

令和 3 年 5 月 26 日現在

機関番号：17102

研究種目：若手研究

研究期間：2019～2020

課題番号：19K16775

研究課題名（和文）オルガノイド培養システムを用いた癌幹細胞の特性とオートファジー活性との関係性

研究課題名（英文）The relationship between cancer stem cell characteristics and autophagy activity using organoid culture system

研究代表者

笠木 勇太（KASAGI, Yuta）

九州大学・医学研究院・共同研究員

研究者番号：70838937

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）：食道基底細胞のサブクラス発現に炎症性サイトカインが影響すると考え、IL4、IL13、TNF、TGF β で刺激しオルガノイドを作成すると、サイトカインによって誘導される分画が変化することが分かった。さらに、TNF およびTGF β 刺激で幹細胞型をより強く誘導することを発見し、幹細胞の性質を有することも見出した。この結果を踏まえ、申請者らはそれぞれの細胞分画RNAシーケンスを施行、特徴的な因子を同定し各種追加検討を実施、その結果を学術論文にまとめ投稿、現在査読を受けている。

研究成果の学術的意義や社会的意義

食道癌幹細胞が異なる性質を持つ細胞集団であることを、オルガノイドを用いて証明したものは例がなく、世界に先駆けた先進的かつ多くの研究者が関心を示す研究である。さらに、申請者が注視しているCD73は新規免疫チェックポイント阻害剤の対象分子であり、その発現が癌幹細胞と相関があることを示せば、CD73阻害剤の抗腫瘍作用の解明に大いに貢献出来る。オートファジー阻害剤についても世界中で研究が行われているが未だ実用段階には至っておらず、本研究の成果はその開発の手助けとなる可能性がある。

研究成果の概要（英文）：We considered that inflammatory cytokines affect the subclass expression of esophageal basal cells, and stimulated with IL4, IL13, TNF β , and TGF β to create organoids, and we found that those cytokines induced different subclasses. Furthermore, we discovered that TNF β and TGF β stimulation induces stem cell types more strongly, and found that they have stem cell properties. Applicants performed each cell fractionation RNA sequence and identified characteristic factors. We had already conducted various additional studies and summarized the results in manuscript, and that are currently being peer-reviewed.

研究分野：消化器癌

キーワード：癌幹細胞 オルガノイド

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

悪性新生物の中で、食道癌は発生率・死亡率ともに減少の兆しは見られず、悪性度の高い癌種のひとつである。手術単独では根治が非常に難しく、抗癌剤や放射線治療などを組み合わせた集学的治療が行われているが、治療成績はいまだ満足できるものではない。近年の研究ではその治療抵抗性や転移・再発の原因として癌幹細胞の存在が重要視されている。

2. 研究の目的

癌幹細胞の特性について、オルガノイド培養システムを用い詳細に観察、その過程で重要な因子の特定を目的とした。

3. 研究の方法

オルガノイドを作成し、扁平上皮基底細胞マーカーと考えられている CD73 および Itg 4 発現のサブクラスをフローサイトメトリーで解析する。いくつかの異なった性質を持った細胞を有することが予測され、それぞれの細胞をソーティングし遺伝子発現についてシーケンスし、得られた因子について免疫染色、RT-PCR、western blot 等で追加評価を行う。また、オートファジー活性についても同等に評価する。

4. 研究成果

準備研究で示したように、ヒト食道上皮細胞株にてオルガノイドを作成(図 1.a 左)、DeWard AD らと同様に CD73 と Itg 4 の発現についてフローサイトメトリーにて解析すると、ヒト食道上皮においても幹細胞型 (CD73⁺/ Itg 4^{high})、中間型 (CD73⁻/ Itg 4^{high})、分化型 (CD73⁻/ Itg 4^{low}) の 3 つの細胞分画を有することを確認した(図 1.a)。さらにオートファジー活性の指標である CytoID を幹細胞型と中間型の分画について見てみると、幹細胞型で有意に CytoID 活性が高かった(図 1.b、*P<0.05)。

