

令和 5 年 5 月 30 日現在

機関番号：17102

研究種目：若手研究

研究期間：2021～2022

課題番号：21K16451

研究課題名(和文) IPMNオルガノイドモデルの創出と遺伝子スクリーニングによる悪性化機序の解明

研究課題名(英文) Creation of IPMN organoid model and elucidation of malignant transformation mechanism by genetic 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) 3,600,000円

研究成果の概要(和文)：本研究は膵癌の前癌病変であるIPMN(膵管内乳頭粘液性腫瘍)の悪性化の過程を分子生物学的に明らかにすることが目的である。IPMNオルガノイドの樹立手技確立のために、ヒト膵癌手術検体を用いた膵癌オルガノイドを作成し実際の組織標本と比較した。膵癌オルガノイドはprimary tumorの形態学的特徴が保持されていた。膵癌オルガノイドの分化度が高いほど微小環境因子へ強く依存しており、分化度の特徴である管腔構造形成には微小環境因子が必須であった。IPMNオルガノイドの樹立には至っていないが、樹立に必要な微小環境因子を同定予定であり、腫瘍免疫微小環境中の免疫細胞のクラスタリング手技を確立した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

膵癌の前癌病変と考えられるIPMNは低悪性度腫瘍であるため、2D培養では維持が困難である。3D培養による擬性構造体であるオルガノイドは、膵癌オルガノイドと実際の組織標本と比較することで分化度に応じた形態学的特徴が維持されることがわかった。分化度が高いほど周囲の微小環境因子に依存していたため、IPMNオルガノイドの樹立・維持には微小環境因子の評価が必要であることが示唆された。微小環境因子はCAFが供給していると考えられ、IPMNオルガノイドと腫瘍微小環境におけるCAFとの関係を解明することは、IPMNの悪性化機序の解明につながると期待される。

研究成果の概要(英文)：The purpose of this study was to elucidate the malignant transformation process of IPMN (intraductal papillary mucinous neoplasm), a precancerous lesion of pancreatic cancer, using molecular biological techniques. PDAC organoids retained the morphological characteristics of primary tumors. We have not yet established IPMN organoids, but we are planning to identify niche factors that are necessary for the establishment of IPMN organoids. We established a technique for clustering immune cells in the tumor immune microenvironment using single cell RNA seq in surgical specimens of esophageal cancer.

研究分野：医歯薬学

キーワード：IPMN オルガノイド 腫瘍微小環境 微小環境因子 scRNA-seq

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

IPMN(膵管内乳頭粘液性腫瘍)は膵癌の前癌病変であることが知られている。IPMN の多くは低悪性度腫瘍であるが、一旦癌化すると通常型膵癌と同様に早期に転移、浸潤をきたすため(IPMN 由来浸潤癌)、適切な画像診断やフォローアップが必要とされている。また、IPMN と診断された症例では IPMN とは離れた部位に通常癌膵癌(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ており、IPMN 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つながると期待される。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、その悪性化過程でどのように遺伝子変異が蓄積し、周囲微小環境を改変していくかについては未だ不明である。これまでこの領域の研究の多くは患者の血液、膵液、切除組織といった臨床検体を用いて行われてきたが、これらの採取には制限があり、基礎研究に使用可能な疾患モデルの確立は急務と考えられる。

2. 研究の目的

ここ数年で IPMN を疑似化した遺伝子改変マウスモデルがいくつかの施設から報告され、新たな知見をもたらしている。これらのマウスモデルはヒトの IPMN に類似した病理像を呈し、非常に有用な研究材料である一方で、マウスの交配・繁殖・維持には費用と労力を要するという問題点も抱えている。そこで我々はマウス膵臓由来のオルガノイドの作成を計画した。オルガノイドは 3D 培養による擬製構造体で、2D 培養では維持が困難な正常細胞あるいは前癌病変由来の細胞も維持が可能であることが報告されている。つまり、オルガノイドは IPMN のような低悪性度腫瘍の研究も可能にし得る培養系であることが期待される。樹立した膵オルガノイドには Kras、Gnas、Rnf43 といった遺伝子変異を導入することで、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 を作成することを計画している。このモデルは同所移植モデルであるため自然発生である遺伝子改変マウスに比べるとやや人為的なモデルとなるのが欠点ではあるが、マウスの系統維持が必要ないため、大規模な動物実験施設を必要としないため将来的に多くの研究施設で利用可能な点と、正常な免疫機構を有しているため、免疫細胞を含めた腫瘍微小環境解析に有用なモデルであるという点において独創的で汎用性の高いモデルである。さらに syngenic model の確立に成功した場合、我々は網羅的な遺伝子スクリーニングである CRISPR Screening による IPMN 癌化の責任遺伝子同定を予定している。

