

平成 26 年 5 月 27 日現在

機関番号：32612

研究種目：若手研究(A)

研究期間：2012～2013

課題番号：24689036

研究課題名(和文) ヒト大腸癌幹細胞の同定と標的治療の確立

研究課題名(英文) Identification of human colorectal cancer stem cells.

研究代表者

佐藤 俊朗 (Sato, Toshiro)

慶應義塾大学・医学部・特任准教授

研究者番号：70365245

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 19,800,000円、(間接経費) 5,940,000円

研究成果の概要(和文)：我々は、ヒト大腸上皮細胞よりオルガノイドを樹立し、ゲノム編集技術による遺伝子操作法を確立した。本法により、人工的な遺伝子変異導入による大腸癌がんメカニズムの解明に迫った。さらに、ヒト大腸癌幹細胞の同定のため、LGR5遺伝子領域への細胞系譜解析レポーターの遺伝子ノックインに成功した。遺伝子改変オルガノイドは免疫不全マウスへの異種移植により、患者病理組織を反映した大腸癌組織の形成を示した。ゲノム編集技術による自在なヒト大腸上皮細胞の遺伝子操作は大腸癌がんメカニズムの解明、遺伝子変異に着目した創薬や患者大腸癌の個別治療応用などの臨床応用が期待できる。

研究成果の概要(英文)：We have established intestinal organoids from human intestinal epithelium and applied genome engineering system to organoids. With this approach, we introduced multiple driver mutations in to human intestinal organoids to elucidate the mechanism of colorectal carcinogenesis. Furthermore, we knocked-in reporter to LGR5 locus of intestinal organoids using genome editing. Owing to the genetic silencing of Lgr5 promoter, we are attempting to employ other stem cell genetic markers. We also established xenotransplantation system with engineered organoids or colorectal cancer organoids. The organoids were readily engrafted and form tumor recapitulating clinical colorectal cancer. Our results suggest that engineered organoid system provide new insights into the understanding of human colorectal cancer. The platform will be useful not only to elucidate cell biological mechanism of colorectal cancer stem cells but also to apply genetic mutation based drug discovery and personalized medicine.

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：内科系臨床医学・消化器内科学

キーワード：大腸がん 幹細胞

1. 研究開始当初の背景

大腸癌の罹病率は本邦において増加傾向にあり、2015年には癌死亡原因の第1位になるとされている。近年の集学的治療の進歩により大腸癌の生存率は改善しているが、治療抵抗例も多く、進行癌の死亡率は依然として高い。最近、化学療法に対して抵抗性を示す癌幹細胞が腫瘍組織全体の供給をしながら拡大・浸潤をしていくという癌幹細胞仮説が支持されている。

2. 研究の目的

本研究は、論争中の癌幹細胞の存在と技術的な問題点を踏まえ、申請者の開発した培養技術(Sato T et al. Nature 2009, Sato T et al. Nature 2011, Jung P, Sato T et al. Nature Medicine 2011, Sato T et al. Gastroenterology 2011) を利用したヒト大腸癌幹細胞の Genetic Lineage Tracing および Genetic Ablation を行う。本研究は大腸癌幹細胞の同定と癌幹細胞を標的とした新しい治療法の開発を目的としたトランスレショナルリサーチである。

3. 研究の方法

ヒト大腸手術検体または内視鏡生検検体から、正常腸管上皮および大腸癌組織を採取し、申請者の開発した方法によりオルガノイドを樹立する。樹立したオルガノイドに対し、ゲノム編集技術を用いた遺伝子ノックアウト・ノックイン技術の導入を行う。人工的な大腸発がん系確立のため、ドライバー遺伝子と呼ばれる、大腸発がんへの寄与が統計学的に確認されている遺伝子群をノックインまたはノックアウトする。さらに、大腸がん幹細胞の可視化および細胞系譜解析のため、がん幹細胞のマーカー遺伝子である LGR5 遺伝子領域に蛍光蛋白または遺伝子組換え酵素である CreER のノックインを行う。

作製した人工大腸癌またはがん幹細胞可視化大腸癌は免疫不全マウスへの異種移植モデルを確立し、その生体内での動態を解析する。さらに、がん幹細胞を標的とした治療薬の効果を検討する。

4. 研究成果

我々は、ヒト大腸上皮細胞よりオルガノイド培養を樹立し、ゲノム編集技術による遺伝子操作法を確立した。本方法により、人工的な遺伝子変異導入による大腸発がんメカニズムの解明に迫った。さらに、様々な組織型、臨床ステージのヒト大腸癌よりオルガノイドを樹立し、ゲノム編集技術による遺伝子操作法を開発した。本技術を用い、ヒト大腸癌幹細胞の同定のため、LGR5 遺伝子領域への細胞系譜解析レポーターの遺伝子ノックインに成功した。LGR5 遺伝子はその遺伝子領域のサイレンシングにより、レポーターが不活性化することがわかり、現在、サイレンシングの受けにくい幹細胞マーカー遺伝子領域へ

