

令和 5 年 6 月 12 日現在

機関番号：35303

研究種目：基盤研究(C)（一般）

研究期間：2019～2022

課題番号：19K09205

研究課題名（和文）オルガノイド技術を用いた食道癌の幹細胞性を標的とする新規治療法の開発

研究課題名（英文）Development of a novel therapy targeting the stemness of esophageal cancer using organoid technology

研究代表者

羽井佐 実（Haisa, Minoru）

川崎医科大学・医学部・教授

研究者番号：70322229

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）：近年、食道癌の系統維持型癌遺伝子であるSOX2は癌幹細胞性の維持に必要であることが明らかになった。上記癌遺伝子SOX2に対するCRISPR interference (CRISPRi)は単独で食道扁平上皮癌患者より樹立したオルガノイドに対し有意な抗腫瘍効果は誘導できなかった。しかし、扁平上皮癌で増幅が見られ、発癌と増殖に関与するPIK3CAに対するCRISPRiを作製し、SOX2およびPIK3CAを同時抑制すると上記食道癌オルガノイドの増殖は抑制されることが明らかになった。

研究成果の学術的意義や社会的意義

世界では年間40万人が食道癌に罹患している。本研究は、食道扁平上皮癌における新しい抗腫瘍効果の誘導機序を提示しておりその学術的意義は大きい。食道癌オルガノイドライブラリの構築により、今後開発される治療薬の有効性や毒性評価など、癌ゲノム医療進展への波及効果も期待できる。

研究成果の概要（英文）：Recently, SOX2, a well-known lineage-specific oncogene in esophageal cancer, was required to maintain cancer stemness. CRISPR interference (CRISPRi) against SOX2, individually, failed to induce notable antitumor effects on patient-derived organoids of esophageal squamous cell carcinoma. Therefore, we generated CRISPRi against PIK3CA, which is amplified in squamous cell carcinoma and involved in carcinogenesis, and found that simultaneous inhibition of SOX2 and PIK3CA inhibited the growth of esophageal cancer organoids.

研究分野：消化器外科学

キーワード：食道癌 オルガノイド 癌幹細胞

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

非小細胞肺癌においては、その分子機構解明により、多くのドライバー変異が明らかとなり、EGFR 遺伝子変異肺癌や EML4-ALK 転座型肺癌に対する分子標的薬は治療に欠かせないモダリティとなっている。また大腸癌においても、抗 VEGF 抗体、抗 EGFR 抗体が患者予後を改善させている。一方で食道癌における有効な標的治療は未だ確立されていない。この中で我々は、食道および肺扁平上皮癌で増幅のみられる転写因子：SOX2 を抑制することで、癌の進展が阻害されることを明らかにした (Fukazawa, Haisa et al. Sci Rep. 6, 20113. 2016)。またゲノム編集技術を応用した CRISPR interference 法により、癌遺伝子 Np63 を抑制し、扁平上皮癌に抗腫瘍効果が誘導できることを報告した (Yoshida M, Yamatsuji, Naomoto et al. Oncotarget. 9, 29220-32 2018)。現在、癌の治療抵抗性の原因の一つに癌幹細胞の関与が考えられている。癌幹細胞は抗癌剤や放射線での根絶が難しく、さらにその高い造腫瘍性から再発の原因となるため、当該細胞への標的治療の開発が進められている。近年、上記 SOX2 および Np63 は癌における幹細胞性の維持に必要であることが明らかになった。またオルガノイド培養法の進歩により、これらの研究に必要な組織幹細胞や癌幹細胞の増殖と維持が可能となってきた。

2. 研究の目的

多種の扁平上皮癌において、染色体 3q 上の OncCassette (オンコカセット) と呼ばれる領域に増幅が見られ、ここにコードされる SOX2、TP63、PIK3CA や PTEN の異常が、その発生と進展に関与することが分かってきた (Cell 158, 929-44. 2014, Advances in Biological Regulation 60, 47e63 2016)。また、これらの遺伝子は癌の幹細胞性の維持に必要なことが分かってきた (Nature. 511, 246-50 2014, Sci Signal. 8, 2015, PLoS Biol. 14, e1002581. 2016, Nat Commun. 6, 10068. 2015)。近年、抗癌剤と放射線に抵抗性を持つ癌幹細胞を標的とする癌治療法が開発されてきている。本研究では、食道癌オルガノイドを作製し、その幹細胞性に関わる主要遺伝子が、癌の増殖や抗癌剤感受性にどのように関わるかを明らかにすることで、新しい標的治療法開発のための基礎的検討を行う。研究計画前半においてオルガノイドを用いた薬剤評価系を構築し、また樹立オルガノイドのライブラリ化を進める。

