

令和 6 年 6 月 17 日現在

機関番号：72602

研究種目：基盤研究(B)（一般）

研究期間：2021～2023

課題番号：21H02770

研究課題名（和文）大腸がんの転移・再発における細胞多様性の役割

研究課題名（英文）The role of cellular diversity in the metastasis and recurrence of colorectal cancer

研究代表者

八尾 良司 (YAO, Ryoji)

公益財団法人がん研究会・がん研究所 細胞生物部・部長

研究者番号：80291095

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 13,300,000円

研究成果の概要（和文）：大腸がんの転移、再発過程を明らかにするために、同一患者の原発巣・転移巣・再発巣からオルガノイドを樹立し、解析を行なった。がん幹細胞をゲノム編集により可視化し、シングルセルからのオルガノイド再構成過程を解析した結果、がん幹細胞と分泌系細胞との相互作用が明らかになった。一方、免疫不全マウスへの同所移植実験では原発巣と転移・再発巣由来オルガノイドの転移能が異なり、細胞多様性が変化していることが明らかになった。さらに、原発巣オルガノイド移植マウスの遠隔組織に検出された播種細胞では、がん幹細胞マーカーが消失していた。これらの結果は、がんの発生、転移過程における細胞可塑性の重要性を示すものである。

研究成果の学術的意義や社会的意義

同一患者の原発巣・転移巣・再発巣から樹立されたオルガノイドを用いることにより、がん細胞は転移過程で細胞階層性を変化させ、転移能を亢進させることが明らかになった。また遠隔組織には、比較的早い時期に播種細胞が存在するものの、腫瘍の顕在化には再増殖能を獲得する必要があることが示唆された。播種細胞は、転移のみならず再発にも重要な役割を持つことが予想されることから、本研究で明らかにされた播種細胞の特性は、がん治療法を開発する上で、重要な知見であると考えられる。

研究成果の概要（英文）：To elucidate the process of metastasis and recurrence of colorectal cancer, we conducted analyses using organoids established from primary, metastatic, and recurrent tumors of the same patient. By visualizing cancer stem cells through genome editing and analyzing the organoid reconstitution process from single cells, we revealed the interactions between cancer stem cells and secretory cells. In orthotopic transplantation experiments in immunodeficient mice, changes in the metastatic potential and cellular diversity of organoids derived from primary, metastatic, and recurrent tumors were elucidated. Furthermore, in disseminated tumor cells detected in distant tissues of mice transplanted with primary tumor organoids, cancer stem cell markers had disappeared. These results indicate the importance of cellular plasticity in the development and metastatic process of cancer.

研究分野：細胞生物学

キーワード：大腸がん 患者由来オルガノイド

## 様式 C - 19、F - 19 - 1 (共通)

### 1. 研究開始当初の背景

大腸がんは、国内の部位別がん死亡数2位であり、年間5万2千人の患者が亡くなっている。ステージ別の5年生存率では、III期までは70%前後と予後良好であるのに対し、IV期になると20%以下に低下することから、転移・再発症例の治療法開発は喫緊の課題である。IV期の大腸がんに対しては、原発巣と転移巣の外科的切除が推奨され、全病巣を切除した後は、術後補助化学療法を行うことが一般的である。しかしながら、このような集学的治療にもかかわらず、再発を来すことも依然として多く、完治することは難しい。転移・再発の分子機構を明らかにし、コントロールする技術の開発が望まれる。

近年、患者由来オルガノイド(patient derived organoids, PDOs)の培養法等に代表される生体組織内の細胞不均一性を再現する組織培養法が確立されたことに加え、1細胞解析等の解析技術が普及したことにより、がん組織が多様な細胞で構成され、個々の細胞特性や細胞間相互作用の解析が進められている。我々は、これまでに21名のIV期大腸がん患者の原発・転移・再発巣の切除検体から樹立された72個のPDOsを解析し、がん幹細胞としてのOLFM4陽性細胞の機能が原発巣と転移・再発巣では異なる可能性を示した(Okamoto *et al*, 2021a)。しかし、そのがん組織の発生や転移・再発過程における生物学的な意義については、十分に理解されていない。

