

科学研究費助成事業 研究成果報告書

令和 5 年 6 月 5 日現在

機関番号：16101

研究種目：若手研究

研究期間：2021～2022

課題番号：21K15551

研究課題名(和文)オルガノイドを用いたGAPPSにおける発癌機序の解析

研究課題名(英文)Analysis of the carcinogenesis with GAPPS patients

研究代表者

三井 康裕 (MITSUI, Yasuhiro)

徳島大学・病院・特任助教

研究者番号：80792366

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,600,000円

研究成果の概要(和文)：GAPPSと診断された計7家系、16名を被検者とした。年齢中央値は43.5歳(18-84)、男：女=7：9、担癌患者は8名であり、病期はI期：3名、II期：1名、III期：4名であった。14例においてAPC遺伝子 exon1Bに変異を認め、背景粘膜、異形成、癌を用いた遺伝子プロファイリングでは遺伝子A、B、Cの関与が示唆された。特に遺伝子Aでは組織ごとに多彩な遺伝子変異が生じており、発癌経路に関与していると考えられた。また、癌細胞には背景粘膜に認めない染色体異常があり、発癌に関与していると考えられた。各組織のオルガノイド樹立を実施しており、培地に必要な因子の同定を行った。

研究成果の学術的意義や社会的意義

GAPPSの病態および臨床指針は全世界的に未確立であり、その発癌機序の解明は治療方針の策定において重要な貢献をもたらす。遺伝子プロファイリングの解析により発癌に関与するドライバー遺伝子の候補が挙がり、これに基づいた治療薬開発につながるものと考えられる。また、発癌機序が多彩であることが判明しており、GAPPS関連胃癌における予後不良因子である可能性がある。染色体異常に関しては未報告であり、今後の核酸医薬品や遺伝子関連治療薬の開発にも重要な知見をもたらした。GAPPSは希少疾患ゆえ、病態解析を行うことが困難とされているが、オルガノイド樹立により候補薬剤ごとの網羅的解析を十分に行うことが期待される。

研究成果の概要(英文)：We included 7 GAPPS families (16 patients) in the analysis. Median age was 43.5 (18-84) years old and male was 7. 8 patients had gastric cancer (stage I/II/IV=3:1:4). Germline analysis of the APC gene were performed with direct-sequencing method, and thus 14 patients had the point mutation of APC exon 1B. Genomic carcinogenesis analysis with biopsy specimen of normal mucosa, dysplasia and adenocarcinoma demonstrated that the gene A, B and C were associated with carcinogenesis of GAPPS patients. In particular, gene A was variously muted in each specimen, therefore that revealed the relation to carcinogenesis. On the other hand, chromosomal analysis demonstrated that chromosomal abnormality was also associated with carcinogenesis. Organoids were established with the particular growth factors.

研究分野：消化器内科学

キーワード：GAPPS 発癌機序 オルガノイド

1. 研究開始当初の背景

本邦において、胃癌は男性では最も罹患率が高く、女性でも乳癌に次いで第二位の罹患率を呈している。本邦における胃癌発症は、多くの場合、*Helicobacter pylori* 感染に伴う慢性炎症を背景とする発癌とされている。

一方、胃癌のうち1%程度では家族性胃癌とされている(Shinmura K, et al: Carcinogenesis. 1999)。これまで、家族性びまん性胃癌、家族性大腸腺腫症(Familial adenomatous polyposis; FAP)、Lynch 症候群、Li-Fraumeni 症候群、若年性ポリポージスを背景とした家族性胃癌が報告されている。そのような中、Worthley らは新規の家族性胃癌として Gastric adenocarcinoma and proximal polyposis of the stomach (GAPPS) 3家系を報告した(Worthley DL, et al: Gut. 2012)。

GAPPS は胃底腺ポリポージス(Fundic gland polyposis; FGPs)を背景とした胃癌であり、FAP で認められる十二指腸あるいは大腸ポリポージスを有さないことを特徴とする。従来、胃底腺ポリリープは悪性化は極めて稀とされていた。しかし、FAP を背景とする FGPs に胃癌を発症した症例が報告され (Hofgärtner WT, et al: Am J Gastroenterol. 1999)、遺伝性疾患を背景とする FGPs では悪性ポテンシャルを有すると考えられるようになった。GAPPS においても高い悪性度を呈することが報告されており、発癌経路の解析と治療法の開発が急務となっている。

