

科学研究費助成事業 研究成果報告書

令和 3 年 6 月 18 日現在

機関番号：10101

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2018～2020

課題番号：18K07316

研究課題名(和文)全ゲノム解析とCRISPR/Cas9を応用した大腸癌肝転移に対する新規治療戦略

研究課題名(英文)A novel therapeutic strategy for colorectal cancer liver metastasis based on whole genome sequence and CRISPR/Cas9 system

研究代表者

本間 重紀(Homma, Shigenori)

北海道大学・医学研究院・講師

研究者番号：30533674

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,500,000円

研究成果の概要(和文)：我々はいくつかの大腸癌原発巣と肝転移巣を用いたゲノム解析により、肝転移特異的に変異を認められた遺伝子や原発巣に比し肝転移でコピー数増幅異常を認められた遺伝子を報告してきた。本研究では、上記遺伝子が肝転移形成にどの様に寄与しているかを明らかにすることを目的とした。原発巣、肝転移巣での蛋白および遺伝子発現レベルについて検討したところ、FGFR1が肝転移形成における重要なドライバー遺伝子である可能性が考えられた。現在、オルガノイド樹立の段階であり、遺伝子変異導入に加え、FGFR1高発現株も並行して作製し今後の解析を継続していく予定である。

研究成果の学術的意義や社会的意義

遺伝子異常に起因する疾患の代表である大腸癌は、各種の集学的治療が施行されてきたが、各遺伝子異常に起因するクローンの性質によって化学療法や分子標的薬の有効性が異なる。また、現在、肝転移に関連したマーカーや治療標的は明らかではない。本研究では、大腸癌の原発巣、肝転移巣、正常組織を用いたゲノム・エピゲノム解析、プロテオミクス解析を実施し、大腸癌の肝転移に関わる因子、メカニズムが解明されることに意義がある。さらに、大腸癌診療において転移予測マーカーや治療標的としての有用性が明らかになれば、個別化医療への応用が可能になり、予後改善に寄与することが期待される。

研究成果の概要(英文)：We have previously reported gene mutations and copy number abnormalities specifically observed in liver metastases compared to primary tumors by genome sequence using paired primary and liver metastatic tumors from colorectal cancer. In this study, we aimed to clarify how the above genes contribute to the formation of liver metastases in colorectal cancer. We examined the protein and gene expression levels in primary tumors and liver metastases, and found that FGFR1 may be an important driver gene for liver metastasis formation. We are currently in the process of organoid establishment, gene mutagenesis, and the generation of FGFR1 high-expressing lines, and we plan to continue further analysis in the future.

研究分野：下部消化管外科

キーワード：大腸癌 肝転移 遺伝子変異 コピー数異常

1. 研究開始当初の背景

近年の分子標的薬の発展と手術手技・器具（大腸切除、肝切除術）の向上に伴い、大腸癌肝転移症例の治療成績は飛躍的に向上した。しかし、大腸癌は遺伝子変異情報に基づいて予後が選別されつつあり、遺伝子変異の把握は、大腸癌の治療戦略構築の要諦である。近年では、マイクロサテライト不安定性を有する癌患者に対する免疫チェックポイント阻害剤の有効性は確立され重要な治療選択肢のひとつとなっている。しかしながら、肝転移巣には免疫チェックポイント阻害剤の効果が限定的との報告もあり、肝転移巣の遺伝子変異については未だ未解明な部分が多い。また、転移巣では原発巣とドライバー遺伝子が異なり、化学療法や分子標的薬の有効性が個人によって異なる場合がある事が報告されている。そこで、今後の大腸癌肝転移に対する新規治療課題は、原発巣と転移巣間での遺伝子変異を定量的に把握し、その原因遺伝子異常の蓄積が引き起こす分子レベルでの異常を詳細に解明することであると考え、本研究の着想に至った。我々はこれまでに、同一症例の大腸癌原発巣と肝転移巣の双方を用いたゲノム解析により、原発に認めず肝転移にのみ認められた遺伝子変異(BRAF, TGF R2, RNF43, P16 INK4A, MLH1)や原発に比し肝転移で増幅したコピー数異常(CTNNB1, PIK3CA, TGFBR2, FGFR1)を報告してきた。

