

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 5 月 27 日現在

機関番号：32612

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2012～2013

課題番号：24790718

研究課題名(和文) ヒト正常大腸上皮および大腸癌における幹細胞ヒエラルキーの解明

研究課題名(英文) Stem cell hierarchy in human intestinal epithelium and colorectal cancer.

研究代表者

股野 麻未 (matano, mami)

慶應義塾大学・医学部・研究員

研究者番号：20439889

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,200,000円、(間接経費) 960,000円

研究成果の概要(和文)：正常腸管上皮幹細胞マーカー遺伝子であるLGR5を標的とし、蛍光蛋白レポーターおよびlineage tracerであるCreERのヒト腸管上皮オルガノイドへのKnock-inを試みた。最新のゲノム編集技術であるCRISPR/Cas9のヒト腸管上皮オルガノイドへの導入の最適化を行い、オルガノイドにおける遺伝子相同組換え技術を確立した。その技術を利用し、LGR5遺伝子座へのCreERのKnock-inに成功した。

研究成果の概要(英文)：To elucidate the role of Lgr5 stem cells in colorectal cancer, we attempted to knock-in fluorescence reporter and CreER (lineage tracer) in an Lgr5 locus. Taking advantage of genome editing system, CRISPR/Cas9, we found an optimal condition to engineer human intestinal organoids. With this system, we succeeded in knock-in of CreER into the Lgr5 locus.

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：大腸癌 幹細胞 LGR5

## 1. 研究開始当初の背景

消化管上皮は体内において最も早い増殖速度を持つ組織である。腸管上皮幹細胞は長期間の自己複製能と多分化能を有する細胞と定義されており、全ての消化管上皮細胞は腸管上皮幹細胞から供給されている。Lgr5 陽性細胞が生体内での lineage tracing と in vitro 培養によりマウス腸管上皮幹細胞であることが見出された (Barker N et al. Nature 2007, Sato T et al. Nature 2009)。その後、Bmi1 陽性細胞も同様に lineage tracing により幹細胞機能を有することが報告された (Sangiorgi E et al. Nature Genet. 2008, Tian H et al. Nature 2011)。

小腸腸管陰窩において、Lgr5+幹細胞と Bmi1+幹細胞は異なった組織局在を示し Lgr5+幹細胞は非常に早い増殖回転を示す一方、Bmi1+幹細胞は比較的遅い細胞周期を有している。しかしながら、どちらが真の幹細胞であるか？あるいは両者は同等な幹細胞であるのか？幹細胞として異なった挙動を示すのか？という疑問は解決されていない。

これまで、腸管上皮幹細胞は技術的な制約からマウスで研究されてきたが、申請者の研究グループの開発した新規培養法により、ヒト腸管上皮幹細胞の研究が可能となった (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)。しかしながら、Lgr5 のような非常に発現レベルの低い細胞表面蛋白や Bmi1 のような細胞内蛋白は Flow cytometry により分離することが不可能であり、また、遺伝子改変マウスで行われている幹細胞選択的な遺伝子操作も困難である。申請者らは世界で初めてヒト腸管上皮幹細胞の遺伝子操作に成功した。本技術により、ヒト腸管上皮における Lgr5+幹細胞または Bmi1+幹細胞の同定と幹細胞機能解析が可能になった。

## 2. 研究の目的

マウス腸管幹細胞が同定され、腸管上皮細胞研究は飛躍的に進歩してきた。マウスでは Lgr5+幹細胞と Bmi1+幹細胞の2つの幹細胞が報告され、腸管上皮における正確な幹細胞ヒエラルキー構造は論争中であるが、ヒト大腸癌における癌幹細胞ヒエラルキーおよびそのメカニズムはほとんど明らかにされていない。

そこで本研究では、ヒト腸管上皮細胞またはヒト大腸癌細胞の遺伝子相同組換えによる Lgr5+幹細胞・Bmi1+幹細胞の細胞系譜解析により、腸管上皮幹細胞のヒエラルキーを解明することを目的とした。

## 3. 研究の方法

### (1) ヒト腸管オルガノイドの樹立

同意の得られた大腸癌患者より内視鏡生検サンプルを採取し、EDTA キレートにより腸管上皮細胞および大腸癌上皮細胞を抽出した。得られた上皮細胞はマトリジェルに包埋し、EGF、Noggin、R-spondin、Wnt3A を含む培地により腸管上皮幹細胞培養を行い、3 次元的な組織構造体 (オルガノイド) を得た。分離されたオルガノイドはがん由来組織の培養条件を基に最適化を行った。

### (2) ヒト組織幹細胞の遺伝子相同組換えによる Knock-in オルガノイドの作製

樹立されたヒト腸管オルガノイドにおいて、Lgr5 および Bmi1 の幹細胞遺伝子座の蛍光蛋白レポーター、CreER を以下の方法で Knock-in した。

#### 遺伝子 Targeting

TALEN デザインは標的遺伝子の TALEN 認識配列を TAL Effector Site Finder により選択した。

CRISPR/CAS9 システムにおける sgRNA のデザインは CRISPR Design Tool (<http://tools.genome-engineering.org>) により選択した。