3. 研究の方法

IPMN 膵オルガノイド、syngenic model の確立

p48-Cre/LSL-KrasG12D のダブルヘテロマウスを作成後、膵臓を採取し膵オルガノイドを樹立する。樹立した膵オルガノイドにレンチウイルスを用いた遺伝子導入を行い、A)Kras 変異のみ、B)Kras 変異+Gnas 変異、C)Kras 変異+Rnf43 変異、D)Kras 変異+Gnas 変異+Rnf43 変異の 4 種類のオルガノイドを作成する。作成したオルガノイドを C57BL/6 マウスの膵臓に同所移植し、それぞれの病理像を比較検討する。

CRISPR Screening による IPMN 悪性化責任遺伝子の同定

樹立した膵オルガノイドを CRISPR Screening の pooled library を含んだウイルスに感染させたのち、C57BL/6 マウスの膵臓に同所移植する。膵臓に腫瘍形成がみられたら、マウスを安楽死させ腫瘍を摘出する。腫瘍から DNA を抽出して 2 段階の PCR を行ってライブラリーを作成する。次世代シーケンサーにかけて解析を行い、IPMN 悪性化責任遺伝子を同定する。

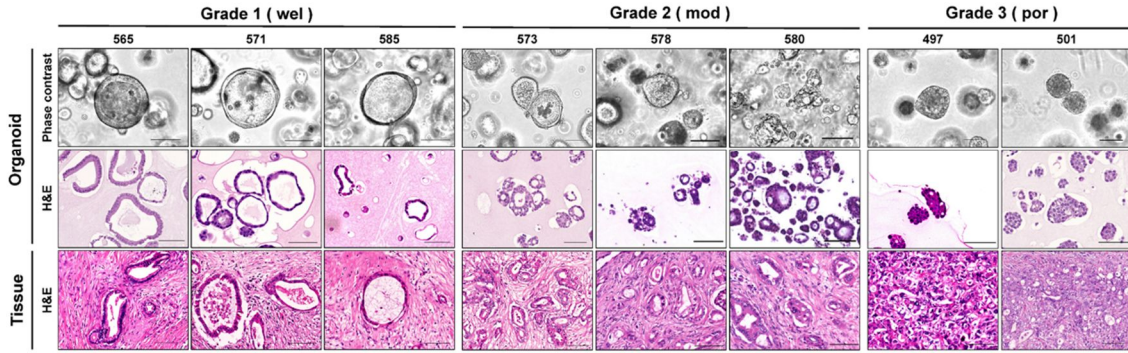
Single cell RNA seq による IPMN 癌化過程での微小環境解析

IPMN 癌化誘導遺伝子が同定されたら、CRISPR を用いて IPMN 膵オルガノイドにその遺伝子変異を導入する。C57BL/6 マウスにオルガノイドを同所移植し、経時的に膵臓を回収して Single cell RNA seq を行い、IPMN 癌化過程での微小環境の変化を解析する。

4. 研究成果

まずオルガノイドの樹立手技の確立のため、ヒト膵癌組織を採取し膵癌オルガノイドの樹立を行った。この膵癌オルガノイドをパラフィン固定後に H&E 染色し形態学的評価を行った。実際の組織標本と比較し、膵癌オルガノイドは全て primary tumor の形態学的特徴を保持していることを確認した(図 1)。さらに、膵癌オルガノイドは分化度が高いほど微小環境因子へ強く依存しており、分化度の特徴である管腔構造形成には微小環境因子が必須であった(図 2)。遺伝子導入による 4 種類の膵オルガノイドの樹立には至っていないが、これらの知見から今後は IPMN オルガノイドの樹立に必要な微小環境因子の同定を検討している。