GAPPS は常染色体顕性遺伝性疾患である Li らは GAPPS 6家系において *Adenomatous polyposis coli* (*APC*) 遺伝子 Exon 1B 変異が集積していることを報告し、これが責任遺伝子であるとした (Li J, et al: Am J Hum Genet. 2016)。しかし、いずれの家系も欧州からの報告であり、本邦を含むアジア地域では GAPPS 家系の報告は見られなかったが、研究者はアジア初の GAPPS 家系を報告した(Mitsui Y, et al: Gastric cancer. 2018)。

GAPPS は臨床的悪性度が高い腫瘍であることから、発癌予防の確立が急務である。しかし、外科的胃全摘術は侵襲性が極めて高く、術後の Quality of Life (QOL) 低下が必発である。従って、発癌機序の解明および化学予防の確立が重要と考えられる。

近年、Golub らは約 1300 種類の小分子化合物を種々の培養癌細胞に添加し、マイクロアレイ解析により得られた遺伝子発現プロファイルを変化させ、Connectivity Map を作成した。疾患組織と正常組織における遺伝子発現プロファイルから疾患別の signature を作成すれば、これらを負に打ち消す(打ち消す)作用の薬剤を網羅的に検索することが可能となる (Golub, et al: Science. 2006)。これを GAPPS に応用することにより、有望な発癌予防薬を開発することが可能である。さらに、米国 FDA 承認の既知薬などにより予防薬を抽出するため開発コストを抑えることができ、ひいては医療費の大幅な削減が可能と考えられる。

2. 研究の目的

本研究は GAPPS 関連胃癌における発癌機序の解明、適切な化学予防および治療薬開発を目的とする。GAPPS の病態および臨床指針は全世界的に未確立であり、これを開発することで患者への不要な侵襲性を回避しうるオーダーメイド診療への実現を期待できる。本研究の特色として、GAPPS に予防あるいは治療効果を有する候補薬を遺伝子発現プロファイルに基づき、Connectivity Map を用いて網羅的に解析を行うことである。GAPPS 家系が極めて稀であることから本研究の意義は大きいと考える。また、候補薬剤は既に本邦で承認されている薬剤がほとんどを占めており、検証結果を速やかに臨床還元できる可能性が高い。このような既存の薬剤の再開発は、drug repositioning という観点からも重要性が高い。

3. 研究の方法

(1) GAPPS 関連胃癌における遺伝子プロファイリング

GAPPS 患者より同意を得た上で、各種組織検体を保存しており、これを用いた遺伝子プロファイリングを行う。GAPPS 患者の癌、胃底腺ポリリープ、背景粘膜組織より DNA を抽出し、これを用いて Whole exon sequence (WES) を行い、組織間で発現に変化のある遺伝子を抽出する。これにより疾患特異的 signature を作成する。

(2) GAPPS 関連胃組織のオルガノイド樹立

GAPPS 患者の各組織(癌、胃底腺ポリリープ、背景粘膜)よりオルガノイドを樹立する。樹立したオルガノイド組織の遺伝子プロファイリングが元組織と一致することを確認する。

(3) オルガノイドを用いた発癌モデルの確立

GAPPS 由来組織より樹立したオルガノイドに遺伝子導入を行い、増殖能、転移・浸潤能の獲得を評価する。その上で GAPPS 胃癌モデルを確立する。

胃底腺ポリリープ由来のオルガノイド(Fundic gland polyp associated organoid; Fa0) に対して CRISPR-Cas9 (clustered regularly interspaced short palindromic repeats/CRISPR associated proteins) を用いて癌組織にて高発現している遺伝子を導入する。得られた Fa0 の遺伝子プロファイルを癌由来のオルガノイド(Cancer associated organoids; Ca0)と比較し、その相同性を確認する。増殖能、転移・浸潤能

を Cell-counting Kit, invasion assay および scratch assay により評価する。
樹立したオルガノイドをマウス皮下組織に移植し, GAPPS 胃癌モデルを確立する。

