

令和 6 年 6 月 20 日現在

機関番号：10101

研究種目：基盤研究(B) (一般)

研究期間：2020～2022

課題番号：20H03758

研究課題名(和文) 腫瘍惹起性炎症を標的とした新規大腸がん治療法の開発

研究課題名(英文) Development of novel therapy targeting tumor-elicited inflammation in colorectal cancer

研究代表者

谷口 浩二 (Taniguchi, Koji)

北海道大学・医学研究院・教授

研究者番号：20627020

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 13,700,000円

研究成果の概要(和文)：慢性炎症が多くの癌の浸潤や転移に寄与していることは知られているが、その詳細なメカニズムは未だ不明である。本研究では、オルガノイド培養、CRISPR/Cas9システム、網羅的解析などの新しい技術を用いて、ドライバー遺伝子の変異や炎症性再生シグナルが、がん細胞が産生するサイトカイン、ケモカイン、増殖因子の産生をどのように制御しているのか、また、これらの分子が腫瘍微小環境における慢性炎症や抗腫瘍免疫にどのような影響を与えているのかを検討した。そのために、大腸癌の多段階発癌仮説において重要な癌遺伝子や癌抑制遺伝子を変異させた遺伝子改変オルガノイドを樹立し、その遺伝子発現を解析した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

今回は新規技術である腸オルガノイド培養や網羅解析、CRISPR/Cas9によるゲノム編集などを用いて、がん細胞自身のドライバー遺伝子変異やそれに伴う炎症(新規炎症シグナル伝達経路Src-YAP経路やJAK-STAT3経路)がどのようにがん免疫に影響を与えるかという新しい観点から研究を行っており、新規がん治療方法の開発に繋がる事が期待される。

研究成果の概要(英文)：It is known that chronic inflammation contributes to invasion and metastasis of many cancers, but the detailed mechanism is still unknown. To artificially control anti-tumor immunity, it is important to clarify the molecules and cell types that regulate chronic inflammation in the tumor microenvironment. In this study, we examined how driver gene mutations and inflammatory regenerative signals regulate production of cytokines, chemokines and growth factors produced by cancer cells and how these molecules affect chronic inflammation and anti-tumor immunity in the tumor microenvironment by using new technologies such as organoid culture, CRISPR/Cas9 system, and comprehensive analysis. For that purpose, we have established genetically modified organoids, which were mutated with oncogenes and tumor suppressor genes that are important in the multi-stage carcinogenesis hypothesis of colorectal cancer, and analyzed gene expression of these organoids.

研究分野：がん

キーワード：がん 炎症 組織再生

様式 C - 19、F - 19 - 1 (共通)

1. 研究開始当初の背景

慢性炎症が多くのがんの発生のみならず浸潤・転移に寄与している事が知られているが、その詳細なメカニズムは未だ不明である。がん微小環境の慢性炎症や免疫を人工的にコントロールして免疫ががんを排除できる方法の開発や化学療法の治療成績向上には、がんの進展や治療抵抗性における炎症・免疫ネットワークの全貌とそれを調節する分子群や細胞種の解明が重要である。

2. 研究の目的

今回の研究開発においては、「腫瘍惹起性炎症」、つまり大腸がん細胞自身のドライバー遺伝子変化(大腸がんの進展に伴う変異の蓄積)や炎症再生シグナルがどのようにがん細胞からのサイトカイン・ケモカイン・増殖因子や免疫に影響する代謝産物の産生増加や低下を誘導してがん微小環境の慢性炎症やがん免疫(炎症・免疫ネットワーク)に影響しているかを、新規技術であるオルガノイド培養と CRISPR/Cas9 システム、網羅解析を駆使して明らかにすることを目的として研究を行った。

