

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 5 月 29 日現在

機関番号：32612

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2015～2016

課題番号：15K15297

研究課題名(和文)オルガノイド技術を用いた大腸がん浸潤・転移機構の解明

研究課題名(英文)Understanding of invasion/metastasis mechanism in colorectal cancer using organoid technology

研究代表者

佐藤 俊朗 (Sato, Toshiro)

慶應義塾大学・医学部(信濃町)・准教授

研究者番号：70365245

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,800,000円

研究成果の概要(和文)：がんの浸潤・転移機構は依然として不明であり、その治療方法に結びついていない。我々は、55ラインのヒト大腸腫瘍オルガノイドを樹立し、その遺伝子変異・発現変化と細胞生物学的な形質の変化への相関性を追求し、これまで困難であったGenotype-Phenotype連関を研究するプラットフォームを構築した。さらに、CRISPR-Cas9によるゲノム編集技術をがんオルガノイドへ応用することにより、プロスペクティブな遺伝子変異や遺伝子機能操作による細胞機能解析が可能となった。本研究により大腸がんの悪性度を規定する形質変化、特に浸潤・転移のメカニズムを追及する研究基盤が確立したといえる。

研究成果の概要(英文)：The pathological mechanism underlying cancer invasion and metastasis remains unknown. We generated 55 lines of human colon tumor organoids and comprehensively analyzed their molecular profiles, and thereby establishing functional assay platform for Genotype-Phenotype correlation. By applying CRISPR-Cas9 genome editing technology to organoids, we succeeded in prospective genetic engineering and gene function analysis system for human colorectal cancers. Our study provides research platform to understand pathological phenotype of cancers that confer them to invasion/metastasis capacity.

研究分野：消化器内科学

キーワード：大腸癌 浸潤 転移 オルガノイド 幹細胞

1. 研究開始当初の背景

大腸がんの罹患率は本邦において増加傾向にあり、近い将来にはがん死亡原因の第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がんの生存率は改善しているが、治療抵抗例も多く、進行がんの死亡率は依然として高い。進行がんの悪性形質として、がん細胞の浸潤・転移機構が最も重要であるが、その分子遺伝学的なメカニズムは未だ解明されていない。

大腸がんの機能解析研究は主に細胞株や遺伝子改変マウスが利用されてきたが、臨床的な大腸がんとの乖離が問題となっている。近年では患者由来大腸がんを免疫不全マウスに直接移植する患者がん異種移植(PDX)モデルが使われるようになった。しかしながら、遺伝子操作や高スループット化の困難性から、患者大腸がん細胞の分子生物学的な研究応用には至っていない。我々は、腸管上皮幹細胞のオルガノイド培養技術を開発し(Sato T et al. Nature 2009, Jung P, Sato T et al. Nature Medicine 2011)、単一のヒト大腸上皮幹細胞およびがん細胞からオルガノイド(3次元組織構造体)を形成させることを報告した(Sato T et al. Gastroenterology 2011)。こうした技術をさらに発展させ、ゲノム編集技術によりヒトオルガノイドの遺伝子を自在に操作することが可能となった。本技術により、従来の細胞株・マウス研究とは異なる視点で大腸がんの浸潤・転移機構を解明するための研究を着想した。

2. 研究の目的

切除不能大腸がんは近年の化学療法が進歩により治療成績が向上しているが、依然としてがん死亡原因の上位にある。本研究は、大腸がんの予後を左右する浸潤・転移のメカニズムを、申請者らが開発したオルガノイド技術により追及する。我々は、ゲノム編集技術

をヒト大腸オルガノイドに応用し、自在な遺伝子変異導入を行うことが可能になった。本技術により、これまで未解明である、大腸がんの浸潤・転移メカニズムの分子遺伝学的研究基盤を構築する。

3. 研究の方法

ヒト正常大腸および大腸がんオルガノイドを作製し、正常・疾患上皮細胞の分子遺伝学的解析に基づいた逆遺伝学的アプローチによる浸潤・転移の分子メカニズムの解明を目指す。

浸潤・転移大腸がんオルガノイドの遺伝子変異・発現解析

ゲノム編集技術を用いた浸潤・転移関連遺伝子発現スクリーニング

オルガノイド培養による浸潤・転移モデルの開発

4. 研究成果

我々は、55ラインのヒト大腸腫瘍オルガノイドを樹立し、その遺伝子変異・発現変化と細胞生物学的な形質の変化への相関性を追求し、これまで困難であった Genotype-Phenotype 連関を研究するプラットフォームを構築した。さらに、CRISPR-Cas9によるゲノム編集技術をがんオルガノイドへ応用することにより、プロスペクティブな遺伝子変異や遺伝子機能操作による細胞機能解析が可能となった。本研究により大腸がんの悪性度を規定する形質変化、特に浸潤・転移のメカニズムを追及する研究基盤が確立したといえる。様々な基礎研究に応用が可能な技術であり、今後の社会への高い波及効果が期待される。

