS4 with promoted carcinogenesis.

研究分野：消化器癌の分子腫瘍学

キーワード：大腸癌のマウスモデル 大腸癌のサブタイプ分類 分子腫瘍学 FAP RASシグナル伝達

1. 研究開始当初の背景

近年、欧米の6つグループの大腸癌遺伝子発現プロファイル解析を統合して大腸癌を4つのサブタイプに分類した Consensus Molecular Subtype(CMS) 分類が報告された (*Nature Medicine* 21, 1350-1356 2015)。私共はこれまでに家族性大腸腺腫症の原因遺伝子 *Apc* 欠損をベースとしてがん遺伝子 *Kras* など様々なドライバー遺伝子異常をもったマウスモデルを作製し報告してきた。これらは腫瘍発生におけるゲノム不安定性やその形態、浸潤能、予後などから複数の phenotype に分類可能で、それに対応したヒトの大腸癌のサブタイプが存在することが想定された。そのような状況下、欧米を中心としたデータベースを統合して4つの亜型に分類した Consensus Molecular Subtype (CMS) 分類が報告され、これらの特徴に一致した各マウスモデルから腫瘍細胞の転写産物、病理検体を回収して、同時にオルガノイドを作製することで、ヒトの CMS に対応するマウスモデルとオルガノイドの実験系の確立することとした。これにより、各サブクラスに対する薬剤のスクリーニングに有用なライブラリーシステムの構築が可能となる。

2. 研究の目的

大腸上皮細胞に特異的に遺伝子発現しているホメオボックス転写因子 *CDX2* 遺伝子のプロモーター領域 9.5kb を利用した大腸上皮特異的 Cre マウス(CPC)および MSI 発現誘導型 Cre マウス(CDX2P-G22)は私共が独自で開発し、複合的遺伝子改変マウスモデルでは高度浸潤癌や粘液癌など CMS 分類に対応した腫瘍が発生するモデルが確立している。オルガノイドは、ヒトの組織から三次元培養が可能な新しいツールであり、マウス大腸癌モデルから作成したものはまだ無い。遺伝子発現パターンによって4つの亜型、すなわち、マイクロサテライト不安定性により遺伝子変異を多数持つ CMS1(MSI 型)、APC 変異から発症した高分化型の CMS2(Canonical, 上皮系)、RAS-RAF-MAPK シグナル系に変異があり、増殖速度が早い CMS3(Metabolic, 上皮系胃型)、TGF シグナル系に変異があり浸潤傾向の強い CMS4 (間葉系、浸潤癌) に分類できる事が報告された。

私共のマウスモデルでは、腫瘍の増大、進展の継時的な観察が可能であり、遺伝子発現プロファイルを網羅的に解析することで、サブタイプに関連した分子マーカーの同定が可能となる。私共は既に CMS2, CMS3(*Kras* 変異型), CMS4(*TgfbRII* 変異型)と考えられる新規性、再現性が高い3種類のマウスモデルを作製してきた。マウスモデルでは微小環境や免疫系が維持された条件下で自然発生することから浸潤や EMT、免疫治療に関連した他の癌研究にも波及効果がある。これらのモデルから作製されるオルガノイドは継代・培養が可能で、汎用性が高く動物実験の代替となる。CMS 分類に対応したマウスモデルによるオルガノイド・ライブラリーの構築と分子マーカーの同定は、今後、開発が加速してくる分子標的薬に対するトランスレーショナル・リサーチにおいて、非常に有用な動物実験モデル・*in vitro* 実験系(オルガノイド)が構築され、個別化医療を急速に推進する新しい治療戦略が可能となる。

3. 研究の方法

- 1) CMS マウスモデルの作製：私共はこれまでに胎生期からの遺伝子改変により高分化型(CMS2)、高度浸潤型(CMS4)、MSI-粘膜癌型(CMS1)の形態をもつマウスモデルを確立した。これらの腫瘍細胞から転写産物、病理検体、オルガノイドを作製する。
- 2) CMS 分類の分子マーカーの同定：回収した転写産物の発現プロファイルの比較を網羅的遺伝子発現解析用の DNA チップ (affymetrix の Mouse Gene 1.0 ST Array、28,853 gene) を用いて解析する。CMS 分類の各サブタイプのマウスで、形態変化をもたらす可能性のある分子マーカー

