

令和 4 年 5 月 30 日現在

機関番号：17102

研究種目：研究活動スタート支援

研究期間：2020～2021

課題番号：20K22955

研究課題名(和文) CRISPR ScreeningによるIPMN癌化機序の解明

研究課題名(英文) Elucidation of IPMN Oncogenic Mechanisms by CRISPR Screening

研究代表者

奥村 隆志 (OKUMURA, Takashi)

九州大学・医学研究院・共同研究員

研究者番号：00883422

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,200,000円

研究成果の概要(和文)：IPMNの発生過程及びその悪性化の過程を分子生物学的に明らかにすることは、IPMNの癌化の早期発見、癌化の予防に繋がると期待される。

我々はIPMNの疾患モデルとして、膵癌自然発癌マウス(KCマウス)より樹立したオルガノイドに遺伝子変異を導入してIPMNオルガノイドの樹立を目指した。その過程で膵癌オルガノイドの樹立の手技を確立し、樹立したオルガノイドが形態学的違いによって増殖形態が異なることを発見した。オルガノイドを用いた形態学的分類によってCAFが産生するNiche因子への依存性が異なること、更に癌微小環境中のNiche因子への依存性が抗癌剤への感受性や予後にも関与していることを明らかにした。

研究成果の学術的意義や社会的意義

IPMNは膵臓に発生する嚢胞性の腫瘍で、IPMNと診断された患者に対して適切な画像診断やフォローアップを行うことで、早期膵癌の診断件数が向上し、膵癌全体の治療成績の改善に大きく寄与する可能性が期待されている。本研究では、膵オルガノイドを用いた形態学的分類を行い、膵癌の分化度ごとの特性を比較・検討したところ、分化度の高い膵癌オルガノイドでは腫瘍の進展において、CAFが産生するNiche因子の一つであるR-spondinに対する依存性がより高いことが明らかになった。これらの結果は、停滞する膵癌新規治療の開発において、個別化医療への応用につながる重要な知見であると考えられる。

研究成果の概要(英文)：Molecular biological elucidation of the developmental process of IPMN and its malignant transformation is expected to lead to early detection and prevention of cancerous transformation of IPMN. We aimed to establish IPMN organoids as a disease model of IPMN by introducing genetic mutations into organoids established from spontaneously carcinogenic pancreatic cancer mice (KC mice). In the process, we established a technique for the establishment of pancreatic cancer organoids and found that the established organoids differ in growth form depending on morphological differences. We found that the dependence on niche factors produced by CAFs differed depending on the morphological classification of the organoids. Furthermore, we found that the dependence on Niche factors in the cancer microenvironment is involved in the sensitivity to anticancer drugs and prognosis.

研究分野：医歯薬学

キーワード：IPMN 膵オルガノイド CAF ニッチ因子 癌微小環境 膵癌

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

平成 26 年度の厚生労働省の人口動態統計によると、膵臓癌の癌死亡率は本邦において第 4 位であり、年次推移でも増加傾向にある。他の消化器癌などにおける飛躍的な治療成績の改善とは対照的に、膵臓癌は欧米や日本でもここ 30 年以上ほとんど生存率の改善がみられない取り残された癌腫である。現在でも唯一の根治的治療は外科切除であるが、80%の症例が切除不能の状態と診断され、切除手術を行ってもその 80%の患者が再発する。進行・再発症例に対しては化学療法が行われ、従来標準的に使用されてきた Gemcitabine に加えて、FOLFILINOX や nab-Paclitaxel といった新規抗癌剤が実際に臨床で使用されるようになってきてはいるが、十分な治療成績の改善が得られていないのが現状である。

IPMN は膵臓に発生する嚢胞性の腫瘍で、徐々に悪性化して浸潤癌に至る IPMN 由来浸潤癌が存在する以外に、IPMN と診断された症例では IPMN とは離れた部位に通常型膵癌(IPMN 併存癌)が見つかりやすいことが近年明らかにされてきた。つまり、IPMN と診断された患者に対して適切な画像診断やフォローアップを行うことで、早期膵癌の診断件数が向上し、膵癌全体の治療成績の改善に大きく寄与する可能性が期待されている。

IPMN の発生過程およびその悪性化の過程を分子生物学的に明らかにすることは、IPMN の癌化の早期発見、あるいは癌化の予防に繋がると期待される。IPMN は KRAS、GNAS、RNF43 といった遺伝子変異を有することが分かっているが、腫瘍が悪性化していく過程においてこういった遺伝子変異の蓄積が重要なのかについては未だ不明な点が多い。そこで、われわれは IPMN の疾患モデルとして、膵オルガノイドとそれを用いた syngenic model を確立し、IPMN 癌化メカニズムの解析に応用することを計画した。