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 10件)

1. Shimokawa M, Ohta Y, Nishikori S, Matano M, Takano A, Fujii M, Date S, Sugimoto S, Kanai T, Sato T. Visualization and Targeting of LGR5+ Human Colon Cancer Stem Cells. **Nature** 2017 in press. 査読有.
DOI: 10.1038/nature22081
2. Kon S, Ishibashi K, Katoh H, Kitamoto S, Shirai T, Tanaka S, Kajita M, Ishikawa S, Yamauchi H, Yako Y, Kamasaki T, Nishikawa A, Kameda I, Maruyama T, Narumi R, Morita T, Sasaki Y, Enoki R, Honma S, Imamura H, Oshima M, Soga T, Miyazaki J, Duchon MR, Nam J, Onodera Y, Yoshioka S, Kikuta J, Ishii M, Imajo M, Nishida E, Fujioka Y, Ohba Y, Sato T, Fujita Y. Cell competition with normal epithelial cells promotes apical extrusion of transformed cells through metabolic changes. **Nature Cell Biology**. 2017;19:530-541. 査読有.
DOI: 10.1038/ncb3509
3. Jinnohara T, Kanaya T, Hase K, Sakakibara S, Kato T, Tachibana N, Sasaki T, Hashimoto Y, Sato T, Watarai H, Kunisawa J, Shibata N, Williams I, Kiyono H, and Ohno H. IL-22BP dictates characteristics of Peyer's patch follicle-associated epithelium for antigen uptake. **J Exp Med**. 2017 in press. 査読有.
4. Loomans CJM, Giuliani NW, Balak J, Ringnalda F, van Gurp L, Huch M, Boj SF, Sato T, Kester L, de Sousa Lopes SMC, Roost MS, Bonner-Weir S, Engelse MA, Rabelink TJ, Heimberg H, Vries RGJ, van Oudenaarden A, Carlotti F, Clevers H, de Koning EJP. Expansion of adult human pancreatic tissue yields organoids harbouring progenitor cells with endocrine differentiation potential. **Science Translational Medicine**. 2017 in press. 査読有.
5. Takeshita K, Mizuno S, Mikami Y, Sujino T, Saigusa K, Matsuoka K, Naganuma M, Sato T, Takada T, Tsuji H, Kushiro A, Nomoto K, Kanai T. A Single Species of Clostridium Subcluster XIVa Decreased in Ulcerative Colitis Patients. **Inflamm Bowel Dis**. 2016;22:2802-2810. 査読有.
DOI: 10.1097/MIB.0000000000000972
6. Blokzijl F, de Ligt J, Jager M, Sasselli V, Roerink S, Sasaki N, Huch M, Boymans S, Kuijk E, Prins P, Nijman I, Martincorena I, Mokry M, Wiegerinck CL, Middendorp S, Sato T, Schwank G, Nieuwenhuis EES, Versteegen MMA, van der Laan LJW, de Jonge J, IJzermans JNM, Vries RG, van de Wetering M, Stratton MR, Clevers H, Cuppen E, van Boxtel R. Tissue-specific mutation accumulation in human adult stem cells during life. **Nature** 2016.;238:260-264. 査読有. DOI: 10.1038/nature19768
7. Ohashi W, Kimura S, Iwanaga T, Furusawa Y, Irie T, Izumi H, Watanabe T, Hijikata A, Hara T, Ohara O, Koseki H, Sato T, Robine S, Mori H, Hattori Y, Watarai H, Mishima K, Ohno H, Hase K, Fukada T. Zinc transporter SLC39A7/ZIP7 promotes intestinal

