

令和 5 年 6 月 14 日現在

機関番号：13301

研究種目：基盤研究(C)（一般）

研究期間：2020～2022

課題番号：20K07586

研究課題名（和文）胃がん細胞へ幹細胞性を付与する分子機構の解明と新規治療法の探索

研究課題名（英文）Analysis of mechanisms which regulate stemness in stomach tumor and searching of new treatment.

研究代表者

村上 和弘（Murakami, Kazuhiro）

金沢大学・がん進展制御研究所・准教授

研究者番号：60455368

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,300,000円

研究成果の概要（和文）：本研究では、Lgr5陽性細胞に着目し、Lgr5陽性がん細胞が胃がん幹細胞様細胞である可能性を、炎症を伴う悪性度の高い胃がんを発症するマウスモデルにおいて検証を試みた。

また、オルガノイドの生体外・生体内解析を通して、Lgr5陽性胃正常組織幹細胞とがん幹細胞様細胞を詳細に比較することにより、がん幹細胞様細胞の生存・悪性度の亢進に利用されている分子機構を明らかにすることに成功した。

これらの知見を元に、人工知能（AI）を用いた薬剤スクリーニング系を構築し、ヒト胃がん幹細胞様細胞を標的とした新規薬剤の開発基盤を構築した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

がん幹細胞様細胞は放射線耐性・薬剤耐性を持ちつつ、がんの転移・再発を引き起こすことから、これらの細胞に対する効果的な治療法を確立することは喫緊の課題である。

これまでに申請者らはマウス・ヒトの胃がん組織でLgr5遺伝子を発現する胃がん幹細胞様細胞を同定している。一連の研究結果は、正常幹細胞の生存に必須な分子機構が、がん幹細胞様細胞において利用されていることを示唆するが、その詳細は未だ明らかではない。

本研究においては、胃がん幹細胞様細胞で特徴的な使われ方をしている分子機構を明らかにし、その知識の上で新規薬剤の探索を行い、胃がん幹細胞様細胞に対する効果的な治療法を確立することを目指す。

研究成果の概要（英文）： In this study, we focused on Lgr5-positive cells and attempted to test the possibility that Lgr5-positive cancer cells are gastric cancer stem cell-like cells in a mouse model which develops high-grade gastric cancer with inflammation.

By comparing Lgr5-positive gastric normal tissue stem cells with cancer stem cell-like cells through in vitro and in vivo analysis, we also succeeded in clarifying the molecular mechanisms utilised to enhance the survival and malignant potential of cancer stem cell-like cells.

Based on these findings, we constructed an artificial intelligence (AI)-based drug screening system to establish a basis for the development of novel drugs targeting human gastric cancer stem cell-like cells.

研究分野：幹細胞生物学

キーワード：がん幹細胞 胃がん オルガノイド LGR5

1. 研究開始当初の背景

我々の体は、細胞外シグナルや細胞内分子機構によって適切な時期に規則正しく発生する。この発生過程において必須な役割を担っているのが「自己複製能」と「異なる細胞への分化能」を持つ「幹細胞」である。この幹細胞は、発生初期のみならず成体各組織にも存在し、組織の恒常性の維持および傷害からの修復に必要な役割を担っている。

近年、申請者は連携研究者である Nick Barker 金沢大学特任教授らと共に、胃線の底部に *Leucine-rich repeat-containing G-protein coupled receptor 5 (Lgr5)* 遺伝子を発現する胃正常組織幹細胞を見出した (Leukeshacke M. *et al.*, *Nat. Cell Biol.*, 2017, Barker N. *et al.*, *Cell Stem Cell*, 2010)。これらの *Lgr5* 遺伝子を発現する胃組織幹細胞は、細胞外の Wnt シグナルにより活性化され、胃正常組織の恒常性や傷害からの修復に必要な役割を担っている。