図1.分化度の異なる膵癌オルガノイドの樹立



Single cell RNA seqを用いた微小環境解析については、IPMN オルガノイドの樹立に至らなかったため、手技の確立のためヒト食道癌検体を使って解析を行った。食道癌においては腫瘍免疫微小環境中の3次リンパ組織様構造(TLS)と呼ばれる構造物の機能的影響を評価した。食道癌では12のTIL-Bサブタイプを特定し、それぞれの遺伝子発現を比較し機能的評価を行った。これらの手技を用いて、腫瘍組織内の様々な細胞種へのクラスター分類が可能となり、IPMN 癌化過程における腫瘍免疫微小環境の変化の解明につながると考えられる。

図2.分化度と微小環境因子の関係

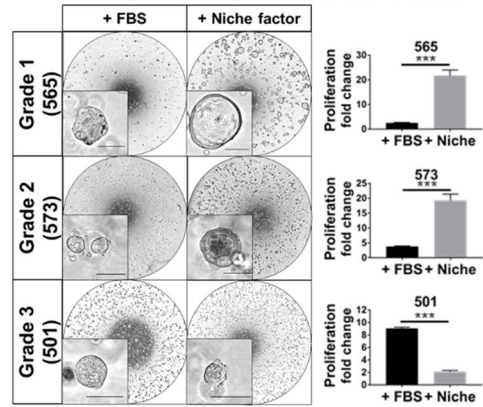
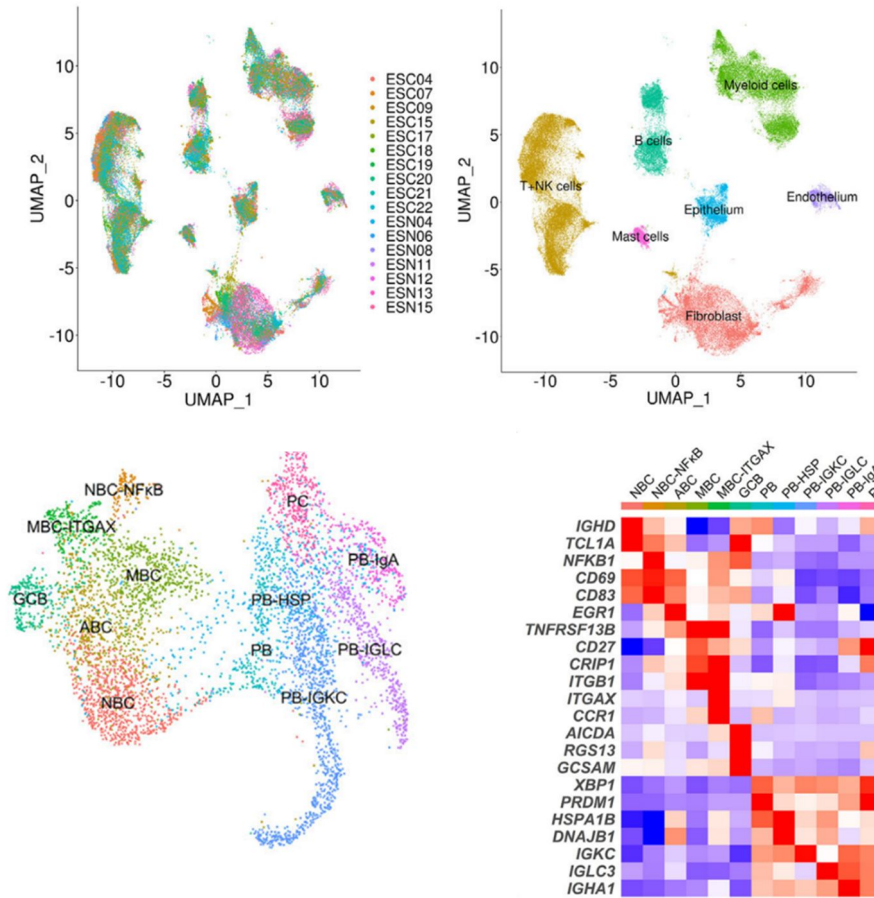