2. 研究の目的

上記のドライバー遺伝子候補の異常が大腸癌肝転移形成にどのように寄与しているかを明らかにすることを目的とし、候補遺伝子の検討およびオルガノイド培養システムとCRISPR/Cas9システムを用いて、これらのドライバー遺伝子がヒト大腸正常上皮幹細胞にどのような影響を与え、腫瘍（腺癌）を形成し、さらに転移を有するのか否かを検討することとした。

3. 研究の方法

(1) 目的達成の為にまず上記候補遺伝子が治療標的となり得るか否かの実証に着手し、原発、肝転移、双方での蛋白発現および遺伝子発現レベルについて検討した。コピー数解析で差のあった上記4遺伝子(CTNNB1, PIK3CA, TGFBR2, FGFR1)に対し免疫組織化学染色を用いて原発巣組織と肝転移巣組織の蛋白発現を評価し、コピー数との相関を解析した。次いで、正常大腸組織、原発巣組織、肝転移巣組織からそれぞれ抽出したtotal RNAを用いてcDNA microarrayによる網羅的遺伝子発現解析を行った。

(2) ヒト正常大腸組上皮幹細胞からオルガノイドを樹立し、肝転移に特異的な遺伝子異常(BRAF, TGF R2, RNF43, P16 INK4A, MLH1)をCRISPR/Cas9システムを用いて順に導入し(*in vivo*大腸癌プログレッションモデル)、変異オルガノイドを樹立し転移、浸潤能の獲得の有無を評価する。各オルガノイドの形態像、遺伝子発現プロファイル、染色体異常の検討を行う。腫瘍形成能、肝転移形成能を評価し、転移・浸潤能の変化過程を解析する。

4. 研究成果

(1) 原発巣組織と肝転移巣組織の免疫染色を用いた検討では、PIK3CA, TGFBR2, FGFR1は、原発、肝転移ともにコピー数上昇例で免疫組織化学染色スコアも上昇する傾向を認め、特にFGFR1は原発と肝転移間でコピー数上昇と免疫組織化学染色スコア上昇に有意な相関を認めた。また、TGFBR2は正常大腸組織に比べ、原発巣、肝転移巣ともに免疫組織化学染色スコアは有意に高値であった。原発と肝転移での遺伝子発現についての検討では、正常大腸を対照とし、変動

遺伝子は原発で808遺伝子、肝転移で884遺伝子あり、原発と肝転移の比較では166遺伝子を認めた。それらの変動遺伝子に対しエンリッチメント解析を行ったところ、細胞接着や細胞外マトリックスに関する因子と低酸素応答に関する因子を上位に認めた。また、原発巣でも発現上昇があるものの、原発巣に比べ肝転移巣でさらにFGFのアイソタイプやVEGFの発現上昇を認めた。このことからFGFR1のコピー数増幅との関連性が示唆され、FGFR1は肝転移形成における重要なドライバー遺伝子である可能性が考えられた。今回の検討では、解析症例数が小数例であることから、今後、多数例での検討や、転移を来していない原発巣症例との比較検討をしていく必要がある。

(2) 予備実験においては、共同研究機関であるQIMR Berghofer Medical Research Instituteの協力を得て、遺伝子導入を行ったオルガノイドを経内視鏡的にマウス粘膜下に同所移植し検討を行った。マウス同所性移植モデルの検討では、BRAF変異のみのオルガノイドの同所移植では腫瘍形成に至らず、BRAF/TGFBR2変異において腫瘍形成(腺癌)を得た。さらに、BRAF/TGFBR2/RNF43/P16INK4A変異のオルガノイドの同所移植では有意に腫瘍形成を認め、移植後の生存率の低下を認めるという結果を得ている。しかし、当科においてヒトオルガノイド培養システムの樹立に時間を要しており、現在、オルガノイド樹立、遺伝子変異(BRAF, TGF R2, RNF43, P16 INK4A, MLH1)導入に加え、FGFR1高発現株も並行して作製している段階である。各種細胞株を作製次第、同所および異所移植による腫瘍形成能、大腸癌肝転移マウスモデルでの転移形成能の評価と併せて、薬剤感受性に関する検討を行っていく予定である。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計7件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 1件）