3. 研究の方法

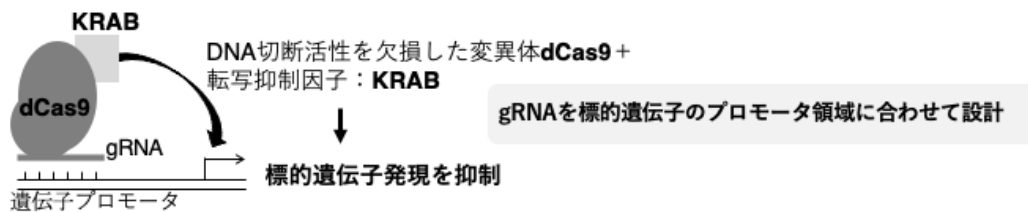
1. 食道癌オルガノイドの作製および至適培養条件の検討、ライブラリの作製

食道癌原発巣、再発・転移巣から細胞を単離したのち、マトリゲル内で3次元培養することで食道癌オルガノイドを作製する。正常組織のコンタミネーションを避けるために、MDM2 阻害剤であるNutlin-3aを培養液に添加し、癌オルガノイドのみの選定を行う (Cell. 161, 933-45. 2015)。また我々の標準プロトコールでの長期培養の困難な組織型、部位に対し、各種阻害剤と増殖因子を添加また置換することで、至適条件を検討する。さらにライブラリ作製の際、必要となる有効な凍結条件を決定する。また組織型、病理像病期、原発巣、再発および転移巣で類別した食道癌オルガノイドライブラリを作製し、将来の個別化医療開発のための基盤とする。

2. 食道癌オルガノイドの幹細胞性に対する標的療法の開発

ヒト食道癌オルガノイドにおいて、ゲノム編集技術: CRISPR interference (図1)を用い、幹細胞性に関わる遺伝子の発現を特異的に抑制することで、癌増殖を制御できるかどうかを、検討項目3で確立した方法にて評価した。

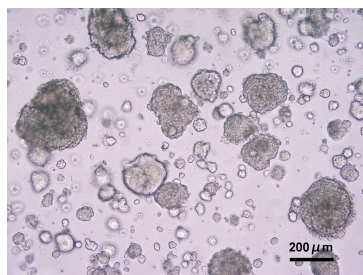
図1 ゲノム編集技術を応用した CRISPR interference



4 研究成果

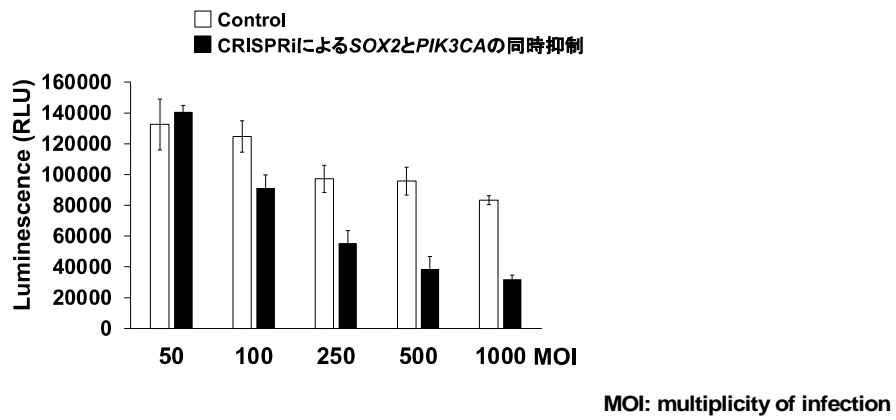
- a) 当院で手術を行った食道癌患者の切除検体を用い、患者由来のオルガノイドを新たに論文報告された複数の培養条件下で樹立を行った (Crit Rev Oncol Hematol. 2021 Jan;157:103190. doi: 10.1016/j.critrevonc.2020.103190.)。食道扁平上皮癌 (図2) また腺癌からの患者由来食道癌オルガノイドの樹立が可能であった。一方で、樹立効率を大きく向上させうる、増殖因子の道程には至らなかった。樹立オルガノイドの形態は、不整形、充実型であり、また免疫不全マウスへの皮下接種により作製した異種移植片の病理像は、原発巣を反映していた。現在、長期培養が可能な食道癌オルガノイドのライブラリーが構築されつつある。

