

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 6 月 13 日現在

機関番号：15101

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2014～2015

課題番号：26860264

研究課題名(和文)正常腸管上皮オルガノイドを駆使した慢性炎症による腸管発癌の機構解析

研究課題名(英文)Studies on inflammation-induced intestinal bowel carcinogenesis by using organoids

研究代表者

小沼 邦重 (onuma, kunishige)

鳥取大学・医学部・助教

研究者番号：90597890

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,000,000円

研究成果の概要(和文)：どの遺伝子発現の変化がある際に、炎症刺激を受けて腸管上皮が発癌するのは不明である。本研究はマウス腸管上皮細胞をオルガノイド培養し、K-ras遺伝子の活性化あるいはAPC遺伝子の抑制、もしくはこれらを同時に変化させて、どの遺伝子異常が炎症発癌を起こすのかを検討した。K-ras活性化とAPCを抑制したオルガノイドは腫瘍増殖した。また、炎症を誘発するスポンジに比べ、プラスチックプレートと移植して出現した腫瘍径は大きかった。K-ras活性化単独、APC抑制単独では腫瘍増殖しなかった。腸管の炎症発癌にはK-ras活性化とAPC抑制が必要で、炎症反応の違いにより増殖性が異なることを見出した。

研究成果の概要(英文)：Several studies indicate accumulation of multiple genetic alterations underlies colon carcinogenesis. On the other hand, chronic inflammation is recognized as a predisposing factor for the development of several cancer. However, the question of what kind of genetic alterations directly promote tumor growth in inflammatory environments has not been studied. To resolve this issue, we developed an efficient method by using intestinal organoids in 3D culture, which maintain intestinal structure in vitro. Using this system, we induce intestinal organoid to APC-inactivation or K-Ras activation or both. Only APC-inactivated and K-Ras activated intestinal organoids developed tumors when organoids, and notably, cells that were co-implanted in a subcutaneous site with plastic plate developed larger tumors than the cells with a gelatin sponge. On the other hand, APC-inactivated or K-Ras activated intestinal organoids have not developed tumors.

研究分野：細胞生物学

キーワード：オルガノイド 腸管発癌 炎症

1. 研究開始当初の背景

(1) 炎症は、古くからヒト発癌要因のリスクファクターとして想定されている。炎症は、多くの臓器癌との関わりも指摘されているが、特に大腸発癌においても炎症は発癌リスクファクターとなることが数多くの疫学調査や実験研究などの報告がなされている。しかしながら、どのような遺伝子が炎症による発癌と関連するのかに関しては、これまで不明であった。その理由のひとつとして、生体内に生じる炎症反応を再現性良く再現できる適当な解析モデルがこれまで少なかったことが考えられる。さらに、持続した炎症の環境下に正確に上皮細胞を置く動物実験等の技術や細胞培養技術が十分に整っていなかったことも考えられる。

(2) 現在所属の研究室で構築された生体外異物(ゼラチンスポンジやプラスチックプレート)を体内に挿入することで誘発される異物誘発の炎症に着目した。これは、生体外異物の材料を変えることで炎症を挿入したその部位に限局して誘導することができ、しかも維持できるという利点がある。さらに、正常上皮細胞を培養して維持するには、これまでおもに不死化した細胞株を使用してきた経緯がある。しかし、SV-40等の強力なプロモーターによって駆動される不死化細胞の細胞死回避に関わる遺伝子操作は明らかに正常細胞由来の種々の特性を失い、もしくは新たな特性を獲得して本来の目的を必ずしも達成することができない細胞に変化したものと考えられる。しかしながら、正常の上皮組織から得た上皮細胞を培養維持することのできるオルガノイド培養関連技術が海外で開発された。その手法を本研究に導入することで腸管由来の正常上皮細胞の培養がはじめて可能となった。

