

令和 2 年 6 月 26 日現在

機関番号：22701

研究種目：若手研究

研究期間：2018～2019

課題番号：18K15756

研究課題名(和文) ISXに着目したヒト胃オルガノイド発癌モデル作成と胃癌治療への応用

研究課題名(英文) Establishment of human gastric organoid carcinogenesis model and target therapy focusing on ISX

研究代表者

須江 聡一郎 (Sue, Soichiro)

横浜市立大学・附属病院・助教

研究者番号：00738619

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)：ヒト胃オルガノイドの培養を行い、作成したオルガノイドを用いて胃発癌モデルの作成を試みるとともにISX標的薬の探索を行った。オルガノイドはE-cadherinやカテニンの細胞膜での発現や、構造的にスフェロイド状の形態が凹凸を伴った構造になることを確認した。また胃マーカーHGMが内腔で陽性となっているオルガノイドを確認できた。オルガノイドのmRNA発現解析や蛍光免疫を用いた解析を、ISXや胃マーカー、腸上皮化生マーカーについて行えた。継代は可能であったが、長期継代が課題であることが明らかとなった。短期継代の系でISX標的薬の候補薬群を投与し、ISX発現などを確認することはできた。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究の目的はヒト胃オルガノイド発癌モデルを作成し、胃癌治療への応用につなげることである。本研究ではヒト胃オルガノイドを作成し短期間での継代培養に基づく実験が可能であることを明らかにした一方、期間内で長期培養の最適な条件をみつけることができず、ヒト胃オルガノイドの長期培養条件の検討が課題であることが明らかとなった。

研究成果の概要(英文)：Human gastric organoids were cultured. Organoid based carcinogenesis model were tried, and ISX targeting therapy were screened by using the cultured organoids. Expression of E-cadherin and catenin on the cell membrane lesion of the organoid, and spheroid form changed to the form with unevenness. HGM, gastric marker, was positive at lumen of the organoid. The expression of ISX, gastric marker, and intestinal metaplasia marker of the organoids were checked by the mRNA analysis and fluorescent immunostaining. Passage of the organoids were possible, but long term passage were difficult. ISX expression were checked for screening ISX targeting candidate drugs with the organoids.

研究分野：消化器内科

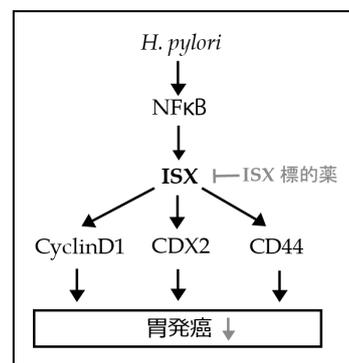
キーワード：オルガノイド 胃 ヒト ISX

様式 C-19、F-19-1、Z-19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

*H. pylori*感染は胃癌の主な原因であり、*H. pylori*はその種々の病原因子により宿主胃上皮細胞において様々な遺伝子変異・修飾を惹起すると共に(Cancer Genome Atlas, Nature, 2014)、NFκB シグナルを代表として慢性炎症に重要な様々なシグナルの活性化を誘導し発癌に参与しているが、結果生じる腸上皮化生と胃発癌の関係は解明されていなかった (Sue, BioMed Res Int, 2015)。その主な原因はこれまでの胃発癌研究がマウスモデルを用いたものであったことが挙げられる。特にヒトの *H. pylori* 感染胃炎での CDX2 の発現と腸上皮化生という現象はマウスでは *H. pylori* を用いて再現できないため、胃発癌モデルを作成しても「*H. pylori* による長期間の慢性炎症により腸上皮化生を引き起こし、胃発癌に至る」というヒトにおける経過のメカニズム解明と発癌を抑制する治療標的の開発や胃癌治療への応用に進んでこなかった。ヒト胃オルガノイド培養を用いた胃発癌モデルはこのような状況の解決策である。

私たちは胃発癌と腸上皮化生の関係を説明する分子 ISX を明らかとした。ISX は正常胃では発現していないが、*H. pylori* 感染に伴う慢性炎症シグナル NFκB を介して発現増加し、ISX の発現は CDX2 の発現を介して腸上皮化生に、CyclinD1 の発現を介して細胞増殖に、CD44 の発現を介して幹細胞化の維持にそれぞれ働いていることを示してきた (Sue, J Gastroenterol, 2016)。またマウスの MNU 胃発癌モデルを ISX ノックアウトマウスで行うと胃腫瘍の発生が有意に減少し、その効果は ISX の上流シグナルである NFκB ノックアウトマウスを用いた結果と同様であった (Sue, 2017, DDW oral presentation) ことから、ISX は NFκB の下流シグナルの中で特に胃発癌と関連が強い分子であることが示された。さらに *H. pylori* による ISX の発現はヒト胃の幹細胞レベルで



起こっており (Sue, 2017, JDDW シンポジウム)、ISX の幹細胞レベルでの発現が幹細胞レベルでの腸上皮化生を引き起こしていることが明らかとなった。一方で胃癌において ISX を強制発現すると xenograft モデルで増殖は亢進し、ノックダウンすると増殖は抑制された (右上図参照)。

H. pylori 感染し腸上皮化生を来している胃や、*H. pylori* 除菌後の胃など実際に臨床現場で遭遇する胃粘膜に、内視鏡を用いてアプローチし、これらの胃粘膜から作成したヒト胃オルガノイドを用いた胃発癌モデル作成と ISX 標的薬の効果が確認できれば、ISX に着目した個別化治療の開発につながることを期待された。