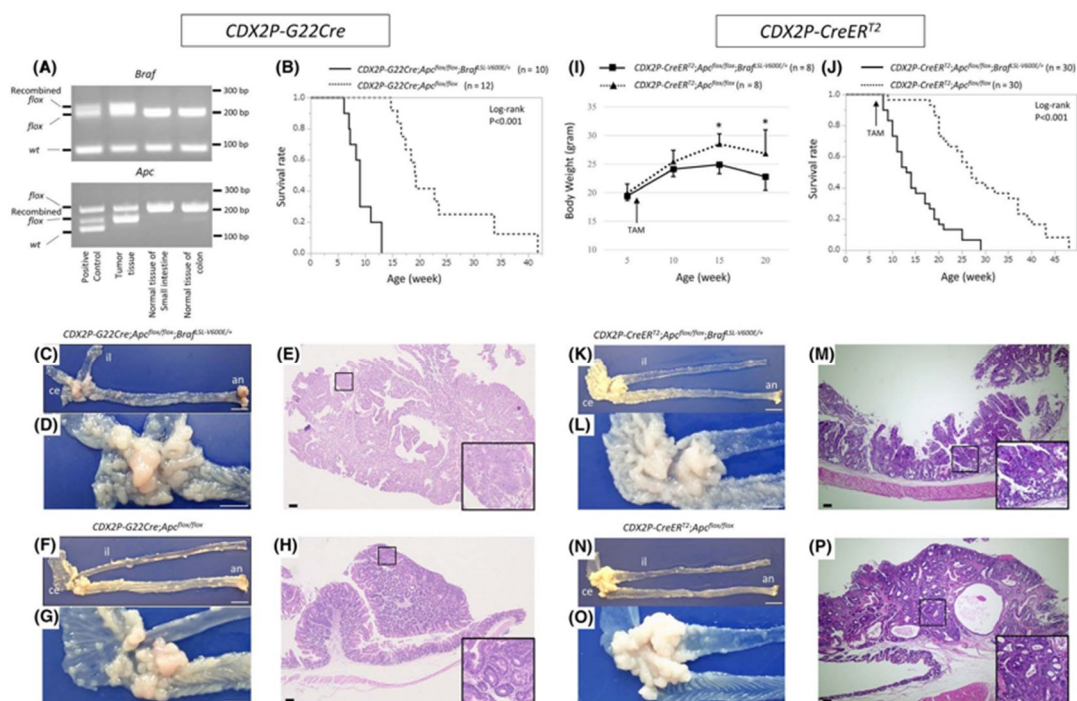
の候補遺伝子(約 10-20 個前後)を 50 個前後 *in silico* 解析で選択し、さらに quantitative PCR 法で 20 個前後まで絞り込み、Western blot 法や免疫組織染色で分子の局在と形態変化の相関を検証し、最終的には分子マーカーの候補遺伝子を各サブタイプごとに 10 個程度まで絞り込む。

3) オルガノイドの作製と *in vitro* 実験系の確立: 動物実験が困難な研究室でも形態変化についての三次元細胞培養ができるよう CMS 分類の各サブタイプにおけるオルガノイド・ライブラリーを作製する。転写産物、蛋白質を回収し、元の癌組織の発現プロファイルを再現していることを quantitative PCR 法ならびに Western blot 法で確認する。次に、オルガノイドを使って、CMS 分類の各サブタイプで薬剤スクリーニングのモデルを確立する。