| |
|--|
| 1. 発表者名 沢田堯史、川俣太、市川伸樹、吉田雅、柴崎晋、本間重紀、武富紹信 |
| 2. 発表標題 大腸癌肝転移における免疫組織化学染色を併用した遺伝子解析の検討 |
| 3. 学会等名 第74回日本消化器外科学会総会 |
| 4. 発表年 2019年 |

| |
|---|
| 1. 発表者名 沢田堯史、川俣太、市川伸樹、吉田雅、柴崎晋、本間重紀、武富紹信 |
| 2. 発表標題 大腸癌肝転移に対する免疫組織化学染色を併用した遺伝子コピー数解析の有用性 |
| 3. 学会等名 第74回日本大腸肛門病学会学術集会 |
| 4. 発表年 2019年 |

| |
|---|
| 1. 発表者名 沢田堯史、松井博紀、宮岡陽一、今泉健、市川伸樹、吉田雅、本間重紀、武富紹信 |
| 2. 発表標題 大腸癌肝転移における遺伝子コピー数異常に対する免疫組織化学染色併用の有用性の検討 |
| 3. 学会等名 第53回制癌剤適応研究会 |
| 4. 発表年 2020年 |

| |
|--|
| 1. 発表者名 川俣太、沢田堯史、吉田雅、市川伸樹、本間重紀、川村秀樹、武富紹信 |
| 2. 発表標題 ゲノム解析を利用した大腸癌原発巣およびその肝転移巣に対する新規治療戦略 |
| 3. 学会等名 第73回日本大腸肛門病学会学術集会 |
| 4. 発表年 2018年 |

| |
|--|
| 1. 発表者名 沢田堯史、川俣太、本間重紀、市川伸樹、吉田雅、川村秀樹、武富紹信 |
| 2. 発表標題 Combined copy number variation analyses and immunohistochemical protein expression reveal precision medicine for colorectal cancer liver metastases |
| 3. 学会等名 11th AACR-JCA joint conference (国際学会) |
| 4. 発表年 2019年 |

| |
|---|
| 1. 発表者名 川俣太、沢田堯史、市川伸樹、吉田雅、本間重紀、川村秀樹、武富紹信 |
| 2. 発表標題 ゲノム解析を利用した大腸癌原発巣およびその肝転移巣に対するprecisionmedicine |
| 3. 学会等名 第119回日本外科学会定期学術集会 |
| 4. 発表年 2019年 |

| |
|---|
| 1. 発表者名 沢田堯史、川俣太、市川伸樹、吉田雅、本間重紀、川村秀樹、武富紹信 |
| 2. 発表標題 大腸癌肝転移に対するprecisionmedicineにおける免疫組織化学染色を併用したゲノム解析の有用性の検討 |
| 3. 学会等名 第119回日本外科学会定期学術集会 |
| 4. 発表年 2019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 分担者 | 武富 紹信 (Taketomi Akinobu) (70363364) | 北海道大学・医学研究院・教授 (10101) | |

6. 研究組織（つづき）

| | 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 |
|-------|---|---|----|
| 研究分担者 | 横尾 英樹 (Yokoo Hideki) (70399947) | 旭川医科大学・医学部・准教授 (10107) | |
| 研究分担者 | 川村 秀樹 (Kawamura Hideki) (70645960) | 北海道大学・医学研究院・客員教授 (10101) | |
| 研究分担者 | 神山 俊哉 (Kamiyama Toshiya) (80322816) | 北海道大学・医学研究院・准教授 (10101) | |

| | 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 | 沢田 堯史 (Sawada Akifumi) | | |
| 研究協力者 | 川俣 太 (Kawamata Futoshi) | | |

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 |
|---------|---------|