2. 研究の目的

H. pylori status や腸上皮化生の有無、ISX 発現に着目した様々な背景の胃粘膜を用いてヒト胃オルガノイド培養を行い、ヒト胃オルガノイド発癌モデルの作成すること、またヒト胃オルガノイド発癌モデルに対する ISX 標的候補薬の効果を検討することを目的とした。

3. 研究の方法

臨床研究として倫理委員会承認、同意取得に基づきヒト胃検体 (正常、*H. pylori* 感染胃炎、腸上皮化生、*H. pylori* 除菌後発癌胃粘膜) を取得した。Schlaermann et al. 2016 Gut を改変した方法でヒト胃オルガノイド培養を行った。継代を繰り返し長期培養を行う条件検討を行った。TNFα の投与による慢性炎症を模倣したモデル、MNU 投与による化学発癌モデル、Lentivirus ベクターを用いるモデルを試みた。

当初予定していたヒト胃オルガノイド発癌モデルを用いた検討が行えなかったため、ヒト胃オルガノイド培養を用いた ISX 標的候補薬の ISX 抑制効果を検討した。ISX 標的候補薬

は胃癌細胞株での阻害薬ライブラリー（80種類）を用いた検討でスクリーニングされたものを用いた。阻害薬ライブラリーを用いたスクリーニングは胃癌細胞株MKN45とMKN74を用いた。細胞株に阻害薬を投与し、コントロールと比べリアルタイムPCRでISXのmRNA発現やウェスタンブロッティングでISXの蛋白発現が低下している薬剤を探索した。

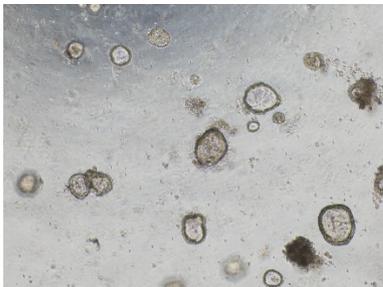
4. 研究成果

ヒト胃オルガノイド培養を様々な背景胃の検体に基づいて実施した。正常、*H. pylori*感染胃炎、腸上皮化生、*H. pylori*除菌後発癌胃粘膜について前庭部胃由来、体部胃由来で実施した。上記の中で*H. pylori*感染胃炎に関しては培養や継代の成功率が低い印象を受けた。このことは慢性炎症の存在下での培養条件は再検討が必要であることを示唆していると思われた。またTNF α 、MNU投与での長期培養は成功せず、同様に培養条件は再検討が必要であることが示唆された。Lentivirusベクターを用いた実験系についても施行したが、ベクター導入後の培養・継代の成功に至らなかった。これらの結果は、ヒト胃オルガノイドに介入を行った場合に培養・継代を行い長期培養を行っていく条件を再検討していく必要性を示唆している。

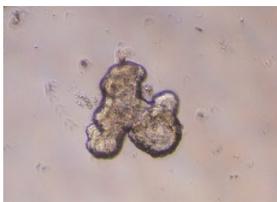
培養したオルガノイド（球状）の1例を以下に示す。



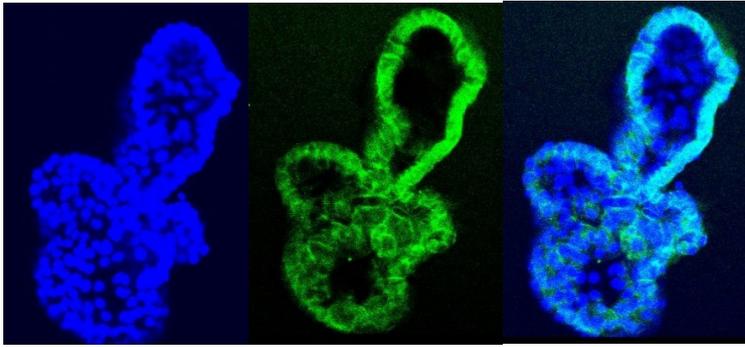
また継代したオルガノイド（球状）の1例を以下に示す。



さらに一部のヒト胃オルガノイドでは凹凸を伴った構造も確認された。



作成されたヒト胃オルガノイドは上皮マーカーのE-cadherinや分極マーカーの β カテニンの細胞膜での発現を確認した。さらに胃マーカーHGMが内腔で陽性となっているオルガノイドを確認できた。以下に凹凸を伴うヒト胃オルガノイドの蛍光免疫染色の1例を示す（DAPI(青), E-cadherin(緑), margeの順）。作成したヒト胃オルガノイドについてはmRNA発現や蛍光免疫染色での発現をISX、胃マーカー（MUC5AC, HGM, SOX2など）、腸上皮化生マーカー（CDX2, MUC2など）に関して行えた。これらの検討を引き続き継続することで知見の集積が期待できると考えた。



ヒト胃オルガノイドに対してTNF α を投与した群はコントロールのDMSO群に比べISX発現が増加していた。ISX標的候補薬として探索されたeverolimusを投与された群はISX発現がベースラインより低下し、TNF α とeverolimusを共に投与した群でもISX発現はベースラインより低下した。EverolimusはISX発現が確認されている胃癌細胞株MKN45とMKN74に対してISXのmRNA発現が低下しており、ウェスタンブロッティングでのISXの蛋白発現低下もMKN74において確認されたためISX標的候補薬として探索された。Everolimusの使用濃度はMKN74を用いた濃度検討の結果最も効果のあった濃度で使用した。ヒト胃オルガノイドを用いた実験系の有用性を短期の実験系で確認できた。今後長期の実験系で可能となればH. pyloriによる長期炎症に伴う胃発癌メカニズムの解明・胃発癌抑制治療の開発に寄与すると考えられ、ヒト胃オルガノイドの長期培養系の確立は非常に重要な課題であると思われた。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計0件

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