

科学研究費助成事業 研究成果報告書

令和 3 年 6 月 2 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：19K17831

研究課題名(和文)染色体異常を起因としたヒト大腸がんの新規疾患モデルの確立

研究課題名(英文) Establishment of a new model for human colorectal cancers

研究代表者

磯部 大地 (Isobe, Taichi)

九州大学・医学研究院・助教

研究者番号：30838727

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)： バイオリソースから譲渡を受けたヒトiPS細胞株数種について核型解析を行い、正常核型のiPS細胞株を選定した。培養皿上で、組み換えタンパクや阻害薬を添加し、大腸オルガノイドへ分化させる条件について、至適条件を設定した。

正常核型のヒトiPS細胞に微小核細胞融合法を用いて、左側原発大腸がんで高頻度に認められる染色体異常を有するiPS細胞株を樹立し、in vitroで大腸へと分化させた。正常核型iPS細胞から分化させた大腸オルガノイドと同様に、染色体変異iPS細胞由来のオルガノイドは、間葉系細胞に囲まれた、内腔に粘液を持つ上皮様組織を構築し、一部に異型と考えられる構造を示した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

結腸直腸がんでは遺伝子変異のほかに染色体数の異常を、特に原発巣が肛門側に近い症例で高頻度に認める。大腸の発がんやがんの進行に染色体異常がどのように影響しているかを解明することにより、新しい治療法や予防法へとつながる可能性がある。

本研究では、染色体異常をもつ細胞を用いて作成した大腸組織の一部が、正常と比較すると異常と考えられる構造を示していたことから、新たな大腸発がんメカニズムを明らかにできる可能性がある。

研究成果の概要(英文)： Chromosomal Abnormality which frequently occurred in left-sided colorectal cancer was induced to normal karyotypic human iPS cells. Chromosome-induced iPS cells were differentiated into colon in vitro with recombinant protein and inhibitors. Colorectal organoids had digestive-track like structure surrounded by stroma and some part presented with atypia.

研究分野：がん

キーワード：がん 染色体 大腸 発がん 多能性幹細胞

1. 研究開始当初の背景

右側大腸と左側大腸では、胚からの発生段階で右側は中腸、左側は後腸からと原腸の異なる部位より発生し、さらに免疫学的環境や腸管内細菌叢が右側と左側で違う、など腫瘍の発生母地となる正常大腸の部位間の生物学的差異が注目されている (Lee GH, et al. *Eur J Surg Oncol.* 2015)。さらに大腸がんに対する薬物療法の結果解析から、臨床においても症例間の生物学的な違いが近年注目されるようになってきた。原発部位が独立した治療効果予測因子であることが示され、最新の治療ガイドラインにも反映された (Yoshino T, et al. *Ann Oncol.* 2018)。

発がんの原因となるゲノムの不安定性は、塩基配列の変異を主とするマイクロサテライト不安定性、染色体異常を主とする染色体不安定性に大別される。マイクロサテライト不安定性は主に右側原発大腸がんにも認められ、染色体不安定性は主に左側原発大腸がんにも認められる。このゲノム不安定性の違いは、原発部位による大腸がん予後の差の一因と考えられている。大腸がんの発がんメカニズム研究において、塩基配列変異を主題とした研究は数多く行われてきた。染色体変異については、ヒト細胞に染色体変異を導入することの技術的な制約(種間の差や導入の効率など)のため、大半の症例で染色体異常が認められるにも関わらず、染色体異常が大腸の発がんにどのように寄与するのか、直接的に示した報告は少ない。

一方、がんの特徴でもあり臨床上重要な形質のひとつに浸潤能が挙げられる。がん細胞が周囲組織へ浸潤し、他臓器への進展や遠隔転移を来し致命的な臓器障害を起こしうることから、がん細胞浸潤の詳細について明らかにする必要がある。その際、ヒト細胞から構成された組織を用いて *in vivo* で研究を行うのが理想的であるが、技術的・倫理的な障壁により、これまでは *in vitro* やマウスを用いた実験系に制約されていた。

染色体不安定性を原因とする大腸がんは、全症例の大半を占めることから、染色体異常による発がんメカニズムや、浸潤などのがん形質を詳細に明らかにすることは、大腸がん治療の成績向上には不可欠であり、そのためには臨床症例における病態をよりよく反映したモデルの確立が望まれる。