2. 研究の目的

IPMN を疑似化したオルガノイドを作成し、それを遺伝的背景が一致した C57BL/6 マウスの膵臓に同所移植する syngenic model を作成する。これらのモデルに CRISPR screening を行うことで IPMN 悪性化の責任遺伝子を同定することが本研究の当初の目的である。

3. 研究の方法

当初は下記の研究内容を計画していた。

1. 米国 Jackson Laboratory より、p48-Cre マウス雌、LSL-KrasG12D マウス雄(いずれも background は C57BL/6 マウス)を購入後、交配・繁殖させ、ダブルヘテロマウス(KC マウス)の膵臓を採取し、Kras 遺伝子変異を有した膵前癌病変に由来する膵オルガノイドを樹立する。
2. レンチウイルスを用いて Gnas 変異、Rnf43 変異を導入した IPMN を疑似化したオルガノイドを作成する。それらを、C57BL/6 マウスの膵臓に同所移植し、IPMN の syngenic model を作成する。
3. CRISPR Screening のための pooled library が packaging されたレンチウイルスを作成したオルガノイドに感染させ、C57BL/6 マウスの膵臓に同所移植する。腫瘍を形成した頃に組織を採取して DNA を抽出し、次世代シーケンサーを用いた解析を行って、IPMN の癌化責任遺伝子を同定する。

しかし、実験基盤の作成が滞り、安定した KC マウスの供給までに至らなかったためマウス由来 IPMN オルガノイドの樹立には至らなかった。しかし、マウス由来疑似 IPMN オルガノイド樹立に先立ち、膵オルガノイドを安定して作成するプロトコール・手技の確立のため切除検体を用いたヒト膵癌由来オルガノイド樹立を行ったところ、10 例のヒト膵癌オルガノイドを樹立し、いずれも切除検体の病理学的特徴を保持しており、高い効率で膵癌オルガノイドを樹立するための手技が確立できた。ヒト膵癌オルガノイド(うち 1 例は GNAS 変異を有しており、IPMN 由来 PDAC の可能性あり)の解析を行ったところ、オルガノイドの形態学的に分類することができ、さらにこれらの分類ごとに癌の性質が異なることを見出した。膵癌オルガノイドの形態学的分類から、癌の特性を明らかにするため、以下の実験計画を新たに考案した。

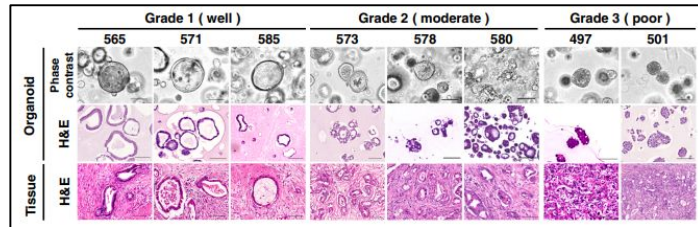
1. 膵癌オルガノイドを用いた形態的分類
2. 形態的分類に基づく遺伝子発現の比較
3. 形態的分類による癌特性の解明
4. 形態的分類による治療抵抗性の比較

以下にこれらの結果を記載する。

4. 研究成果

1. ヒト膵癌オルガノイドの樹立と形態学的分類

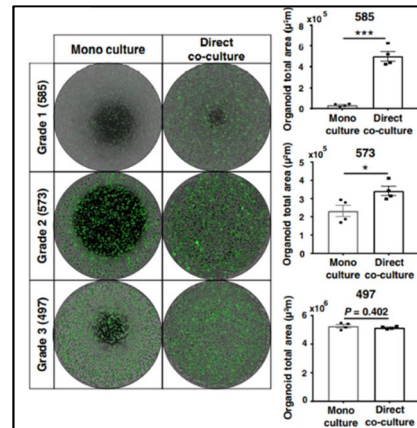
ヒト膵癌手術検体から樹立したオルガノイドは由来の膵癌分化度に一致した形態学的特徴を呈していた。樹立したオルガノイドをそれぞれその形態学的特徴から Grade1(well), Grade2(moderate), Grade3(poor)の3つに分類した(右図)。



これらのオルガノイドを用いてマイクロアレイ発現解析による比較を行ったところ、オルガノイドの形態学的特徴による分類は、以前報告された Moffitt 分類(Basal type, Classical type)と一致して発現遺伝子が変動していることが分かった。

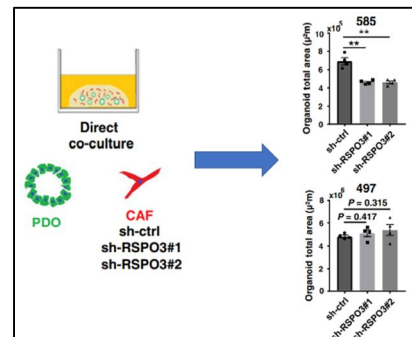
2. 膵癌の分化度による CAF 産生 Niche 因子への依存度の違い

われわれは樹立したオルガノイドを培養していく中で、膵癌の分化度に一致した形態学的分類によって、オルガノイド培養の際に使用する Niche 因子への依存性が異なることに気が付いた。すなわち、分化度の高い膵癌オルガノイドはより微小環境の Niche 因子に依存性が高いことが明らかになった。そこで、Niche 因子を産生する主要な細胞である CAF とこれらの膵癌オルガノイドを共培養したところ、Niche 因子への依存度と一致して、高分化型オルガノイドは CAF と共培養した際に、低分化型のオルガノイドと比較してより増殖能が増すことが分かった(右下図)。