Targeting Vector Construction はノックアウトマウス作製時のベクターに準じた。BAC recombineering により、TALEN 切断領域近傍に PGK-Neo カセットと GFP-ires-CreER または RFP-ires Diphtheria toxin receptor (DTR) カセットを挿入した。

#### 遺伝子相同組換え

TALEN および CRISPR と Targeting vector はリポフェクション法およびエレクトロポレーション法により導入し、G418 による薬剤選択を行った。

## 4. 研究成果

### (1) ヒト腸管オルガノイドの樹立

大腸癌患者の内視鏡生検サンプルから 10 ラインのヒト腸管上皮および大腸癌上皮細胞のオルガノイドを樹立した (図 1)。

大腸癌オルガノイドは正常腸管上皮とは異なり、Wnt や R-spondin などの増殖因子の非存在下でも培養が可能であり、各ラインによって必要な増殖因子は異なった。ライン毎に必要な増殖因子を検討し、最適化を行った。

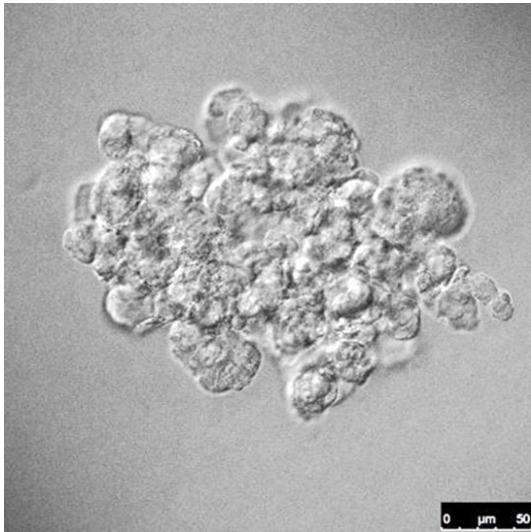


図1 樹立したヒト大腸癌オルガノイド

(2) ヒト組織幹細胞の遺伝子相同組換えによる Knock-in オルガノイドの作製

遺伝子相同組換えによる遺伝子 Knock-in に先立ち、TALEN および CRISPR のオルガノイドへの導入条件を検討した。まず、リポフェクション法による導入を試みたが、オルガノイドへの導入効率は非常に悪く、遺伝子破壊をするのも困難であった。

そこで、導入方法をエレクトロポレーション法に変更し、遺伝子破壊を試みた。エレクトロポレーション法によりオルガノイドへの導入効率が飛躍的に上昇し、遺伝子破壊を達成することができた。更に導入効率を上昇させるため、細胞調製条件、電圧・電気パルスの長さ、温度、DNA 濃度、バッファー組成など、様々な角度から導入条件の最適化を行った。

最適化された条件で LGR5 遺伝子座に蛍光蛋白レポーターおよび CreER の Knock-in を試みた。TALEN および CRISPR を用いて遺伝子相同組換えによる遺伝子 Knock-in に成功したが、蛍光蛋白レポーターの発現が確認できなかった。原因として組換え後の標的遺伝子のサイレンシング、プロモーターの干渉などが考えられたため、新たなデザインの Targeting vector を作製した。

LGR5 は非常に発現レベルが低いいため新たな Targeting vector の評価には適さないと考え、大腸癌におい発現レベルが高い Epiregulin (EREG) を標的とし、蛍光レポーターのヒト大腸癌オルガノイドへの Knock-in を行った。

得られた Knock-in オルガノイドは蛍光蛋白レポーターの発現が確認され、組換え後のサイレンシングも認められなかった。現在、この新たなデザインの Targeting vector を用いて LGR5 および BMI 遺伝子座への蛍光蛋白レポーターおよび CreER の Knock-in を試みている。

今後は、ヒト正常上皮由来オルガノイドの

LGR5 および BMI1 遺伝子座に Knock-in された CreER を利用し、Cre-activatable reporter による lineage tracing を行い、ヒト正常大腸上皮における幹細胞ヒエラルキーの解明を進める。また、ヒト大腸癌由来のオルガノイドにおいても同様の実験を行い、正常腸管上皮の幹細胞ヒエラルキーが大腸癌においても観察されるか検討する予定である。

本研究により、現在までに報告のなかったヒト組織幹細胞への遺伝子 Knock-in 技術を確立することができた。本技術により、マウスが主体である組織幹細胞研究をヒト細胞に移行させていくことを可能とした。また、多様な遺伝子と消化器疾患に利用できるため、今後の組織幹細胞研究において非常に有用なツールとなることを確信している。

## 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0件)

〔学会発表〕(計3件)

佐藤俊朗, 南木康作, 藤井正幸, 武下達矢, 中里圭宏, 清野隆史, 高野愛, 股野麻未, 下川真理子, 伊達昌一, 太田悠木, 金井隆典. ゲノム編集技術による体外における人工的な大腸がんの再構築. 第21回浜名湖シンポジウム. 2013年12月21日, アクトシティ浜松

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 2013年10月3日, パシフィコ横浜

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 2013年9月11日, パシフィコ横浜

〔図書〕(計1件)

股野麻未, 佐藤俊朗, 南山堂, がん基盤生物学 革新的シーズ育成に向けて, 2013, 42-45

〔産業財産権〕  
出願状況（計 0 件）

取得状況（計 0 件）

〔その他〕  
なし

## 6．研究組織

### (1)研究代表者

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