4. 研究成果

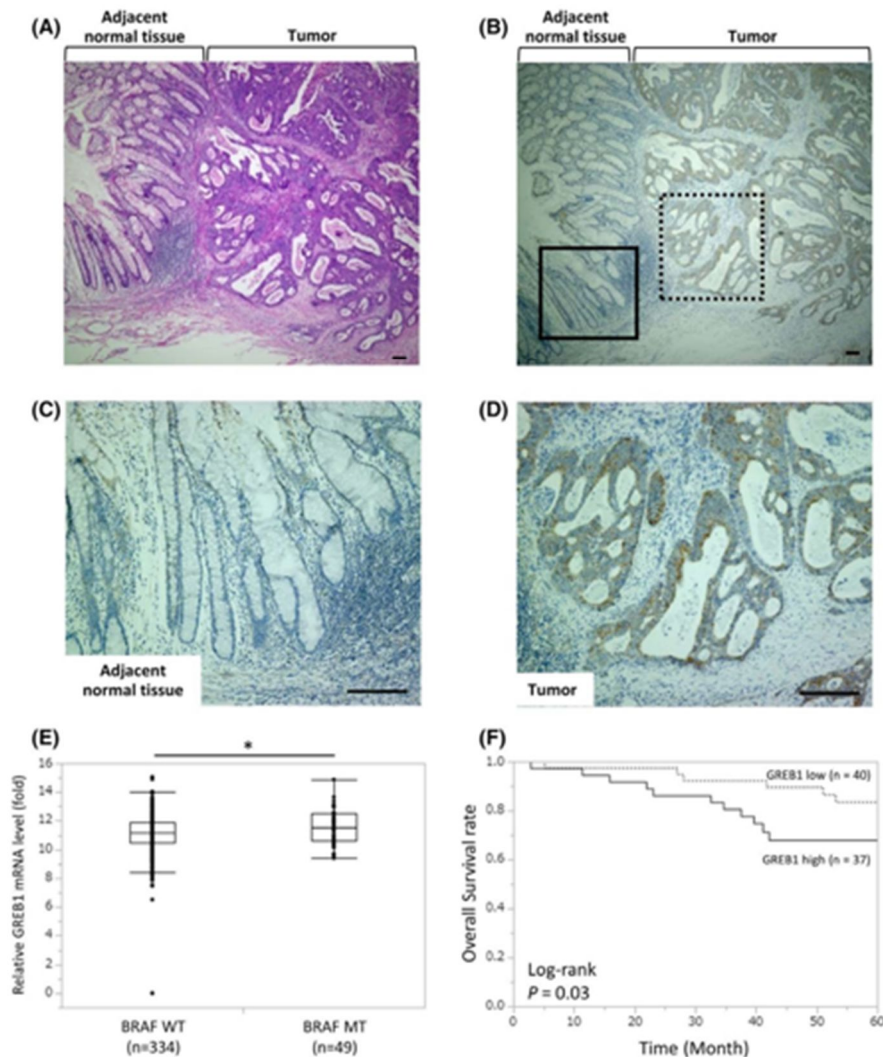
1) KRAS-BRAF axis による MAPK pathway は GREB1 を介して悪性度が高まる

Apc 欠損に *Kras* あるいは *Braf* を活性化した二つのマウスモデルを作成し、変異型 *Kras*, 変異型 *Braf* の発現により腫瘍が悪性化することを確認した(下図)。



二種類のマウスで得られた腫瘍をコントロールマウス(*Apc*変異型)の腫瘍と比較し、両方のマウスに共通して遺伝子発現が上昇している遺伝子群(Upreregulated genes)、ならびに低下している遺伝子群(Downregulated genes)を探索し、データを重ね合わせて候補遺伝子群に絞った。最も、発現が上昇している遺伝子としてGREB1が指摘され、ヒト大腸癌でも検証したところ、*BRAF*変異型大腸癌で遺伝子発現量が高く、予後不良であることが確認された(下図)。

以上より、*KRAS-BRAF* axisによるMAPK pathwayの活性化したモデル(CMS3モデル)では、*Greb1*の標的分子として活性化しており、ヒトの*BRAF*変異型においてもGREB1の蛋白質発現が上昇しており、治療標的としての可能性が示唆された。