図2 食道扁平上皮癌由来オルガノイドの1例



- b) CRISPR interference 発現型リコンビナント・アデノウイルスベクター感染後 72 時間での viability を細胞内 ATP の定量により測定した。食道癌細胞: TE-8 に対し、SOX2 に対する CRISPR interference が増殖抑制を誘導する一方で患者由来扁平上皮癌オルガノイドに対する有意な抗腫瘍効果は誘導されなかった。しかし、CRISPR interference を用いて SOX2 および PIK3CA 遺伝子を同時に抑制することで当該オルガノイドに増殖抑制が誘導された (図3)。

図 3



上記検討から、扁平上皮癌の発生と進展、そして幹細胞性に関する *SOX2*、*PIK3CA* を抑制することで当該癌腫に抗腫瘍効果を誘導できる可能性が示唆された。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計2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 Yokota Etsuko, Iwai Miki, Yukawa Takuro, Yoshida Masakazu, Naomoto Yoshio, Haisa Minoru, Monobe Yasumasa, Takigawa Nagio, Guo Minzhe, Maeda Yutaka, Fukazawa Takuya, Yamatsuji Tomoki	4. 巻 5
2. 論文標題 Clinical application of a lung cancer organoid (tumoroid) culture system	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 NPJ Precis Oncol	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/s41698-021-00166-3	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 深澤拓也	4. 巻 273
2. 論文標題 人工転写因子を用いた癌抑制技術開発	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 医学のあゆみ 第5土曜特集 ゲノム編集の未来	6. 最初と最後の頁 885-892
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） なし	査読の有無 無
オープンアクセス 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 -

〔学会発表〕 計4件（うち招待講演 1件/うち国際学会 0件）

1. 発表者名 深澤拓也, 横田悦子, 岩井美樹, 湯川拓郎, 羽井佐実, 瀧川奈義夫, 物部泰昌, 吉田将和, 前田豊, Minzhe Guo, 猶本良夫.
2. 発表標題 個別化医療のための切除肺癌組織由来オルガノイドの作製肺癌.
3. 学会等名 第38回 日本呼吸器外科学会学術集会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 深澤拓也, 横田悦子, 岩井美樹, 湯川拓郎, 吉田将和, 羽井佐実, 瀧川奈義夫, 猶本良夫, 前田豊, Minzhe Guo, 山辻知樹
2. 発表標題 肺癌オルガノイド培養システムの確立とその臨床応用.
3. 学会等名 第80回 日本癌学会学術総会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 深澤拓也, 横田悦子, 岩井美樹, 石田雄大, 湯川拓郎, 吉田将和, 羽井佐実, 瀧川奈義夫, 物部泰昌, 前田豊, Minzhe Guo, 山辻知樹.
2. 発表標題 肺癌オルガノイド樹立におけるFISH法を用いた核型解析の有用性
3. 学会等名 第62回 日本肺癌学会学術総会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 Fukazawa T, Yokota E, Sakuma T, Naomoto Y, Yamamoto T, Yamatsuji T
2. 発表標題 Suppression of cancer growth by transcriptional regulation based on gene editing technology
3. 学会等名 第79回日本癌学会学術総会 (招待講演)
4. 発表年 2020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	猶本 良夫 (Naomoto Yoshio) (00237190)	川崎医科大学・医学部・教授 (35303)	
研究分担者	深澤 拓也 (Fukazawa Takuya) (20379845)	川崎医科大学・医学部・准教授 (35303)	
研究分担者	山辻 知樹 (Yamatsuji Tomoki) (40379730)	川崎医科大学・医学部・教授 (35303)	

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