(3) そこで、正常腸管上皮細胞から得た上皮細胞をオルガノイド培養し、これにレンチウイルス感染によるshRNAを介した癌抑制遺伝子発現の抑制や、コンディショナ

ルに癌遺伝子を活性化させることで、どういった遺伝子変化がある時に炎症によって促進される癌が生じるのかに関する研究を試みた。

2. 研究の目的

(1) 本研究の目的は、炎症による腸管発癌に関わる遺伝子変化を明らかにすることである。

(2) さらに、この遺伝子変化によって活性化する発癌シグナル分子解析を行うことを目標にする。

3. 研究の方法

(1) 正常腸管上皮細胞の癌抑制遺伝子の発現抑制と癌遺伝子の活性化

正常 C57BL/6 マウスの小腸から腸上皮細胞を剥離して、オルガノイド培養を行う。癌抑制遺伝子(APC)は、shRNA を用いてレンチウイルスの感染を介して発現を抑制する。一方、癌遺伝子(K-ras)の活性化は、LoxP-Stop-LoxP-K-ras^{G12D} ノックインマウスから得た腸管上皮組織を使用して、この組織から分離した腸管上皮細胞を用いてオルガノイド培養を行う。その後、このオルガノイドにレンチウイルスを介してCreリコンビナーゼをオルガノイドに強制発現させて、変異型 K-ras を活性化させる手法を用いた。

(2) 炎症による腸管発癌の解析:

炎症を誘導するための異物には、体内で自然吸収されることで、炎症反応が自然と終息するために、急性期炎症の炎症のみ引き起こすゼラチンスポンジと、急性期から慢性期の炎症へと自然移行するプラスチックプレートを用いた。

癌抑制遺伝子あるいは癌遺伝子の発現を変動させた腸管由来のオルガノイドをゼラチンスポンジもしくはプラスチックプレートの異物とともにヌードマウスの皮下に移入して発癌の有無を観察した。いずれも週3回の腫瘍計測を実施した。発癌頻度ならびに潜伏期間等を測定した。

増殖腫瘍は、オルガノイド細胞株として再樹立した。樹立細胞株間に見られるオルガノイド径に代表される増殖性等に係わる生物学的相違を評価した。

(3) 炎症発癌を促すシグナル解析：

腸管の炎症発癌で活性化するシグナル分子を明らかにするため、移入したオルガノイドと、そこから発癌したオルガノイド細胞株のそれぞれを用いて、特徴的な分子探索を行った。

4. 研究成果

(1) 炎症による発癌に必要な遺伝子異常の検索

腸管上皮細胞の炎症発癌に必要な遺伝子異常を見出すために、正常マウスの小腸ならびに大腸から上皮組織を剥離し、これらからオルガノイド培養株を作製した。さらに研究の方法欄で記載した APC 遺伝子の発現抑制、K-ras 遺伝子の活性化ならびにこれらの同時発現を誘導した。これらのオルガノイド細胞株を、生体異物であるゼラチンスポンジあるいはプラスチックプレートとともにヌードマウスの皮下に移入した(表1)。

表1 遺伝子異常を持つ小腸オルガノイドの炎症による発癌頻度の違い

異物	遺伝的背景	増殖	潜伏期間
ゼラチンスポンジ	APC	0/6	215,215,215
	K-ras	0/6	244
	APC/K-ras	6/6	32,32,32
プラスチックプレート	APC	0/6	215,215
	K-ras	0/6	290,290
	APC/K-ras	6/6	20,20,20

その結果、APC 遺伝子を発現抑制した小腸上皮細胞由来のオルガノイドでは、ゼラチンスポンジあるいはプラスチックプレートとともに移植しても腫瘍増殖する個体は観察されなかった。さらに K-ras 遺伝子を活性化させた小腸由来オルガノイドをゼラチンスポンジあるいはプラスチックプレートとともに皮下移植してもゼラチンスポンジと同様に致死増殖する個体は観察されなかった。しかしながら、APC 遺伝子の発現抑制と K-ras 遺伝子の活性化を同時に起こした小腸

由来オルガノイドに置いては、ゼラチンスポンジあるいはプラスチックプレートとともに移植すると、いずれもすべての個体で致死増殖した(表1)。また、腫瘍が出現するまでの潜伏期間を比較すると、ゼラチンスポンジとともに移植した方がプラスチックプレートとともに移植した群に比べて有意に延長していた($p < 0.001$)。このことは、プラスチックプレートとともに移植した群で腫瘍の出現までにかかる時間が短いことから、腫瘍増殖の促進として作用する炎症反応の違いが想定された。このような生体外異物との同時皮下移植による腫瘍増殖の獲得は、小腸由来のオルガノイドには観察されたが、大腸由来のオルガノイドに関しては2016年5月末時点において観察されなかった。