2. 研究の目的

本研究の目的は、1. 臨床症例をよりよく反映した新規がんモデルの確立し、2. 頻度の高い染色体異常が大腸がん発がんにどのように寄与するかを明らかにすることである。

2014年に米国 Cincinnati 小児病院の James Wells 博士の研究室より、マウス体内にヒト小腸モデルを作成できたとの報告があった (Watson CL, Et al. *Nature Med.* 2014)。ヒト多能性幹細胞から小腸オルガノイドを作成し、マウス腎皮膜下に移植し作成した小腸様組織は、上皮に加えて粘膜下組織や筋層からなる、まさに小さな小腸であり、それらを構成する細胞はヒト由来であった。さらに2017年に彼らはヒト大腸様組織の作成にも成功したことを報告した (Múnera JO, et al. *Cell Stem Cell.* 2017)。本研究では、染色体工学・遺伝子工学を用いて、ヒト大腸様組織作成技術のがんモデルへ応用を目指す。

3. 研究の方法

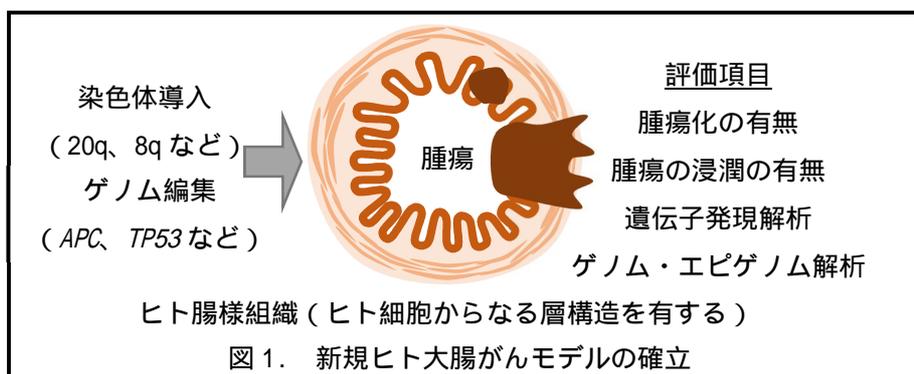
本研究で用いる多能性幹細胞は増殖能に優れ、組織由来初代細胞よりもゲノム操作、特に通常の導入技法では難しい染色体導入も容易となる。染色体導入では、遺伝子のみならず固有のプロモーター・エンハンサー配列も有し、遺伝子の発現は通常の転写調節を受ける。よって外来遺伝子導入のように無秩序な発現にならず、実際に染色体重複のある臨床症例に近い事象が観察可能となる。さらに、ヒトの本来の臓器に非常に酷似した大腸様組織を使ってがん研究を行うことは本研究の大きな特徴である。これによりがん細胞のヒト組織内への浸潤が、患者体内で起こっている病態に近い状態で観察可能となる。

Wells 博士らの2017年の報告通りにマウス腎皮膜下でヒト大腸様組織が作成する。細胞培養プレート上で Activin A などにより iPS 細胞から胚性中胚葉へと分化させ、WNT 刺激と FGF 添加により後腸内胚葉へと分化させる。後腸内胚葉を回収し、マトリゲル内に植え、EGF などを加えた培地で培養を継続し、継代を経て4週間で大腸オルガノイドを形成する。オルガノイドを免疫不全マウスの腎皮膜下に移植し、6週ほどで、ヒト由来の腸上皮細胞、平滑筋細胞、線維芽細胞などからなる大腸組織を形成する。

一方で、大腸様組織の素となる正常核型の iPS 細胞に微小核融合法を用いて染色体導入を行う。Gバンドで導入後の染色体数を確認する。染色体を導入した iPS 細胞を上記の方法を用いて、大腸オルガノイドを作成し、一部はマウス腎皮膜下に移植し大腸組織を形成させる。

正常核型の iPS 細胞を対照として、染色体異常を導入したことで、大腸上皮細胞ががん形質を獲得するかを確認する。確認方法として、組織形態、免疫染色、遺伝子発現解析、組み換えタンパクの培養上の必要性、などを指標とする。多くの左側大腸がんでは染色体重複が認められるものの、その病的意義が未だ明らかになっていない20番染色体長腕の他、多くの症例で重複のある8番長腕や13番全長などの染色体重複による形質の変化を確認する。また同時に発がんへの寄与が既知である APC や TP53 などの遺伝子変異を、CRISPR/Cas9 によるゲノム編集技術を用いて