2) ヒト PTEN 欠損型大腸癌のマウス疾患モデルとして *Apc+Pten* 欠損マウスは有用である

*Apc+Pten*欠損マウス (CMS4モデル) で特異的はPhenotypeが出たため追加解析を行なった。腫瘍の新鮮凍結検体からマイクロダイセクション法で腫瘍部分と正常部分の組織由来のtRNAを抽出し、網羅的遺伝子発現解析用のDNAチップ (affymetrix) を用いて転写産物の発現プロファイルを比較した。KEGG C2 gene setを使ったGene Set Enrichment Analysis (GSEA)での解析では、*Pten*のヘテロでの欠失により、8つのpathwayが上昇し、28のpathwayが抑制されていた。これらマウスモデルから作製したオルガノイドについても、形態の観察ならびに分子マーカーの発現解析を *in vitro*実験系で確認を行っており、今後、抗がん剤のスクリーニングに応用可能が期待できる結果が得られつつある。

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 8件）

1. 著者名 Saito Y, Hinoi T, Adachi T, Miguchi M, Niitsu H, Kochi M, Sada H, Sotomaru Y, Sakamoto N, Sentani K, Oue N, Yasui W, Tashiro H, Ohdan H.	4. 巻 16
2. 論文標題 Synbiotics suppress colitis-induced tumorigenesis in a colon-specific cancer mouse model.	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 PLoS One	6. 最初と最後の頁 216393
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1371/journal.pone.0216393	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 Hattori Y, Sentani K, Shinmei S, Oo HZ, Hattori T, Imai T, Sekino Y, Sakamoto N, Oue N, Niitsu H, Hinoi T, Ohdan H, Yasui W	4. 巻 74
2. 論文標題 Clinicopathological significance of RCAN2 production in gastric carcinoma	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Histopathology	6. 最初と最後の頁 430-442
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1111/his.13764	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 T, Tanaka Y, Piao J, Tanimine N, Oue N, Hinoi T, Garcia NV, Miyasaka M, Matozaki T, Yasui W, Ohdan H.	4. 巻 2(6)
2. 論文標題 Signal regulatory protein alpha blockade potentiates tumoricidal effects of macrophages on gastroenterological neoplastic cells in syngeneic immunocompetent mice.	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Ann Gastroenterol Surg	6. 最初と最後の頁 451-462
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1002/ags3.12205	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 Karakuchi Nozomi, Shimomura Manabu, Toyota Kazuhiro, Hinoi Takao, Yamamoto Hideki, Sadamoto Seiji, Mandai Koichi, Egi Hiroyuki, Ohdan Hideki, Takahashi Tadateru	4. 巻 17
2. 論文標題 Spontaneous regression of transverse colon cancer with high-frequency microsatellite instability: a case report and literature review	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 World Journal of Surgical Oncology	6. 最初と最後の頁 1-6
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1186/s12957-018-1552-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 Kochi Masatoshi, Hinoi Takao, Niitsu Hiroaki, Miguchi Masashi, Saito Yasufumi, Sada Haruki, Sentani Kazuhiro, Sakamoto Naoya, Oue Naohide, Tashiro Hirotaka, Sotomaru Yusuke, Yasui Wataru, Ohdan Hideki	4. 巻 111
2. 論文標題 Oncogenic mutation in RAS RAF axis leads to increased expression of GREB1, resulting in tumor proliferation in colorectal cancer	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Cancer Science	6. 最初と最後の頁 3540 ~ 3549
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1111/cas.14558	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 Okimoto Sho, Tashiro Hirotaka, Iwako Hiroshi, Kuroda Shintaro, Kobayashi Tsuyoshi, Hinoi Takao, Ohdan Hideki	4. 巻 50