### 2. 研究の目的

がん組織は、がん幹細胞を頂点とする階層性をもつ多様な細胞集団が恒常性を保つことにより腫瘍を形成することが知られている。しかし、転移過程においては、一部のがん細胞が腫瘍から離脱し、血管浸潤、免疫細胞の攻撃回避、休止状態の維持、血管滲出を経て遠隔組織に運ばれ播種細胞として存在する。この過程では、がん細胞はそれぞれのステップで必要な機能を獲得するとともに、異なる微小環境に対して柔軟に細胞状態を変化させていると考えられることから、定常状態にある腫瘍を形成する腫瘍組織とは異なる特性を有していることが予想される。しかし、転移過程の細胞あるいは播種細胞の性質は明らかにされていない。

一般的に播種細胞は長い休止期を経たのち、再増殖することにより転移巣が顕在化すると考えられる。また、播種細胞は実臨床では検出不可能であるため、外科切除で顕在化した転移巣を除去しても残り、再発の原因となると考えられる。本研究課題では、どの様にして多様な細胞集団から構成されるがん組織が形成されるのか、また原発巣と播種細胞を経て再構成される転移・再発巣との違いについて、同一患者の原発巣、転移巣、再発巣から樹立されたオルガノイドを用いて明らかにすることを目的とした。

### 3. 研究の方法

本研究課題では、上記の目的を達成するために、*in vitro* および *in vivo* の実験系を構築した。

#### (1) ゲノム編集による遺伝子改変オルガノイドの作成

先行研究により同定されたマーカー遺伝子に、ゲノム編集により蛍光タンパク質遺伝子をノックインすることにより、がん幹細胞を可視化する遺伝子改変オルガノイドを作成した(Okamoto *et al*, 2021b)。また、自殺遺伝子をノックインすることにより、特異的な細胞除去が可能な遺伝子改変オルガノイドを作成した。

#### (2) *In vitro* オルガノイド再構成

ゲノム編集により可視化したがん幹細胞をFACSにより単離し、オルガノイドを再構成する実験系を確立した。再構成過程は一細胞遺伝子発現解析とイメージングにより解析した。

#### (3) 転移モデルマウスの確立

小型内視鏡を用いた免疫不全マウスの同所移植実験系を作成した。ヒト大腸がん由来オルガノイドを直腸に移植し、移植組織とオルガノイドが由来するヒト手術検体との比較を行い、モデルマウスとしての妥当性を検証するとともに、同一患者の原発巣、転移巣、再発巣由来オルガノイドの移植組織を比較することにより、がん進展に伴う細胞多様性の変化を検討した。

#### (4) *In vivo/ex vivo* イメージング

オルガノイドにルシフェラーゼ遺伝子を導入し、免疫不全マウスへの同所移植を行い、*in vivo* イメージングを行った。原発・転移・再発巣由来オルガノイドの転移能を評価するために、長期観察を行った。また、播種細胞などの微弱シグナルを検出するために、解析対象組織を摘出し *ex vivo* イメージングを行った。

### 4. 研究成果

#### (1) オルガノイド再構成における細胞間相互作用

先行研究によりヒト大腸がん組織の幹細胞として同定されたOLFM4陽性細胞を可視化するために、EGFP遺伝子をノックインしたオルガノイドからOLFM4陽性細胞をFACSにより分取し、オル

ガノイドの再構成を行った。その結果、OLFM4 陽性細胞の自己増殖が生じるという当初の予想に反し、培養初期にはOLFM4 陰性細胞が生じることが明らかになった。さらに一細胞遺伝子発現解析の結果、正常消化管組織の分泌系細胞と類似性が高い形質を持つ細胞集団が培養開始直後に産生されていることが示された。ゲノム編集によりがん幹細胞と分泌系細胞を可視化し、タイムラプスイメージングで解析を行った結果、がん幹細胞から分泌系細胞が直接産生されること、分泌系細胞が分泌するニッチ因子によりがん幹細胞の増殖が維持され、結果的にオルガノイド再構成効率が向上することが明らかになった。これらの結果から、がん細胞には APC 遺伝子や KRAS 遺伝子などに変異が生じているにも関わらず、がん幹細胞と分泌系細胞との相互作用ががん組織の発生に関わることが示された。