3. 研究の方法

・腸オルガノイド培養

腸オルガノイドを用いた解析:野生型 C57BL/6 マウスから腸オルガノイドを樹立した。腸オルガノイドの樹立は佐藤らの樹立方法(Sato T et al, Nature 2009)にしたがい、野生型 C57BL/6 マウスの腸を PBS で洗浄後、EDTA 処理にてクリプトを単離し、クリプトをカウントした後にマトリゲル内に埋め、Rspo1, Noggin, EGF, B27, N2 などを含む培地で培養した。

・腸オルガノイドの遺伝子発現解析

上記の方法で樹立した遺伝子改変腸オルガノイドの transcriptome 解析 (RNA-seq) を行い、その遺伝子発現を比較した。腸オルガノイドからの total RNA を RNAiso Plus (タカラバイオ株式会社) を用いて、プロトコールにしたがって抽出を行った。RNA 濃度を測定後、その RNA の発現解析 (RNAseq) を先進ゲノム支援(先進ゲノム解析研究推進プラットフォーム)の支援を受けて行った。シークエンスで得られたデータをエイトコーポレーション社に提出して、更なる詳細な解析を行った。リアルタイム PCR は CFX96 リアルタイム PCR 解析システム (Bio-Rad 社) を使用し、タンパク質レベルでのサイトカイン・ケモカインの発現解析は Proteome Profiler Mouse XL Cytokine Kit (R&D 社) を用いて行った。

4. 研究成果

今回の研究ではまず大腸がんの多段階発がん仮説で重要とされているがん遺伝子 (KRas) とがん抑制遺伝子 (APC, p53, Smad4) の遺伝子改変を行った腸オルガノイドを作製した。遺伝子改変のために、レンチウイルスと CRISPR/Cas9 システムにてゲノム編集を行うか、ノックアウトマウスの腸から腸オルガノイドを樹立した。

APC flox/flox マウスから腸オルガノイドを樹立し、アデノウイルス Cre を感染・発現さ

せ、APC の欠損を誘導した。さらにそのオルガノイドに KRas の活性型 KRasG12V 発現による Ras 経路活性化を誘導した。その後、p53 欠損、Smad4 欠損を誘導し、機能的スクリーニングを行い、p53 欠損細胞と Smad4 欠損オルガノイドを単離した。このように遺伝子変異を加えた腸オルガノイドは遺伝子変異に伴い、増殖スピードの促進や形態の変化を認めた。特に野生型からがん抑制遺伝子 APC を欠損させることで、budding していた腸オルガノイドが球状の形態を示すという大きな変化を認め、増殖スピードも促進した。

樹立した遺伝子改変腸オルガノイドの transcriptome 解析 (RNA-seq) を行って比較し、それぞれの遺伝子変異がどのようにサイトカイン、ケモカイン、増殖因子などの発現上昇や低下に寄与するかを検討した。それぞれの遺伝子変異により多くの遺伝子に発現の変化が認められたが、特に heatmap に示すように野生型から APC を欠損させることでサイトカイン、ケモカイン、増殖因子を含む多くの遺伝子の発現が変化した。KEGG (Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes) 解析を行ったところ、APC 欠損により、Pathways in cancer, PI3K-Akt signaling pathway, Cytokine-cytokine receptor interaction, Hippo signaling pathway, Focal adhesion などに大きな変化が認められた。RNAseq で得られたサイトカイン、ケモカインの発現変化を違う手法で確認するために、リアルタイム PCR とサイトカイン・ケモカインアレイでの解析を行ったところ、RNAseq と同様の結果が得られ、RNAseq の結果の信頼性が確認を確認することができた。

今回の研究で今後の研究に使用できる遺伝子改変オルガノイドとその遺伝子発現解析結果を得る事に成功した。特に APC 欠損で影響されるシグナル経路に Hippo signaling pathway が入っていた事は、以前の我々の研究結果と一致する。今後はこれらの実験系に我々が同定した炎症再生シグナルの活性型変異や欠損のデータを追加する事で、慢性炎症がどのようなサイトカイン、ケモカインの発現変化を誘導するか、さらにその発現調節機構を明らかにして、in vivo での重要性の検討も含めて研究を展開していく予定である。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計5件（うち査読付論文 5件／うち国際共著 1件／うちオープンアクセス 3件）