図3. Single cell RNA seq



5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計2件（うち査読付論文 2件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 2件）

1. 著者名 Nakamura S, Ohuchida K, Ohtsubo Y, Yamada Y, Tsutsumi C, Okuda S, Hisano K, Mochida Y, Shinkawa T, Iwamoto C, Torata N, Mizuuchi Y, Shindo K, Nakata K, Moriyama T, Torisu T, Nagai E, Morisaki T, Kitazono T, Oda Y, Nakamura M.	4. 巻 13
2. 論文標題 Single cell transcriptome analysis reveals functional changes in tumour infiltrating B lymphocytes after chemotherapy in oesophageal squamous cell carcinoma	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 Clinical and Translational Medicine	6. 最初と最後の頁 e1181
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1002/ctm2.1181	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 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7件（うち招待講演 0件/うち国際学会 0件）

1. 発表者名 堤親範、大内田研宙、中村祥一、奥田翔、久野恭子、大坪慶志輝、進藤幸治、森山大樹、水内祐介、仲田興平、中村雅史
2. 発表標題 scRNA-seqを用いた胃癌cancer-associated fibroblastのheterogeneityの解明
3. 学会等名 JDDW2022(第30回日本消化器関連学会週間)
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 奥田翔、大内田研宙、寅田信博、永吉絹子、水内祐介、進藤幸治、池永直樹、森山大樹、仲田興平、中村雅史
2. 発表標題 scRNA-seqを用いた食道扁平上皮癌浸潤マクロファージに対する術前化学療法の影響の解明
3. 学会等名 第77回日本消化器外科学会総会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 中村祥一、大内田研宙、奥田翔、大坪慶志輝、寅田信博、水内祐介、進藤幸治、仲田興平、森山大樹、中村雅史
2. 発表標題 シングルセル解析を用いた食道癌内B細胞における機能解析
3. 学会等名 第77回日本消化器外科学会総会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 中村祥一、大内田研宙、奥田翔、大坪慶志輝、寅田信博、水内祐介、進藤幸治、仲田興平、森山大樹、中村雅史
2. 発表標題 scRNA-seqを用いた術前化学療法に伴う食道癌内B細胞の不均一性の変動の解析
3. 学会等名 第122回日本外科学会定期学術集会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 中村祥一、大内田研宙、奥田翔、大坪慶志輝、寅田信博、水内祐介、進藤幸治、仲田興平、森山大樹、中村雅史
2. 発表標題 シングルセル解析による食道癌内の腫瘍浸潤マクロファージの食作用の評価
3. 学会等名 第29回日本消化器関連学会週間 (JDDW 2021)
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 奥田翔、大内田研宙、大坪慶志輝、中村祥一、久野恭子、持田郁己、新川智彦、寅田信博、水内祐介、進藤幸治、森山大樹、仲田興平、中村雅史
2. 発表標題 Single-cell RNA-sequenceを用いた食道扁平上皮癌の免疫環境についての解析
3. 学会等名 第29回日本消化器関連学会週間 (JDDW 2021)
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 久野恭子、水内祐介、大内田研宙、中村祥一、奥田翔、大坪慶志輝、佐田政史、永吉絹子、寅田信博、進藤幸治、仲田興平、森山大樹、永井俊太郎、中村雅史
2. 発表標題 Single cell RNA sequenceを用いた家族性大腸腺腫症におけるmacrophageのheterogeneityの解明
3. 学会等名 第29回日本消化器関連学会週間 (JDDW 2021)
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	中村 祥一 (NAKAMURA Shoichi)		
研究協力者	奥田 翔 (OKUDA Sho)		

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