- epithelial self-renewal by resolving ER stress. **PLoS Genet.** 2016;12:e1006349. 査読有.
DOI: 10.1371/journal.pgen.1006349
8. Dominguez-Brauer C, Hao Z, Elia AJ, Fortin JM, Nechanitzky R, Brauer PM, Sheng Y, Mana MD, Chio II, Haight J, Pollett A, Cairns R, Tworzyanski L, Inoue S, Reardon C, Marques A, Silvester J, Cox MA, Wakeham A, Yilmaz OH, Sabatini DM, van Es JH, Clevers H, **Sato T**, Mak TW. Mule Regulates the Intestinal Stem Cell Niche via the Wnt Pathway and Targets EphB3 for Proteasomal and Lysosomal Degradation. **Cell Stem Cell.** 2016;19:205-16. 査読有.
DOI: 10.1016/j.stem.2016.04.002
9. Fujii M, Shimokawa M, Date S, Takano A, Matano M, Ohta Y, Nanki K, Kawasaki K, Nakazato Y, Uraoka T, Watanabe T, Kanai T, **Sato T**. A colorectal tumor organoid library demonstrates progressive loss of niche factor requirements. **Cell Stem Cell** 2016;18:827-38. 査読有.
DOI: 10.1016/j.stem.2016.04.003
10. Oudhoff MJ, Braam MJS, Freeman SA, Wong D, Rattray DG, Want J, Antignano F, Snyder K, Refaeli I, Hughes MR, McNagny KM, Gold MR, Arrowsmith CH, **Sato T**, Rossi FMV, Tatlock JT, Owen D, Brown PJ, Zaph C. SETD7 controls intestinal regeneration and tumorigenesis by regulating Wnt/beta-catenin and Hippo/YAP signaling. **Developmental Cell.** 2016;37:47-57. 査読有.
DOI: 10.1016/j.devcel.2016.03.002
- [学会発表](計 15件)
1. **佐藤俊朗**, 南木康作, 下川真理子. 加齢・炎症ストレスの及ぼす腸管上皮幹細胞の分子遺伝学的変化. 1PS18 ステムセルエイジング: 老化の謎は解明できるか? 第39回日本分子生物学会年会. 2016年11月30日 パシフィコ横浜(神奈川県横浜市)
2. **Toshiro Sato**. Visualization of Human Colon Cancer Stem Cells Using Organoid Technology. Princess Takamatsu Cancer Research Fund. Current Status and Perspective of Cancer Stem Cell Research. Tokyo Palace Hotel(東京都千代田区). 2016.11.8.
3. **Toshiro Sato**. Easy manipulation of the genome: CRISPR technology. Translational Basic Science Novel models for GI disease. UEGW 2016. Vienna(Austria). 2016.10.17.
4. **Toshiro Sato**. Disease modeling of human colorectal cancer. EMBO | EMBL Symposium. Heidelberg (Germany). 2016.10.15
5. **Toshiro Sato**, Shinya Sugimoto, Mami Matano. Gut environments and human colorectal carcinogenesis. Symposium 17. The intestinal microflora and cancer. The 75th Annual Meeting of the Japanese Cancer Association. PACIFICO Yokohama (Yokohama, Kanagawa). 2016.10.8
6. **佐藤俊朗**. ヒト大腸発がん・がん幹細胞のゲノム編集を用いた機能解析. 創薬薬理フォーラム 第24回シンポジウム. 日本薬学会. 長井記念館(東京都渋谷区). 2016年9月29日
7. **佐藤俊朗**. 太田悠木, 股野麻未, 藤井正

幸, 下川真理子. ヒト大腸がん発がん・がん幹細胞のゲノム編集を用いた機能解析. 第 89 回日本生化学会大会. 仙台国際センター (宮城県仙台市). 2016 年 9 月 25 日

8. **Toshiro Sato.** Disease Modeling of Colorectal Cancer Using Organoids. Concurrent IV Disease modeling II. ISSCR 2016. San Francisco(America). 2016.7.25
9. **Toshiro Sato.** Disease modeling of colorectal cancer using organoids. The 41st Naito Conference. CHATERAISE Gateaux Kingdom SAPPORO (Sapporo-shi, Hokkaido). 2016.7.7.
10. **佐藤俊朗.** オルガノイドを用いた消化器がん研究. シンポジウム 7 3次元構築の中のがん細胞. 第 68 回日本細胞生物学会大会・京都テルサ(京都市南区). 2016 年 6 月 16 日
11. **佐藤俊朗.** 腸管上皮オルガノイド培養の確立とその応用. 特別企画 2 日本から世界に向けて発信されたトップ研究 第 102 回日本消化器病学会大会. 京王プラザホテル(東京都新宿区). 2016 年 4 月 22 日
12. **Toshiro Sato.** Intestinal Stem Cell Niche Signaling in Homeostatic and Diseased Epithelium. Session2. Gut homeostasis and IBD. The 5th International Forum of the 102nd General Meeting of the Japanese Society of Gastroenterology. 京王プラザホテル(東京都新宿区). 2016.4.21
13. **Toshiro Sato.** Dynamics of stem cell system in intestinal epithelium. Biochemistry and Molecular Biology 2015. Symposium 3S4 Cell and Time, 神戸ポートピアホテル(兵庫県神戸市), 2015. 12.3

14. **Toshiro Sato.** Modeling Colorectal Cancer with Organoid Culture System. Till&McCulloch Meeting 2015. Toronto(Canada). 2015.10.27

15. **Toshiro Sato.** Modeling of Colorectal Cancer in a dish using an organoid culture system. 112th International Titisee conference. Schwarzwaldhotel Titisee(Germany). 2015.10.22

〔図書〕(計 0 件)

〔産業財産権〕

出願状況(計 0 件)

取得状況(計 0 件)

〔その他〕
ホームページ等
なし

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・准教授
研究者番号: 70365245

(2) 研究分担者
なし

(3) 連携研究者
なし

(4) 研究協力者
なし