1. 著者名 Ishikawa Keiko, Sugimoto Shinya, Oda Mayumi, Fujii Masayuki, Takahashi Sirirat, Ohta Yuki, Takano Ai, Ishimaru Kazuhiro, Matano Mami, Yoshida Kosuke, Hanyu Hikaru, Toshimitsu Kohta, Sawada Kazuaki, Shimokawa Mariko, Saito Megumu, Kawasaki Kenta, Ishii Ryota, Taniguchi Koji, Imamura Takeshi, Kanai Takanori, Sato Toshiro	4. 巻 163
2. 論文標題 Identification of Quiescent LGR5+ Stem Cells in the Human Colon	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Gastroenterology	6. 最初と最後の頁 1391 ~ 1406.e24
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1053/j.gastro.2022.07.081	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 Makita Keishi, Otsuka Noriyuki, Tomaru Utano, Taniguchi Koji, Kasahara Masanori	4. 巻 71
2. 論文標題 NKG2D Ligand Expression Induced by Oxidative Stress Mitigates Cutaneous Ischemia Reperfusion Injury	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 Journal of Histochemistry & Cytochemistry	6. 最初と最後の頁 61 ~ 72
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1369/00221554221147582	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 Hu Xichen, Yasuda Tadahito, Yasuda-Yosihara Noriko, Yonemura Atsuko, Umemoto Terumasa, Nakachi Yutaka, Yamashita Kohei, Semba Takashi, Arima Kota, Uchihara Tomoyuki, Nishimura Akiho, Zhang Jun, Tong Yilin, Iwamoto Kazuya, Fukuda Takaichi, Nakagawa Hayato, Taniguchi Koji, Miyamoto Yuji, Baba Hideo, Ishimoto Takatsugu	4. 巻 5
2. 論文標題 Downregulation of 15-PGDH enhances MASH-HCC development via fatty acid-induced T-cell exhaustion	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 JHEP Reports	6. 最初と最後の頁 100892 ~ 100892
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.jhepr.2023.100892	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8件（うち招待講演 4件／うち国際学会 4件）

1. 発表者名 Koji Taniguchi
2. 発表標題 New development in translational research targeting inflammation and immunity in colorectal cancer
3. 学会等名 第81回日本癌学会学術総会（招待講演）（国際学会）
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 Koji Taniguchi
2. 発表標題 New development in translational research targeting inflammation in colorectal cancer
3. 学会等名 第60回日本癌治療学会学術集会（招待講演）（国際学会）
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 Koji Taniguchi
2. 発表標題 A gp130-SFK-YAP module promotes colonic tumorigenesis
3. 学会等名 第33回日本消化器癌発生学会総会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 Koji Taniguchi
2. 発表標題 Study on the role of activation of the SFK-YAP signaling induced by IL-6 family cytokines in gastrointestinal cancer
3. 学会等名 第45回日本分子生物学会年会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 Koji Taniguchi
2. 発表標題 New development in translational research targeting inflammation and immunity in colorectal cancer
3. 学会等名 第81回日本癌学会学術総会（招待講演）（国際学会）
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 Koji Taniguchi
2. 発表標題 New development in translational research targeting inflammation in colorectal cancer
3. 学会等名 第60回日本癌治療学会学術集会（招待講演）（国際学会）
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 Koji Taniguchi
2. 発表標題 A gp130-SFK-YAP module promotes colonic tumorigenesis
3. 学会等名 第33回日本消化器癌発生学会総会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 Koji Taniguchi
2. 発表標題 Study on the role of activation of the SFK-YAP signaling induced by IL-6 family cytokines in gastrointestinal cancer
3. 学会等名 第45回日本分子生物学会年会
4. 発表年 2022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
---------	---------