#### (2) 大腸がん組織の細胞多様性

小型内視鏡を用いてマウス直腸にヒト大腸がん由来オルガノイドを移植し、移植組織の組織学的解析を行った。IV 期大腸がん患者の原発巣から樹立されたオルガノイドの移植組織における消化管幹細胞マーカーの発現を検討した結果、OLFM4、LGR5、ASCL2 の発現が確認された。このうち ASCL2 は、ほぼ全ての細胞で発現しているのに対し、OLFM4 と LGR5 は一部に限局しており、この二つのマーカー遺伝子の発現は、一部重なっていることが確認された。一方、同一患者の転移巣と再発巣から樹立されたオルガノイドの移植組織では、ASCL2 の発現は検出されたのに対し、OLFM4 と LGR5 の発現は限定的で、低下していた。興味深いことにオルガノイドが由来する手術検体でも、原発巣では OLFM4 と LGR5 の発現が一部の細胞集団で確認されたのに対し、転移巣、再発巣では低下していた。これらの結果は、ヒト大腸癌では、原発巣のがん幹細胞を頂点とする階層性が転移過程において変化し、転移巣および再発巣では OLFM4/LGR5 陽性がん幹細胞が低下するという我々の先行研究の結果が、生体内でも生じていることを示す (Okamoto *et al.*, 2021a)。また、ヒト大腸癌由来オルガノイドの移植組織が、ヒトがん組織のがん幹細胞の挙動を再現するという結果は、本研究で作成した同所移植マウスのモデル動物としての妥当性を示す。

#### (3) 大腸癌組織の転移能

移植された患者由来オルガノイドの転移能を評価するために、ルシフェラーゼ遺伝子導入したオルガノイドの同所移植を行い長期観察を行なった。経時的な *in vivo* イメージングの結果、転移・再発巣由来オルガノイドでは、肝臓および肺にシグナルを認めたのに対し、原発巣由来オルガノイドでは明らかなシグナルは観察されなかった。移植巣のシグナルは、原発・転移・再発巣で違いは認められなかった。また、経過観察終了時に取り出された直腸、肝臓、肺の観察では、*in vivo* イメージングでルシフェラーゼシグナルが観察された臓器に存在する腫瘍が確認された。これらの結果から、転移・再発巣由来オルガノイドは原発巣に比べて高い転移能を有していることが明らかになり、ヒト生体内で転移過程を経て遠隔組織に到達したがん細胞は、その過程で転移能を獲得し、維持することが示唆された。

#### (4) 播種細胞の同定

原発巣由来オルガノイドの *in vivo* イメージング解析では、移植後 57 週までの経過観察で、転移を検出することがなく、また取り出された組織に腫瘍は確認されなかった。しかし、ルシフェラーゼ発光を指標とする *ex vivo* イメージング解析では肝臓に微弱シグナルを検出した。このような微弱シグナルは移植後 7 週目から 57 週まで観察されたことから、比較的早い時期に遠隔組織に到達し、長期間 dormant な状態を維持する。組織学的解析では、数個の集団を形成し、興味深いことに、ASCL2 を発現し、OLFM4 と LGR5 は発現していなかった。これらの観察から、遠隔組織の播種細胞は、原発巣とは異なる細胞集団で構成されていることが明らかになった。

#### 【参考文献】

Okamoto T, duVerle D, Yaginuma K, Natsume Y, Yamanaka H, Kusama D, Fukuda M, Yamamoto M, Perraudeau F, Srivastava U *et al* (2021a) Comparative Analysis of Patient-Matched PDOs Revealed a Reduction in OLFM4-Associated Clusters in Metastatic Lesions in Colorectal Cancer. *Stem cell reports* 16: 1-14

Okamoto T, Natsume Y, Yamanaka H, Fukuda M, Yao R (2021b) A protocol for efficient CRISPR-Cas9-mediated knock-in in colorectal cancer patient-derived organoids. *STAR Protoc* 2: 100780