導入し、疾患関連性を有する染色体と遺伝子変異を併せて組み込んだ場合の影響も観察する。



4. 研究成果

A. ヒト iPS 細胞からの大腸への分化誘導

ヒト iPS 細胞株数種を、東京大学医学研究所ステムセルバンク、理化学研究所バイオリソース研究センターから譲渡を受けた。それら数種について核型解析を行い、正常核型の iPS 細胞株を選定した。

正常核型 iPS 細胞をコーティングした培養皿上で、組み換えタンパクや阻害薬を添加し、大腸オルガノイドへ分化させる条件について、条件検討を行った。iPS 細胞の株によりその効率にばらつきはあるものの、繰り返し実験を行い、より効率的な条件を設定した。

正常核型のヒト iPS 細胞に微小核細胞融合法を用いて 20 番染色体全長を導入し、新たに 20 トリソミーの iPS 細胞株を樹立した。

樹立した染色体変異 iPS 細胞を正常核型と同様に *in vitro* で大腸へと分化させた。正常核型 iPS 細胞から分化させた大腸オルガノイドと同様に、染色体変異 iPS 細胞由来のオルガノイドは、間葉系細胞に囲まれた、内腔に粘液を持つ上皮様組織を構築した(図2)。また細胞異型と考えられる箇所も多く認められた。

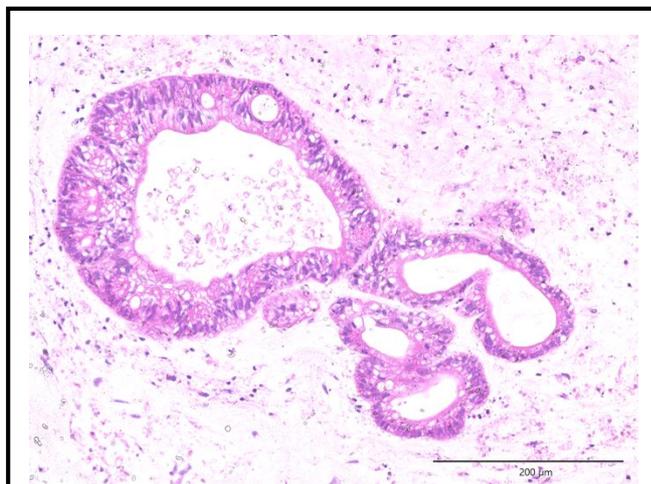


図2. 染色体変異 iPS 細胞より作成した大腸オルガノイド

現在、親株である正常核型細胞から作成された大腸オルガノイドを対照として、染色体数異常細胞細胞から作成された大腸オルガノイドについて、組織免疫染色や PCR 法などにより、解析を行なっている。また免疫不全マウスへの移植を行い、オルガノイドを成熟させ、同様に解析を行い、導入した染色体異常の形質への影響を評価していく予定である。

B. 発がん病因と考えられる遺伝子の病原性の評価について

左側原発大腸がんで高頻度に重複が認められる染色体領域に存在する遺伝子について、その遺伝子の発現が、がんの発生や進展に関与するかについて研究を行った。がん細胞は左側原発大腸がん手術検体から得られた細胞を用い、オルガノイド培養でオルガノイド形成能、増殖能などについて評価を行った。遺伝子のノックダウンで増殖能は大きく変わらない一方で、幹細胞性のサロゲート指標であるオルガノイド形成能は、short hairpin RNA を用いたノックダウンで低下した(図3)。今後免疫不全マウスでの造腫瘍能アッセイや網羅的遺伝子発現解析を行い、がんの発生や進展へ染色体異常がどのように関与するのかについて解析していく予定である。