2. 論文標題 Antithrombin attenuates the progression of hepatocellular carcinoma by regulating neutrophil/interleukin 8 signaling	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Hepatology Research	6. 最初と最後の頁 1284 ~ 1296
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1111/hepr.13558	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 Akabane Shintaro, Hinoi Takao, Akagi Kiwamu, Yamamoto Hideki, Sada Haruki, Shimizu Yosuke, Shimizu Wataru, Sudo Takeshi, Onoe Takashi, Ishiyama Kohei, Suzuki Takahisa, Tazawa Hirofumi, Hadano Naoto, Misumi Toshihiro, Kojima Masato, Kubota Haruna, Taniyama Daiki, Kuraoka Kazuya, Tashiro Hirotaka	4. 巻 21
2. 論文標題 A case of Turcot's syndrome type 1 with loss of immunoexpression of MSH6 in colon cancer and liver metastasis due to secondary somatic mutation in coding mononucleotide (C)8 tract: a case report	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 BMC Medical Genetics	6. 最初と最後の頁 1-7
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1186/s12881-020-01079-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 Ukai Shoichi, Sakamoto Naoya, Taniyama Daiki, Harada Kenji, Honma Ririno, Maruyama Ryota, Naka Kazuhito, Hinoi Takao, Takakura Yuji, Shimizu Wataru, Ohdan Hideki, Yasui Wataru	4. 巻 112
2. 論文標題 KHDRBS3 promotes multi drug resistance and anchorage independent growth in colorectal cancer	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Cancer Science	6. 最初と最後の頁 1196 ~ 1208
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1111/cas.14805	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 1件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 檜井孝夫
2. 発表標題 Identification of novel colon cancer biomarkers by a new complex genetically modified mouse models
3. 学会等名 第74回 日本消化器外科学会総会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 檜井孝夫
2. 発表標題 大腸上皮特異的転写活性配列を応用した新規大腸癌発癌マウスモデルの確立と発癌関連遺伝子の機能解析
3. 学会等名 第28回 日本癌病態治療治療研究会（招待講演）
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 佐田春樹、檜井孝夫、坂本直也、仙谷和弘、大上直秀、安井弥、田代尊裕、大段秀樹
2. 発表標題 新規遺伝子改変大腸癌マウスモデルから確立したPtenハプロ不全型大腸癌オルガノイドの作成とその機能解析
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 Sada H, Hinoi T, Kochi M, Niitsu H, Ishikawa A, Sakamoto N, Sentani K, Oue N, Yasui W, Tashiro H, Ohdan H
2. 発表標題 The functional analysis of Pten haploinsufficient colon cancer derived from mouse model using organoids
3. 学会等名 第30回 日本消化器癌発生学会総会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Masatoshi Kochi, Takao Hinoi, Yasufumi Saito, Hiroaki Niitsu, Haruki Sada, Naoya Sakamoto, Kazuhiro Sentani, Naohide Oue, Wataru Yasui, Hideki Ohdan
2. 発表標題 BRAF mutation leads to increased expression of GeneX (GREB1) resulting in tumor proliferation in colorectal cancer
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 山田英孝、胡徳、石野佳子、太田力、岩泉守哉、檜井孝夫、櫻井晃洋、田中屋宏爾、織田信弥、古庄知己、菅野康吉、吉田輝彦、梶村春彦
2. 発表標題 日本人の遺伝性びまん性胃がんにおけるCDH1遺伝子生殖細胞系列変異
3. 学会等名 第79回日本癌学会学術総会
4. 発表年 2020年

〔図書〕 計1件

1. 著者名 大腸癌研究会遺伝性大腸癌診療ガイドライン作成委員会、石田 秀行、富田 尚裕、山口 達郎、田中屋宏爾、赤木 究、石川 秀樹、川崎 優子、隈元 謙介、下平 秀樹、関根 茂樹、高山 哲治、田中 敏明、田村和朗、田村智英子、千野 晶子、土井 悟、中島 健、中山 佳子、長谷川博俊、檜井 孝夫、平沢 晃、宮倉安幸	4. 発行年 2020年
2. 出版社 金原出版	5. 総ページ数 152
3. 書名 遺伝性大腸癌診療ガイドライン 2020年版	

〔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
---------	---------