一方で、がんは発生シグナルには従わず、無秩序に増殖し、浸潤・転移することで最終的には個体を死に至らしめる。近年、がんの再発・転移の背景には、がんの親玉ともいえる「がん幹細胞様細胞」が存在することが指摘されている。がん幹細胞様細胞は、薬剤耐性・放射線耐性を持ちつつ、自ら分裂して周囲のがん細胞を生み出すことから、がんの根絶に向けてがん幹細胞様細胞の増殖能・分化能を抑制しつつ、がん全体を標的とする治療法の確立が急務となっている。申請者らは前述の論文において、マウスの生体内で *Lgr5* 陽性胃組織幹細胞特異的に *Apc* 遺伝子や *KRas* 遺伝子に変異を誘導することで、胃がん細胞が生じうることを明らかにした。この観察結果は、がん幹細胞様細胞が正常幹細胞から生じるといふ仮説 (Hans Clevers, *Nat. Med.*, 2011) と一致している。

近年、大腸がんを含む様々ながんではがん幹細胞様細胞の存在が報告されつつある (De Sousa e Melo F., *et al.*, *Nature*, 2017, Shimokawa M. *et al.*, *Nature*, 2017)。一方で、胃がんにおけるがん幹細胞様細胞の詳細は不明である。興味深いことに、がん幹細胞様細胞は正常幹細胞に必要なシグナルに依存して増殖し、発生過程に重要な一群の転写因子を発現していることが明らかとなっている。このことから、がん幹細胞様細胞は元々正常幹細胞に備わっていた分子機構を利用し、自己の生存の為に利用していると考えられるが、正常幹細胞とがん幹細胞様細胞を比較した研究が少ないため、正常発生に必要な分子機構が、がん幹細胞様細胞内でどのように使われているのかについては、多くが謎に包まれたままである。

これらの分子機構を解明し、がん幹細胞様細胞で特徴的な使われ方をしている因子を同定し、薬剤標的を見つけることで、がん幹細胞様細胞のみを標的とした新たな治療法の開発が期待できる。

2. 研究の目的

本研究においては、*Lgr5* 陽性細胞に着目し、*Lgr5* 陽性がん細胞が胃がん幹細胞様細胞である可能性を、炎症を伴う悪性度の高い胃がんを発症するマウスモデルにおいて検証する。さらに、オルガノイドの生体外・生体内解析を通して、胃正常組織幹細胞とがん幹細胞様細胞を詳細に比較することにより、がん幹細胞様細胞の生存・悪性度の亢進に利用されている分子機構を明らかにする。これらの知見を元に、人工知能 (AI) を用いた薬剤スクリーニングを行うことで、胃がん幹細胞様細胞を標的とした新たな薬剤の開発基盤を構築することを目指す。

具体的には以下の3つの研究項目を実施する。

研究項目 1 悪性度の高い胃がんにおいて、*Lgr5* 陽性がん細胞ががん幹細胞であることを証明する。

慢性炎症を伴うヒト胃がんの発がん過程を模倣するために、炎症を伴って発生する悪性度の高いマウス胃がん組織において、*Lgr5* 陽性がん細胞が浸潤・転移・再発に関与するがん幹細胞様細胞かどうかを確認する。これらのマウスで得られる知見を、ヒト胃がんより樹立したオルガノイドを用いて生体外・生体内において検証する。

研究項目 2 正常、胃がん幹細胞様細胞における転写因子の働きを解明する。

これまでに得た予備結果から、がん幹細胞様細胞制御因子であると考えられる転写因子 *Sox9* に着目し、オルガノイドの生体外実験・生体内移植実験を通して、*Sox9* が胃正常幹細胞、がん幹細胞様細胞において幹細胞性を制御する分子機構を詳細に解析する。また、ヒト胃がんオルガノイドを用いて、マウスで得られた知見を生体外・生体内において検証する。

研究項目 3 Patient-Derived Orthotopic Xenograft (PDOX) モデルを用いたがん幹細胞様細胞に対する薬剤スクリーニングの実施。

研究項目 1、2 で得られた結果を元に、がん幹細胞様細胞のみを標的とする薬剤候補を探索する。選定した薬剤候補をマウス・ヒト胃がんオルガノイドに添加し、AI を用いた画像解析技術を用いて薬剤候補のスクリーニングを行う。最終的に選ばれた薬剤候補化合物は、ヒト胃がんオルガノイドを免疫不全マウスの胃に同所移植したマウス (PDOX マウスモデル) において評価する。