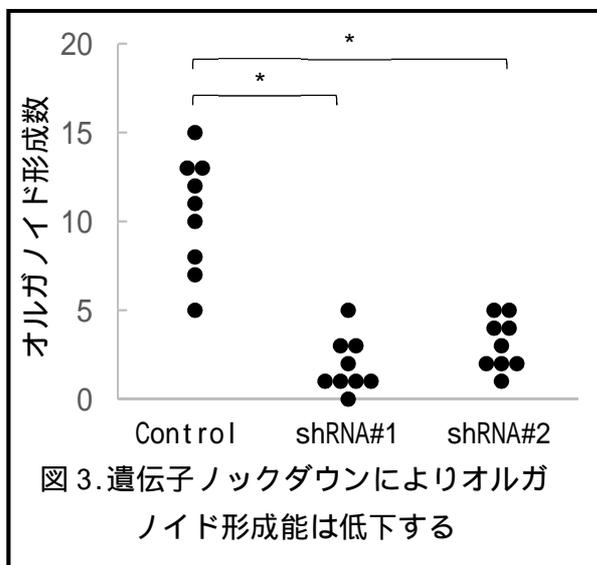


図3. 遺伝子ノックダウンによりオルガノイド形成能は低下する

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計6件（うち査読付論文 6件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 3件）

1. 著者名 Mukohyama Junko, Isobe Taichi, Hu Qingjiang, Hayashi Takanori, Watanabe Takashi, Maeda Masao, Yanagi Hisano, Qian Xin, Yamashita Kimihiro, Minami Hironobu, Mimori Koshi, Sahoo Debashis, Kakeji Yoshihiro, Suzuki Akira, Dalerba Piero, Shimono Yohei	4. 巻 79
2. 論文標題 miR-221 Targets QKI to Enhance the Tumorigenic Capacity of Human Colorectal Cancer Stem Cells	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Cancer Research	6. 最初と最後の頁 5151 ~ 5158
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1158/0008-5472.CAN-18-3544	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 Ohmura Hirofumi, Ito Mamoru, Uchino Keita, Okada Chihiro, Tanishima Shigeki, Yamada Yuichi, Momosaki Seiya, Komoda Masato, Kuwayama Miyuki, Yamaguchi Kyoko, Okumura Yuta, Nakano Michitaka, Tsuchihashi Kenji, Isobe Taichi, Ariyama Hiroshi, Kusaba Hitoshi, Oda Yoshinao, Akashi Koichi, Baba Eishi	4. 巻 10
2. 論文標題 Methylation of drug resistance related genes in chemotherapy sensitive Epstein-Barr virus associated gastric cancer	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 FEBS Open Bio	6. 最初と最後の頁 147 ~ 157
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1002/2211-5463.12765	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 Schaum Nicholas, The Tabula Muris Consortium、（多数のため省略）、Darmanis Spyros, Quake Stephen R., Wyss-Coray Tony	4. 巻 583
2. 論文標題 Ageing hallmarks exhibit organ-specific temporal signatures	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Nature	6. 最初と最後の頁 596 ~ 602
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1038/s41586-020-2499-y	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 The Tabula Muris Consortium	4. 巻 583
2. 論文標題 A single-cell transcriptomic atlas characterizes ageing tissues in the mouse	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Nature	6. 最初と最後の頁 590 ~ 595
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1038/s41586-020-2496-1	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 Tsuchihashi Kenji, Kusaba Hitoshi、(多数のため省略)、Isobe Taichi, Ariyama Hiroshi, Nakashima Yasuharu, Akashi Koichi, Baba Eishi	4. 巻 10
2. 論文標題 Eribulin as a first-line treatment for soft tissue sarcoma patients with contraindications for doxorubicin	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Scientific Reports	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/s41598-020-77898-y	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 Tanoue Kenro, Tamura Shingo, Kusaba Hitoshi, Shinohara Yudai, Ito Mamoru, Tsuchihashi Kenji, Shirakawa Tsuyoshi, Otsuka Taiga, Ohmura Hirofumi, Isobe Taichi, Ariyama Hiroshi, Koreishi Sakuya, Matsushita Yuzo, Shimokawa Hozumi, Tanaka Risa, Mitsugi Kenji, Akashi Koichi, Baba Eishi	4. 巻 11
2. 論文標題 Predictive impact of C-reactive protein to albumin ratio for recurrent or metastatic head and neck squamous cell carcinoma receiving nivolumab	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Scientific Reports	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/S41598-021-82448-1	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 -

〔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
研究協力者	田口 綾祐 (Taguchi Ryosuke)	九州大学・医学系学府・大学院生 (17102)	

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