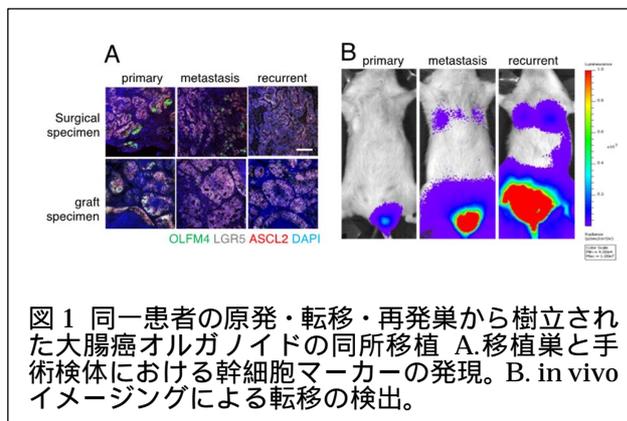


図 1 同一患者の原発・転移・再発巣から樹立された大腸癌オルガノイドの同所移植 A.移植巣と手術検体における幹細胞マーカーの発現。B. *in vivo* イメージングによる転移の検出。

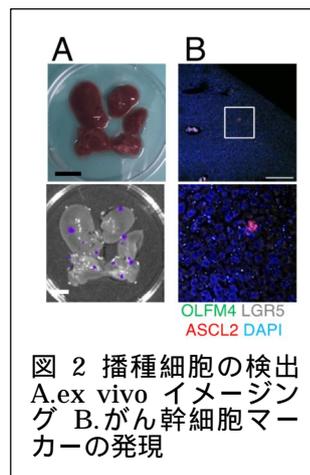


図 2 播種細胞の検出 A. *ex vivo* イメージング B. がん幹細胞マーカーの発現

## 5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計8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 5件）

1. 著者名 Sakahara Mizuho, Okamoto Takuya, Srivastava Upasna, Natsume Yasuko, Yamanaka Hitomi, Suzuki Yutaka, Obama Kazutaka, Nagayama Satoshi, Yao Ryoji	4. 巻 7
2. 論文標題 Paneth-like cells produced from OLFM4+ stem cells support OLFM4+ stem cell growth in advanced colorectal cancer	5. 発行年 2024年
3. 雑誌名 Communications Biology	6. 最初と最後の頁 27
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1038/s42003-023-05504-8	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 Saeki Sumito, Kumegawa Kohei, Takahashi Yoko, Yang Liying, Osako Tomo, Yasen Mahmut, Otsuji Kazutaka, Miyata Kenichi, Yamakawa Kaoru, Suzuka Jun, Sakimoto Yuri, Ozaki Yukinori, Takano Toshimi, Sano Takeshi, Noda Tetsuo, Ohno Shinji, Yao Ryoji, Ueno Takayuki, Maruyama Reo	4. 巻 25
2. 論文標題 Transcriptomic intratumor heterogeneity of breast cancer patient-derived organoids may reflect the unique biological features of the tumor of origin	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 Breast Cancer Research	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） 10.1186/s13058-023-01617-4	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 Okamoto Takuya, Natsume Yasuko, Doi Motomichi, Nosato Hirokazu, Iwaki Toshiyuki, Yamanaka Hitomi, Yamamoto Mayuko, Kawachi Hiroshi, Noda Tetsuo, Nagayama Satoshi, Sakanashi Hidenori, Yao Ryoji	4. 巻 113
2. 論文標題 Integration of human inspection and artificial intelligence based morphological typing of patient derived organoids reveals interpatient heterogeneity of colorectal cancer	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Cancer Science	6. 最初と最後の頁 2693-2703
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1111/cas.15396	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 八尾 良司	4. 巻 48
2. 論文標題 患者由来オルガノイドを用いた細胞個性解析	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Medical Science Digest	6. 最初と最後の頁 585-588
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 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 大隅 寛木, 篠崎 英司, 大木 暁, 八尾 良司	4. 巻 45
2. 論文標題 BRAF V600E変異陽性大腸癌オルガノイドを用いたEGFR、BRAF及びMAPK阻害の耐性に関わるバイオマーカーの解明	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 大和証券ヘルス財団研究業績集	6. 最初と最後の頁 58-63
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 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 Okamoto Takuya, Natsume Yasuko, Yamanaka Hitomi, Fukuda Mayuko, Yao Ryoji	4. 巻 2
2. 論文標題 A protocol for efficient CRISPR-Cas9-mediated knock-in in colorectal cancer patient-derived organoids	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 STAR Protocols	6. 最初と最後の頁 100780 ~ 100780
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.xpro.2021.100780	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 Maru Yoshiaki, Tanaka Naotake, Tatsumi Yasutoshi, Nakamura Yuki, Yao Ryoji, Noda Tetsuo, Itami Makiko, Hippo Yoshitaka	4. 巻 255