(4) オルガノイドを用いた治療薬の探索

(3)で樹立したオルガノイド組織に対し, 遺伝子プロファイリングにて抽出された標的遺伝子をターゲットとした薬剤を添加し, 抗腫瘍効果の有無を検討する。

GAPPS 胃癌モデルマウスに有効性を示した薬剤を投与し, 生体内での抗腫瘍効果を確認する。

(5) オルガノイドを用いた化学予防薬の開発

In silico 解析にて有用性が示唆される化学予防薬を抽出する。これを Fa0 移植マウスに投与し, FGPs の発生抑制の可能性を検討する。

4. 研究成果

(1) GAPPS 患者または血縁者の臨床病理学的特徴

本研究に参加した被験者は, GAPPS と診断された計 7 家系, 16 名であった。年齢中央値は 43.5 歳 (18-84), 男:女=7:9 であった。担癌患者は 8 名であり, 病期は I 期:3 名, II 期:1 名, III 期:4 名であった。I 期症例の治療方針は, 内視鏡的粘膜下層剥離術 (1 例), 幽門側胃切除術 (1 例), 無治療経過観察 (1 例) であった。II 期はいずれも全身化学療法を実施されていた。胃底腺ポリポーシスは 13 例で認められ, ポリポーシスを認めなかった症例はいずれも *Helicobacter pylori* 感染例 (既感染を含む) であった。生殖細胞系列における APC 遺伝子解析では, 検索を行った 15 例のうち 14 例で APC exon1B に点突然変異 (c. -191T>C) を認めた。

GAPPS において, 褪色调表面隆起型病変が多発する傾向を認めた。16 例中 9 例で褪色调病変が存在しており, 女性でやや多い傾向にあった (2:7)。発生年齢中央値は 36 歳 (20-59) であり, 存在個数中央値は 7 個 (1-10) であった。サイズ中央値は 9mm (5-40), 局在として上部に存在しやすい傾向を認めた (U:M:L=37:13:0)。

(2) GAPPS 関連胃癌の遺伝子プロファイリング

背景胃粘膜 (Normal) および異形成 (Dysplasia) より採取した生検検体を用いて網羅的遺伝子プロファイリングを実施した。その結果, driver 遺伝子として考えられる遺伝子を 3 種類同定した (遺伝子 A, B, C)。

遺伝子 A, 遺伝子 B について詳細な変異解析を行ったところ, 検体間で遺伝子変異部位が異なり, 多彩な遺伝子型を呈することが判明した。

遺伝子 B は Dysplasia 検体において変異部位は概ね同部位に存在しており, 背景粘膜においては変異を認めなかった。

一方, 遺伝子 A については変異部位, 変異数ともに多様性が認められた。遺伝子 A 変異は被験者間において差異が大きいだけでなく, 同一被験者より採取した検体間においても変異部位および頻度は多彩となっていた。この結果より, Normal に多彩な遺伝子変異が生じることで dysplasia に移行していることが想定された。

続いて, 被験者から採取した癌細胞の染色体解析を行ったところ, 分析細胞に高度の染色体異常を認めた。これは同一被験者の胃底腺ポリポーシス検体を用いた検索では同様の染色体異常は同定されず, また, 他被験者検体より採取した胃底腺ポリポーシス検体においても, 染色体異常は明らかではなく, 胃底腺ポリポーシスから発癌に至る過程において, 染色体異常が関与している可能性が示唆された。

(3) オルガノイド樹立

被験者より採取した背景胃粘膜 (Normal), 胃底腺ポリポーシス (FGP), 癌 (Adenocarcinoma), 腹水由来癌細胞 (ascites-Adenocarcinoma) を用いてオルガノイド樹立を行った。

まず, 樹立するための培地を検討した。GAPPS において, 生殖細胞系列として APC promotor 1B 変異を有しており, Wnt-signaling は恒常的に活性化している可能性が想定された。そこで, 既報をベースに培地組成に必要な最小限度の因子を検討することとした。Wnt 経路因子として, R-spondin 1, Wnt CM, CHIR を各々除去した培地で培養したが, これを除いてもオルガノイドの発育を得た。これは Adenocarcinoma, ascites-Adenocarcinoma において同様であり, さらに FGP においても同様に十分に発育を確認し得た。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔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
--	---------------------------	-----------------------	----

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