3. 研究の方法

研究項目 1

Lgr5 陽性細胞を EGFP の発現により可視化およびジフテリアトキシン(DT)の投与により選択的に除去できる Lgr5DTR-EGFP マウスと炎症マウスモデル(C2mE)、悪性度の高い胃がんを発症する胃がんマウスモデル(Apc KO/ KrasG12D/ p53 KO)を交配する。炎症を伴って発生する悪性度の高い胃がんにおいて、Lgr5 陽性がん細胞の胃がん進展への寄与を見積もる。これらのマウスから胃がんオルガノイドを樹立し、分子生物学的解析を通してがん幹細胞様細胞の特性を理解する。CRISPR/Cas9 遺伝子編集技術を用いて、ヒト胃がんオルガノイドの *LGR5* 遺伝子座に *EGFP* および選択的にアポトーシスを誘導できる *iCaspase9* 遺伝子を挿入する。これらのオルガノイドを免疫不全マウスの胃へ同所移植し、LGR5 陽性細胞を可視化および選択的に除去することで、ヒト LGR5 陽性胃がん細胞が幹細胞様性質を示すことを検証する。

研究項目 2

マウス正常および胃がんオルガノイドで、Sox9 を時期特異的に過剰発現およびノックアウトし、Sox9 の発現変動が Lgr5 陽性の正常幹細胞およびがん幹細胞様細胞に与える影響を見積もる。これらのオルガノイドを免疫不全マウスの胃へ同所移植し、生体内において詳細な検証を行う。マウス・ヒト胃がんオルガノイドを用いて、生体外・生体内で胃がん幹細胞様細胞に特徴的な Sox9 の下流分子機構を分子生物学的な解析を通して明らかにする。

研究項目 3

システム生物学者 Pinzhao Hu 博士と共同で立ち上げた AI を用いた画像解析技術および効果的な薬剤の検索技術を、ヒト胃がんオルガノイドに適用し、薬剤スクリーニングの基盤を構築する。研究項目 2 で明らかになる下流分子機構から、薬剤候補を選定する。候補化合物を胃がんオルガノイドの培養液中に添加し、形態・増殖、Lgr5 遺伝子の発現状態を指標に画像解析を行い、薬剤候補の絞り込みを行う。さらに、ヒト胃がんオルガノイドを免疫不全マウスの胃へ同所移植し、生体内での薬剤の効果を検証する。

4. 研究成果

研究項目 1 悪性度の高い胃がんにおいて、Lgr5 陽性がん細胞ががん幹細胞であることを証明する。

Lgr5 陽性細胞を EGFP の発現により可視化およびジフテリアトキシン(DT)の投与により選択的に除去できる Lgr5DTR-EGFP マウスと炎症マウスモデル(C2mE)、悪性度の高い胃がんを発症する胃がんマウスモデル(Apc KO/ KrasG12D/ p53 KO)を交配することで、炎症を伴って悪性度の高い胃がんを発症する胃がんマウスモデルを構築した。Lgr5 陽性がん細胞の胃がん進展への寄与を見積もった結果、これらの胃がんモデルにおいて Lgr5 陽性がん細胞は、胃がん幹細胞様細胞として働くことを明らかにした。現在は、これらのマウスから胃がんオルガノイドを樹立し、分子生物学的解析を通してがん幹細胞様細胞の特性理解を試みている。一方で、CRISPR/Cas9 遺伝子編集技術を用いて、ヒト胃がんオルガノイドの *LGR5* 遺伝子座に *EGFP* および選択的にアポトーシスを誘導できる *iCaspase9* 遺伝子を挿入し、LGR5 陽性胃がん幹細胞様細胞を可視化・時期特異的に除去できるオルガノイドの樹立を行った。現在は、これらのオルガノイドを免疫不全マウスの胃へ同所移植し、LGR5 陽性胃がん幹細胞様細胞を可視化および選択的に除去しつつ、ヒト胃がんの進展に関する詳細な解析を行っている。