のノックインを試みている。また、作製した遺伝子改変オルガノイドは免疫不全マウスへの異種移植により、患者病理組織を反映した大腸癌組織の形成を示した。本技術により、ノックインレポーターの生体内での系譜解析が世界で初めて可能になった。ゲノム編集技術による自在なヒト大腸上皮細胞の遺伝子操作は大腸発がんメカニズムやがん幹細胞の生物学的機能解析にとどまらず、遺伝子変異に着目した創薬や患者大腸癌の個別な治療薬スクリーニングなど、臨床応用を視野に入れた展開が期待できる極めて汎用性の高い基盤技術となることが期待される。

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文](計 13 件)

全て査読あり

(1) Nakaya T, Ogawa S, Manabe I, Tanaka M, Sanada M, Sato T, Taketo MM, Nakao K, Clevers H, Fukayama M, Kuroda M, Nagai R. KLF5 regulates the integrity and oncogenicity of intestinal stem cells. Cancer Res. 2014 (in press) PMID: 24626089

(2) Mikami Y, Mizuno S, Nakamoto N, Hayashi A, Sujino T, Sato T, Kamada N, Matsuoka K, Hisamatsu T, Ebinuma H, Hibi T, Yoshimura A, Kanai T. Macrophages and Dendritic Cells Emerge in the Liver during Intestinal Inflammation and Predispose the Liver to Inflammation. PLoS One. 2014 2;9:e84619.doi:10.1371/journal.pone.0084619.

(3) Mahe MM, Aihara E, Sato T, Shroyer NF. Establishment of gastro-intestinal epithelia-organoids. Current Protocols in Molecular Biology.2014(in press)

(4) Sato T, Clevers H. Growing self-organizing mini-guts from a single intestinal stem cell: mechanism and applications. Science. 2013;340:1190-4. doi: 10.1126/science.1234852.

(5) Sato T, Clevers H, Primary mouse small intestinal epithelial cell cultures. Methods in Molecular Biology. 2013;945:319-28.doi:10.1007/978-1-62703-125-7_19.

(6) Huch M, Bonfanti P, Boj SF, Sato T, Loomans CJ, van de Wetering M, Sojoodi M, Li VS, Schuijers J, Gračanin A, Ringnalda F, Begthel H, Hamer K, Mulder J, van Es JH, de Koning E, Vries RG, Heimberg H, Clevers H. Unlimited in vitro expansion of adult bi-potent pancreas progenitors through the Lgr5/R-spondin axis. EMBO J. 2013 Oct 16;32(20):2708-21.doi:10.1038/emboj.2013.204.

(7) Takabayashi K, Kashiwagi K, Kawata T, Sato T, Matsuoka K, Hisamatsu T, Takaishi H, Hibi T, Ogata H, Yahagi N, Kitagawa Y, Shigematsu N, Kanai T. Continuous low-dose irradiation by I-125 seeds induces apoptosis of gastric cancer cells regardless of histological origin. *Cancer Biol Ther.* 2013;15.doi:10.4161/cbt.26610.

(8) Hayashi A, Sato T, Kamada N, Mikami Y, Matsuoka K, Hisamatsu T, Hibi T, Roers A, Yagita H, Ohteki T, Yoshimura A, Kanai T. A single strain of *Clostridium butyricum* induces intestinal IL-10-producing macrophages to suppress acute experimental colitis in mice. *Cell Host Microbe.* 2013. 12;13:711-22.doi:10.1016/j.chom.2013.05.013.

(9) Miyoshi J, Matsuoka K, Inoue N, Hisamatsu T, Ichikawa R, Yajima T, Okamoto S, Naganuma M, Sato T, Kanai T, Ogata H, Iwao Y, Hibi T. Mucosal healing with oral tacrolimus is associated with favorable medium- and long-term prognosis in steroid-refractory/dependent ulcerative colitis patients. *J Crohns Colitis.* 2013. 15;7:e609-14.doi:10.1016/j.crohns.2013.04.018.

(10) Miyake M, Toguchi H, Nishibayashi T, Higaki K, Sugita A, Koganei K, Kamada N, Kitazume MT, Hisamatsu T, Sato T, Okamoto S, Kanai T, Hibi T. Establishment of novel prediction system of intestinal absorption in humans using human intestinal tissues. *J Pharm Sci.* 2013;102:2564-71.doi:10.1002/jps.23609.

(11) Yoneno K, Hisamatsu T, Shimamura K, Kamada N, Ichikawa R, Kitazume MT, Mori M, Uo M, Namikawa Y, Matsuoka K, Sato T, Koganei K, Sugita A, Kanai T, Hibi T. TGR5 signalling inhibits the production of pro-inflammatory cytokines by in vitro differentiated inflammatory and intestinal macrophages in Crohn's disease. *Immunology.* 2013;139:19-29.doi:10.1111/imm.12045.

(12) Matsumoto A, Kanai T, Mikami Y, Chu PS, Nakamoto N, Ebinuma H, Saito H, Sato T, Yagita H, Hibi T. IL-22-producing ROR γ t-dependent innate lymphoid cells play a novel protective role in murine acute hepatitis. *PLoS One.* 2013;8:e62853.doi:10.1371/journal.pone.0062853.