2. 論文標題 Probing the tumorigenic potential of genetic interactions reconstituted in murine fallopian tube organoids	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 The Journal of Pathology	6. 最初と最後の頁 177 ~ 189
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1002/path.5752	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 Okamoto Takuya, et al.	4. 巻 16
2. 論文標題 Comparative Analysis of Patient-Matched PDOs Revealed a Reduction in OLFM4-Associated Clusters in Metastatic Lesions in Colorectal Cancer	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Stem Cell Reports	6. 最初と最後の頁 954 ~ 967
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.stemcr.2021.02.012	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14件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 八尾 良司
2. 発表標題 大腸がん組織の恒常性維持機構の解明
3. 学会等名 日本患者由来がんモデル学会学術集会
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 長山 聡、坂原 瑞穂、岡本 拓也、鈴木 穰、小濱 和貴、八尾 良司
2. 発表標題 大腸癌におけるPaneth様細胞はOLFM4陽性幹細胞から派生し、同細胞の増殖を支持する
3. 学会等名 第82回日本癌学会学術総会
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 八尾 良司
2. 発表標題 患者由来オルガノイドから見てきたがん組織の細胞社会ダイバーシティ
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 長山 聡、岡本 拓也、八尾 良司
2. 発表標題 患者由来大腸癌オルガノイドのAIによる形態タイピングの試み
3. 学会等名 第81回日本癌学会学術総会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 八尾 良司
2. 発表標題 同一患者に由来するヒト大腸がんオルガノイドを用いたがんの発生・転移機構の解明
3. 学会等名 第81回日本癌学会学術総会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 八尾 良司
2. 発表標題 患者由来オルガノイドを使った大腸癌組織細胞多様性の解析
3. 学会等名 第4回 学際的がん研究 夏の学校@別府
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 八尾 良司
2. 発表標題 消化管組織の細胞社会ダイバーシティ
3. 学会等名 細胞社会ダイバーシティの統合的解明と制御 研究成果報告 公開シンポジウム 細胞社会ダイバーシティの理解と制御 -これまでとこれから-
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 八尾 良司
2. 発表標題 転移・再発に伴う大腸がん組織の細胞不均一性の変化
3. 学会等名 第25回日本がん分子標的治療学会学術集会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 坂原 瑞穂、八尾 良司
2. 発表標題 Kras変異に伴う消化管腫瘍組織の変化
3. 学会等名 2021年度先端モデル動物支援プラットフォーム「若手支援技術講習会」
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 八尾 良司
2. 発表標題 Patient derived organoidsの基本と応用
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 八尾 良司、長山 聡、岡本 拓也
2. 発表標題 転移に伴う細胞不均一性の変化
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 柳沼 克幸、岡本 拓也、長山 聡、八尾 良司
2. 発表標題 ヒト大腸がん由来オルガノイド移植マウスモデルにおける転移播種がん細胞のEMT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 岡本 拓也、柳沼 克幸、長山 聡、小濱 和貴、八尾 良司
2. 発表標題 患者由来大腸がんオルガノイド同所移植マウスモデルにおける転移播種細胞
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 長山 聡、岡本 拓也、八尾 良司
2. 発表標題 患者由来大腸癌オルガノイドを用いた細胞分化プロセスの解析
3. 学会等名 第80回日本癌学会学術総会
4. 発表年 2021年

〔図書〕 計1件

1. 著者名 藤田 直也	4. 発行年 2021年
2. 出版社 羊土社	5. 総ページ数 220
3. 書名 がん微小環境に1細胞レベルで挑む	

〔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 分担者	新井田 厚司  (NIIDA Atsushi)  (00772493)	東京大学・医科学研究所・講師    (12601)	

6. 研究組織（つづき）

	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
研究分担者	丸山 玲緒  (MARUYAMA Reo)  (60607985)	公益財団法人がん研究会・がん研究所 がんエピゲノムプロジェクト・プロジェクトリーダー   (72602)	
研究分担者	長山 聡  (NAGAYAMA Satoshi)  (70362499)	京都大学・医学研究科・客員研究員   (14301)	

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