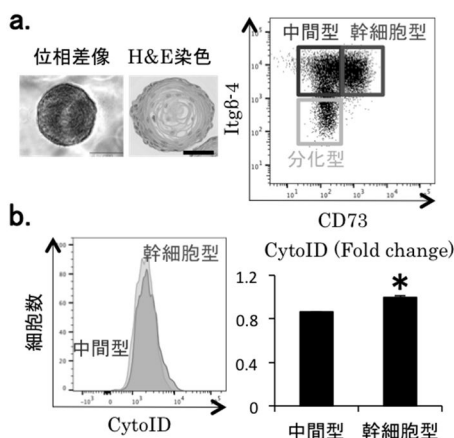


図 1. ヒト食道オルガノイド細胞分画とオートファジー活性

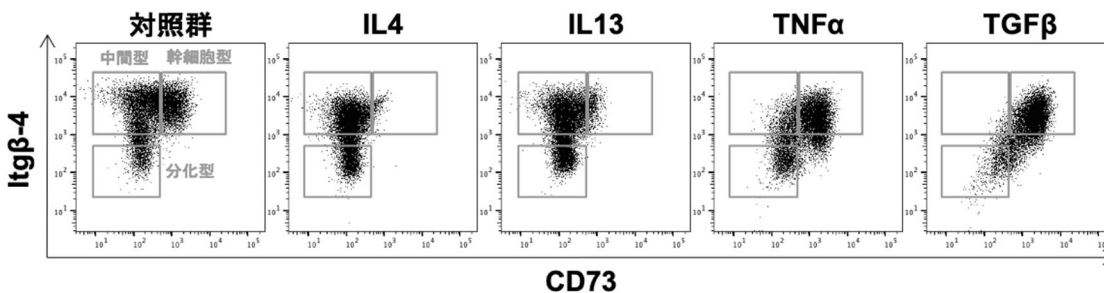


図 2. サイトカイン刺激による細胞分画の変化

その発現割合を定量すると、TNF および TGF による刺激で幹細胞型をより強く誘導することが分かり(図 3. NT: 対照群)、サイトカイン誘導したオルガノイドを継代すると、幹細胞型を多く誘導した TNF、TGF 刺激群でのオルガノイド形成率が高く、幹細胞の性質が強いことが分かった(図 4. Ctrl: 無刺激群)。

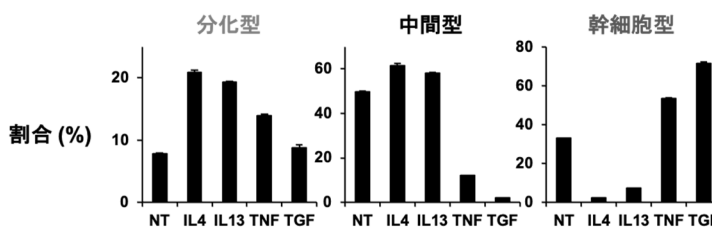


図 3. 分画細胞数の比較

この結果を踏まえ、それぞれの細胞分画をフローサイトメトリーでソートし、RNA シーケンスを施行した。申請者らはそれより得られた各分画に、特徴的な因子を同定しており、各種追加検討を実施済みである。その結果はすでに学术论文にまとめ投稿、現在査読を受けている。

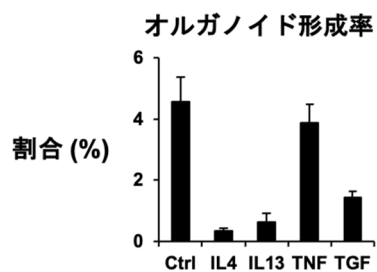


図 4. 継代培養オルガノイドの形成率

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計3件（うち査読付論文 3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 Kasagi Yuta, Natsugoe Keita, Aoyagi Takehiko, Nobutou Yoshinari, Tsujita Eiji, Ishida Mayumi, Kuma Sosei, Takizawa Katsumi, Uchiyama Hideaki	4. 巻 6
2. 論文標題 Validating the efficacy of interval appendectomy for acute appendicitis: representative three cases with different etiologies	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Surgical Case Reports	6. 最初と最後の頁 207
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1186/s40792-020-00971-1	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 Yuta Kasagi et al	4. 巻 -
2. 論文標題 Therapeutic strategies for obstructive colorectal cancer by retrospectively analyzing its clinicopathological characteristics.	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 -	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） なし	査読の有無 有
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 -

1. 著者名 Takeo Hara, Yuta Kasagi et al	4. 巻 -
2. 論文標題 CD73+ epithelial progenitor cells which contribute to homeostasis and renewal are depleted in eosinophilic esophagitis	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 -	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） なし	査読の有無 有
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2件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 笠木 勇太
2. 発表標題 特異的病態を伴う急性虫垂炎に対する待機手術の有用性
3. 学会等名 第120回日本外科学会定期学術集会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 笠木 勇太
2. 発表標題 閉塞症状を伴う大腸癌の臨床病理学的特徴と予後因子の検討
3. 学会等名 第121回日本外科学会定期学術集会
4. 発表年 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
---------------------------	-----------------------	----

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