(2) 出現した癌細胞の生物学的性質の炎症による違いの検索

小腸上皮細胞のオルガノイドをゼラチンスポンジもしくはプラスチックプレートとともにヌードマウスの皮下に移植した後に出現した腫瘍細胞から、再びオルガノイド培養細胞株を樹立した。これら再樹立したオルガノイド細胞株間の生物学的性質を比較することでゼラチンスポンジもしくはプラスチックプレートの移入によって誘導される炎症反応のもたらす影響の違いを検討した。

ゼラチンスポンジあるいはプラスチックプレートとともに移植して出現した腫瘍から得た培養オルガノイドの腫瘍径を経時的に比較観察した。腫瘍径は、30 μm 以下(図1)、31~60 μm (図2)、61~90 μm (図3)を比較した。その結果、オルガノイド径30 μm 以下で比較すると、プラスチックプレートとともに移植して出現した腫瘍から得た培養オルガノイドは、ゼラチンスポンジとともに移植して出現した腫瘍から得た培養オルガノイドに比べて常にオルガノイド径は大きく、オルガノイド培養開始後5日目には有意な差を認めた(図1)。オルガノイド径31~60 μm で比較すると、プラスチックプレートとともに移植して出現した腫瘍から得た培養オルガノイドは、ゼラチンスポンジとともに移植して出現した腫瘍から得た培養オル

ガノイドに比べてオルガノイド径が大きい傾向を保っており、オルガノイド培養開始後3日後と5日目には有意な差を認めた(図2)。オルガノイド径61~90 μmで比較すると、プラスチックプレートとともに移植して出現した腫瘍から得た培養オルガノイドは、ゼラチンスポンジとともに移植して出現した腫瘍から得た培養オルガノイドに比べてオルガノイド径が大きい傾向を保っていたが、有意な差は認められなかった(図3)。

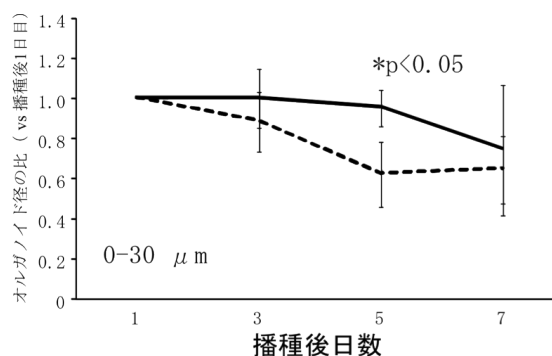


図1 K-ras活性化/APC発現抑制腫瘍由来オルガノイドの増殖能

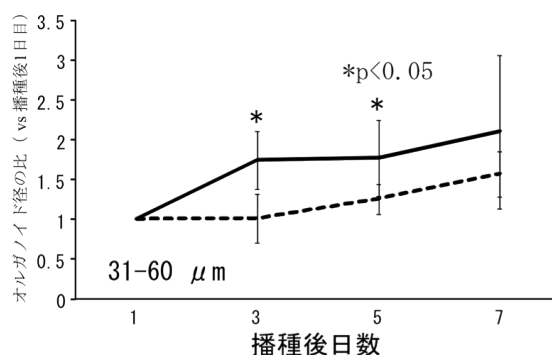


図2 K-ras活性化/APC発現抑制腫瘍由来オルガノイドの増殖能

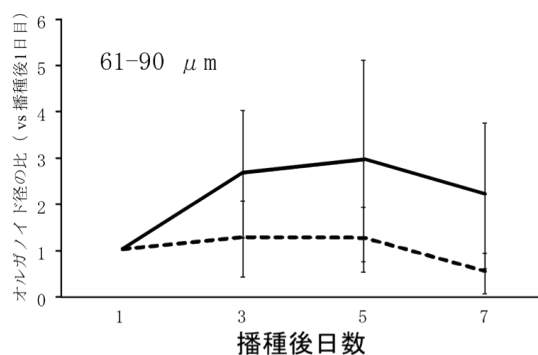


図3 K-ras活性化/APC発現抑制腫瘍由来オルガノイドの増殖能

(3) 出現した癌細胞と移植に用いたオルガノイド間のシグナル解析:

腸管の炎症発癌で活性化するシグナル分子を明らかにするため、移入したオルガノイドと、そこから発癌した細胞のそれぞれからオルガノイドを作製し、特徴的な分子探索を行うために核酸ならびにタンパク質の回収を行い、解析を開始した。

5. 主な発表論文等

[雑誌論文](計2件)