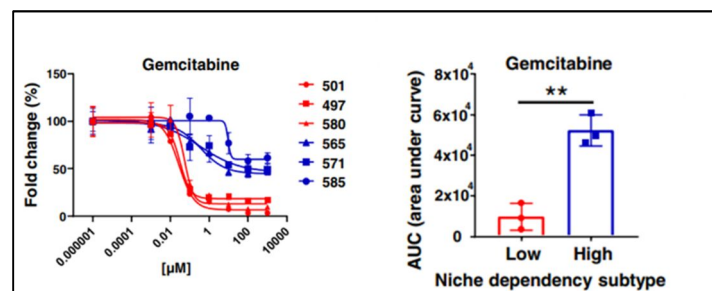
3. CAF の産生する R-spondin(RSP0)が高分化型膵癌の増殖に関与している

高分化型膵癌の増殖を促進させる因子を特定するため、オルガノイド培地の Niche 因子をそれぞれ除去して培養したところ、RSP0 を除去した際に、高分化型膵癌のオルガノイド形成が有意に抑制された。そこで、CAF の RSP0 を shRNA によってノックダウンしたところ、低分化型膵癌オルガノイドでは増殖能に差は認めなかったが、高分化型膵癌オルガノイドでは有意に増殖が抑制された。(右図)



4. 形態学的分類による治療抵抗性の比較

形態学的分類・分化度によって CAF の産生する Niche 因子への依存性が異なることが明らかになったため、これらの特性が抗癌剤に対する治療抵抗性に関与しているかを検証した。すると、Niche 因子への依存度が高い高分化型膵癌では Gemcitabine への治療抵抗性がより高かった。しかし、高分化型膵癌オルガノイドではマイクロアレイ発現解析の結果から脂肪酸代謝パスウェイが亢進しており、脂肪酸代謝経路の阻害剤である Simvastatin に対しては低分化型と比較して感受性が高いことが明らかになった。



IPMN オルガノイドの樹立・解析には至らなかったが、その過程で膵癌オルガノイドの樹立の手技を確立し、樹立したオルガノイドの系統的解析を行うことができた。膵癌オルガノイドを用いた形態学的分類により、分化度ごとの特性を明らかにし、オルガノイドを用いた癌細胞のフェノタイプ分類が、抗癌剤への感受性や予後に関与していることを明らかにした。これらの結果は、膵癌における個別化医療への応用につながる重要な結果であり、英文誌に報告した。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計1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 Shinkawa Tomohiko, Ohuchida Kenoki, Mochida Yuki, Sakihama Kukiko, Iwamoto Chika, Abe Toshiya, Ideno Noboru, Mizuuchi Yusuke, Shindo Koji, Ikenaga Naoki, Moriyama Taiki, Nakata Kohei, Oda Yoshinao, Nakamura Masafumi	4. 巻 41
2. 論文標題 Subtypes in pancreatic ductal adenocarcinoma based on niche factor dependency show distinct drug treatment responses	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Journal of Experimental Clinical Cancer Research	6. 最初と最後の頁 89
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1186/s13046-022-02301-9	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3件（うち招待講演 0件/うち国際学会 0件）

1. 発表者名 新川智彦、大内田研宙、持田郁己、小山虹輝、林昌孝、松本泰吉、岩本千佳、進藤幸治、池永直樹、仲田興平、中村雅史
2. 発表標題 分化型膵癌は癌関連線維芽細胞由来の微小環境因子に依存して分化度を保持している
3. 学会等名 第52回日本膵臓学会大会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 新川智彦、大内田研宙、持田郁己、奥田翔、大坪慶志輝、岩本千佳、進藤幸治、池永直樹、仲田興平、中村雅史
2. 発表標題 膵癌における癌関連線維芽細胞由来の微小環境因子が腫瘍分化度に与える影響についての検討
3. 学会等名 第76回日本消化器外科学会総会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 新川智彦、大内田研宙、中村祥一、持田郁己、久野恭子、奥田翔、大坪慶志輝、岩本千佳、進藤幸治、池永直樹、森山大樹、永井俊太郎、仲田興平、中村雅史
2. 発表標題 膵癌における微小環境因子が腫瘍分化度に与える影響およびその分化度に応じた薬物治療反応性についての検討
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
研究協力者	新川 智彦 (SHINKAWA Tomohiko)		

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