(13) Handa T, Kanai T, Sato T, Mikami Y, Sujino T, Hayashi A, Mizuno S, Matsumoto A, Hisamatsu T, Hibi T. Dendritic cells administered intrarectally penetrate the intestinal barrier to break intestinal tolerance via Th2-mediated colitis in mice. *Immunol Lett.* 2013;150:123-9.doi:10.1016/j.imlet.2013.01.010.

〔学会発表〕(計 12件)

(1) 佐藤俊朗. ミニ組織技術を用いた大腸がん幹細胞制御機構の解明. がん研究分野の特性等を踏まえた支援活動 公開シンポジウム 一橋講堂, 竹橋 2014年1月30日.

(2) 佐藤俊朗. 幹細胞ニッチシグナルによる腸管上皮幹細胞制御機構. 大阪大学蛋白質研究所セミナー. 細胞が集団になって初めて発現する機能. 大阪大学蛋白質研究所 2013年11月28日

(3) Toshiro Sato. Molecular mechanism of intestinal stem cell self-renewal: Stem cells and their niche signals. The graduate course in Molecular and Developmental Biology. (Prof. Noah Shroyer & Prof. James Wells) Cincinnati Children's. USA. 2013.11.13

(4) Toshiro Sato. Molecular mechanism of intestinal stem cell self-renewal: Stem cells and their niche signals. University of Michigan Center for Organogenesis Seminar. (Prof. Linda Samuelson & Prof. Jason Spence) University of Michigan Center, USA.2013.11.12

(5) Toshiro Sato, Ai Takano, Shoichi Date, Mami Matano, Mariko Shimokawa, Takanori Kanai. Molecular mechanism of intestinal carcinogenesis; Stem cells and their niche signals. Symposia 12, Aberrant signal transduction and therapeutic strategy for molecular target. 第72回 日本癌学会学術総会 横浜 2013年10月3日

(6) 佐藤俊朗 腸管上皮幹細胞培養技術の確立～幹細胞ニッチと自己複製機構の解明～. 第6回 Symphony 飯田橋 2013年9月22日

(7) Toshiro Sato, Mami Matano, Shoichi Date, Ai Takano, Mariko Shimokawa. Molecular mechanism of intestinal stem cell self-renewal:Stem cells and their niche signals. International Symposium 3. Molecular mechanisms for the growth and differentiation of tissue-specific stem cells in mammals. 第86回日本生化学会大会 横浜 2013年9月11日

(8) Toshiro Sato. Establishment of intestinal stem cell culture: basic and application. European Cancer Stem Cells Research meeting. Cardiff Univ. UK. Invited Speaker 2013.7.25

(9) Toshiro Sato. Establishment of patient-derived colorectal cancer/adenoma organoid culture system: an application to tubulology. 1st International Meeting for Epithelial Tubulology (Sapporo) 2013.6.22

(10) 佐藤俊朗 腸管上皮幹細胞の自己複製

機構：幹細胞ニッチと発がん 第13回GIリサーチフォーラム 東北大学 2013年6月19日

(11) 佐藤俊朗 消化器幹細胞培養による組織再生技術 基礎から応用 徳島大学疾患酵素学研究センター セミナー 徳島大学 2013年5月23日

(12) Toshiro Sato. Long-term culture system for human intestinal stem cells and cancer. Methods Workshop: Stem Cells, Enteroids and Organoids: A New Era for In Vitro Models of the Intestine. American Association for Cancer Research (AACR) Annual Meeting 2013. Invited Speaker. Washington DC, USA. 2013.4.6

〔図書〕(計 3件)

- (1) 佐藤俊朗 Wnt シグナルによる消化器上皮幹細胞制御 .Annual Review 糖尿病・代謝・内分泌 . 中外医学社 . 2014 年 p152-155
- (2) 南木康作, 藤井正幸, 佐藤俊朗 . 腸の再生機構 . 幹細胞研究と再生医療 . 中内啓光編 . 南江堂 2013 年 p61-68
- (3) 股野麻未, 佐藤俊朗 . 大腸がん幹細胞の機能解析法 . がん基盤生物学-革新的シーズ育成に向けて- 清木元治 編 南江堂 2013 年 p42-45

〔産業財産権〕

出願状況(計 0件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
出願年月日：
国内外の別：

取得状況(計 1件)

名称：Culture medium for epithelial stem cells and organoids comprising the stem cells
発明者：Toshiro Sato, Johannes Carolus Clevers
権利者：Koninklijke Nederlandse Akademie van Wetenschappen
種類：特許
番号：US 864229 B2
取得年月日：2014年2月4日

国内外の別：海外

〔その他〕

6. 研究組織

(1)研究代表者

佐藤 俊朗 (SATO, Toshiro)
慶應義塾大学・医学部・特任准教授
研究者番号：70365245

(2)研究協力者

股野 麻未 (MATANO, Mami)
慶應義塾大学・医学部・研究員
研究者番号：20439889

高野 愛 (TAKANO, Ai)

慶應義塾大学・医学部・研究員
研究者番号：50647584