Onuma K, Kanda Y, Suzuki Ikeda S, Sakaki R, Nonomura T, Kobayashi M, Osaki M, Shikanai M, Kobayashi H and Okada F. Fermented brown rice and rice bran with *Aspergillus oryzae* (FBRA) prevents inflammation-related carcinogenesis in mice, by inhibiting infiltration of inflammatory cells. *Nutrients* 査読有 7 (12): 2015, 10237-10250
DOI:10.3390/nu7125531

Kanda Y, Kawaguchi T, Kuramitsu Y, Kitagawa T, Kobayashi T, Takahashi N, Tazawa H, Habelhah H, Hamada J-I, Kobayashi M, Hirahata M, Onuma K, Osaki M, Nakamura K, Kitagawa T, Hosokawa M and Okada F. Fascin regulates chronic inflammation-related human colon carcinogenesis by inhibiting cell anoikis. *Proteomics* 査読有 14 (9): 2014 1031-1041
DOI:10.1002/pmic.201300414

[学会発表](計6件)

平畑美緒、尾崎充彦、神田裕介、小沼邦重、井藤久雄、岡田 太: miR-143 の標的遺伝子である PAI-1 はヒト骨肉腫細胞の肺転移に關与する PAI-1、a target gene of miR-143、contributes lung metastasis of human osteosarcoma cells. 第104回日本病理学会総会、104 (1)、p304、2015. 2015年4月30日-5月2日、名古屋国際会議場(名古屋市)

神田裕介、平畑美緒、小沼邦重、尾崎充彦、岡田 太：転移先臓器指向性を規定する分子探索のための細胞株樹立 Establishment and characterization of a tumor cell line with metastatic tropism from lung to liver. 第104回日本病理学会総会、日本病理学会会誌、104(1)、p455、2015. 2015年4月30日-5月2日、名古屋国際会議場(名古屋市)

平畑美緒、尾崎充彦、神田裕介、小沼邦重、岡田 太：PAI-1発現はヒト骨肉腫細胞の浸潤および肺転移に関する。平成26年度文部科学省科学研究費補助金新学術領域研究「がん研究分野の特性等を踏まえた支援活動」平成26年度「個体レベルでのがん研究支援活動」ワークショップ：個体レベルでのがん研究の新展開 細胞の可塑性と発がん、プログラム・抄録集、p36、2015年2月5-6日、琵琶湖ホテル(大津市)

神田裕介、平畑美緒、小沼邦重、尾崎充彦、岡田 太：転移先臓器の指向性を規定する分子探索のためのがん細胞株樹立の試み。平成26年度文部科学省科学研究費補助金新学術領域研究「がん研究分野の特性等を踏まえた支援活動」平成26年度「個体レベルでのがん研究支援活動」ワークショップ：個体レベルでのがん研究の新展開 細胞の可塑性と発がん、プログラム・抄録集、p70、2015年2月5-6日、琵琶湖ホテル(大津市)

神田裕介、河口徳一、田澤 大、平畑美緒、小沼邦重、北川知行、尾崎充彦、岡田 太：ヒト大腸腺腫細胞の大腸癌細胞への進展における慢性炎症由来一酸化窒素の証明とfascinの同定、Nitric oxide from chronic inflammation and fascin in conversion of human colonic adenoma cells into adenocarcinoma cells. 第73回日本癌学会学術総会 プログラム、p103、2014年9月25-27日、パシフィコ横浜(横浜市)

平畑美緒、伊藤真保、神田裕介、小沼邦重、尾崎充彦、岡田 太：miRNA-143のターゲットであるPAI-1はヒト骨肉腫細胞の肺転移に関する。文部科学省科学研究費補助金新学術領域研究「がん研究分野の特性等を踏まえた支援活動」平成25年度「個体レベルからみた炎症とがん」ワークショップ：がん発生・進展における個体内相互作用、プログラム・抄録集、p34、2014年2月、琵琶湖ホテル(大津市)

〔図書〕(計0件)

〔産業財産権〕

出願状況(計0件)

名称：なし

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0件)

名称：なし

発明者：

権利者：

種類：

番号：

取得年月日：

国内外の別：

〔その他〕

ホームページ等 なし

6. 研究組織

(1) 研究代表者

小沼 邦重 (ONUMA, Kunishige)

鳥取大学・医学部・助教

研究者番号：90597890

(2) 研究分担者 なし

()

研究者番号：

(3) 連携研究者 なし

()

研究者番号：