研究項目 2 正常、胃がん幹細胞様細胞における転写因子の働きを解明する。

マウス正常および胃がんオルガノイドで、Sox9 を時期特異的に過剰発現およびノックアウトし、Sox9 の発現変動が Lgr5 陽性の正常幹細胞およびがん幹細胞様細胞に与える影響を見積もった。その結果、胃がん幹細胞様細胞特異的な Sox9 の働きが明らかになった。また、これらのオルガノイドを免疫不全マウスの胃へ同所移植し、生体内において詳細な検証を行った。一方で、マウス・ヒト胃がんオルガノイドを用い、分子生物学的な解析を通して生体外・生体内で胃がん幹細胞様細胞に特徴的な Sox9 の下流分子機構を明らかにすることに成功した。

研究項目 3 Patient-Derived Orthotopic Xenograft (PDOX)モデルを用いたがん幹細胞様細胞に対する薬剤スクリーニングの実施。

システム生物学者 Pinzhao Hu 博士と共同で立ち上げた AI を用いた画像解析技術および効果的な薬剤の検索技術を、ヒト胃がんオルガノイドに適用し、薬剤スクリーニングの基盤を構築することに成功した。現在は、これらの技術を用いて研究項目 2 で明らかになった下流分子機構から、薬剤候補の選定を行っている。将来的には、得られた候補化合物を胃がんオルガノイドの培養液中に添加し、形態・増殖、Lgr5 遺伝子の発現状態を指標に画像解析を行い、薬剤候補の絞り込みを行う。さらに、ヒト胃がんオルガノイドを免疫不全マウスの胃へ同所移植し、生体内での薬剤の効果を検証する。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計4件（うち査読付論文 2件/うち国際共著 2件/うちオープンアクセス 1件）

1. 著者名 Murakami Kazuhiro, Terakado Yumi, Saito Kikue, Jomen Yoshie, Takeda Haruna, Oshima Masanobu, Barker Nick	4. 巻 118
2. 論文標題 A genome-scale CRISPR screen reveals factors regulating Wnt-dependent renewal of mouse gastric epithelial cells	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Proceedings of the National Academy of Sciences	6. 最初と最後の頁 1~12
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1073/pnas.2016806118	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 該当する
1. 著者名 Fatehullah A., Terakado Y., Sagiraju S., Tan T. L., Sheng T., Tan S. H., Murakami K., Swathi Y., Ang N., Rajarethinam R., Ming T., Tan P., Lee B., Barker N.	4. 巻 23
2. 論文標題 A tumour-resident Lgr5+ stem-cell-like pool drives the establishment and progression of advanced gastric cancers	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Nature Cell Biology	6. 最初と最後の頁 1299~1313
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1038/s41556-021-00793-9	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 該当する
1. 著者名 Yamamoto Daisuke, Oshima Hiroko, Wang Dong, Takeda Haruna, Kita Kenji, Lei Xuelian, Nakayama Mizuho, Murakami Kazuhiro, Ohama Takashi, Takemura Hirofumi, Toyota Mutsumi, Suzuki Hiromu, Inaki Noriyuki, Oshima Masanobu	4. 巻 257
2. 論文標題 Characterization of RNF43 frameshift mutations that drive Wnt ligand and R spondin dependent colon cancer	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 The Journal of Pathology	6. 最初と最後の頁 39~52
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1002/path.5868	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 -
1. 著者名 Morita Atsuya, Nakayama Mizuho, Wang Dong, Murakami Kazuhiro, Oshima Masanobu	4. 巻 114
2. 論文標題 Frequent loss of metastatic ability in subclones of Apc, Kras, Tgfbr2, and Trp53 mutant intestinal tumor organoids	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 Cancer Science	6. 最初と最後の頁 1437~1450
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1111/cas.15709	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3件（うち招待講演 1件 / うち国際学会 1件）

1. 発表者名 村上 和弘
2. 発表標題 LGR5陽性の胃がん細胞において幹細胞性を導く機構の解析
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 村上 和弘, バーカ ニック
2. 発表標題 Lgr5陽性の胃がん細胞において幹細胞性を導く機構の解析
3. 学会等名 第81回 日本癌学術総会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 村上 和弘
2. 発表標題 A genome-scale CRISPR screening reveals novel factors regulating Wnt-dependent renewal of Mouse Gastric Epithelial Cells
3. 学会等名 BICON 2022-2023 (招待講演) (国際学会)
4. 発表年 2023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			
ドイツ	EIMI, University of Munster			