

**科学研究費助成事業 研究成果報告書**

平成 29 年 5 月 26 日現在

機関番号：11301

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2015～2016

課題番号：15K19309

研究課題名(和文)大腸癌パネート細胞は有望な治療ターゲットになりうるか？

研究課題名(英文)Analysis of niche forming factors (paneth cells) for colon cancer stem cells.

## 研究代表者

黒羽 正剛 (KUROHA, MASATAKE)

東北大学・大学病院・特任助手

研究者番号：70709469

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 1,800,000円

研究成果の概要(和文)：消化管上皮幹細胞は永続的な自己複製能と4種類の腸管上皮細胞への分化能を有し、腸管の恒常性維持に重要な役割を果たしている。大腸腫瘍幹細胞でのニッチ形成因子やニッチ要求性の有無は明らかではなかった。本研究者は大腸腺腫、癌幹細胞においても、その生存にニッチ形成する因子が関与している事と、幹細胞からのEVがニッチ形成に関与している可能性を見出した。

研究成果の概要(英文)：Intestinal stem cells have the ability for both permanent self-renewal and differentiation into four types of intestinal epithelial cells. The intestinal stem cells play an important role in maintaining the intestinal homeostasis. However the presence of niche forming factors in colon cancer/adenoma stem cells was not clear. Here, we present that niche forming factors are also necessary for survival of colon cancer/adenoma stem cells and the possibility that EVs(Extracellular vesicles) secreted from stem cells are involved in niche formation.

研究分野：消化器内科

キーワード：大腸癌 幹細胞

## 1. 研究開始当初の背景

### 研究の学術的背景

消化管上皮幹細胞は永続的な自己複製能と4種類の腸管上皮細胞への分化能を有し、腸管の恒常性維持に重要な役割を果たしている。2007年 BakerらはLgr5陽性でパネート細胞間に存在するCrypt Columnar Cellが腸管上皮幹細胞である事を証明した(Nature, 2007)。腸管幹細胞はその機能維持に様々なニッチ因子が必要で、腸管上皮幹細胞に近接するCD24陽性のパネート細胞(Nature, 2010)、大腸ではc-kit陽性の上皮細胞(Gastroenterology, 2012)がニッチを形成している事が報告されている。長らく腸管上皮幹細胞の*in vitro*での培養は成功していなかったが、2011年ニッチを疑似的に形成する因子を培地に添付する事で幹細胞が培養維持できる事が示された。

正常幹細胞の維持にニッチが必須である事が判明しているが、大腸癌幹細胞の増殖におけるニッチの存在は不明であった。これまでの報告では、腺腫内でLgr5陽性細胞がtumor initiating cellになっており(Nature, 2009)、この腺腫はパネート細胞とのニッチを形成している事も報告されている(Science, 2012)。我々は、大腸癌幹細胞においてもニッチが必要不可欠であると考え、ニッチ不応性を会得した大腸癌幹細胞が治療抵抗性を示しEMTをきたすと考えた。2014年7月大腸癌培養細胞株のSW480細胞にiPS細胞誘導に必要なOCT3/4、SOX2、KLF4を遺伝子導入し癌幹細胞の性質を有する細胞群の誘導が可能なる事が報告された(Prosone, 2014.)。ここで作製されたcell line由来の癌幹細胞は、ニッチ不要な培養条件で成長する事が確認されている。樹立した大腸癌長期培養株にiPS細胞誘導に必要なOCT3/4、SOX2、KLF4を遺伝子導入する事で、安定的な大腸癌幹細胞が作成可能で、大腸癌幹細胞とニッチ形成をしている大腸癌パネート細胞の存在も明らかになると推定した。

## 2. 研究の目的

本研究の当初の目的は、大腸癌幹細胞におけるニッチの存在を確定する事であった。代表的なニッチとして、大腸癌パネート細胞の存在を推定していた。また、研究過程でこれまで報告されていない新たなニッチ因子の同定と、将来臨床応用に結び付くような新たな着想したテーマも適宜進行させる事を目的とした。

## 3. 研究の方法

### (1)ヒト大腸癌組織の単離と長期培養

ニッチの要求性の異なる大腸癌細胞を選別する為、腺腫、早期癌、進行癌、転移癌までを対象とする。標本から単離した細胞をコレゲナーゼ処理後にマトリゲル内に包埋し、すべてのニッチ因子を添加する事で、様々なニ

ッチ要求性を示す大腸癌細胞でも培養可能である事を確認する。また、培養したオルガノイドを継代し、長期培養可能であることを確認する。

(2)樹立したオルガノイドの病理学的評価  
オルガノイドをHE染色し、樹立元の大腸癌組織との相同性を確認する。

(3)樹立したオルガノイドのニッチ要求性  
各癌幹細胞のニッチ要求性が異なる事を証明するため、樹立した各オルガノイドからニッチ因子(Wnt3a、EGF、Noggin、R-spondin1)を一つずつ除外しニッチ要求性が異なる事を証明する。これにより、大腸癌、大腸腺腫でも、その培養維持にニッチ形成因子が必要であることを証明する。

研究計画発案当初、大腸癌オルガノイドに関する報告はまだ少なく、幹細胞性の結論は明らかではなかった。そのため、幹細胞性の確認目的にNOD-scidマウスを用いた異種移植アッセイとオルガノイドのiPS化を予定していた。しかし、大腸癌オルガノイドの幹細胞性を確認を得る報告(Cell stem cell 2016)が新たにあり、研究の目的の項に記載した新知見に基づき新たな研究として、大腸癌幹細胞の新たなニッチ形成因子として大腸癌から分泌されるEV(extracellular vesicle)に注目し、研究の目的に追加した。EVとは100nmの小胞顆粒で、様々な種類の細胞から分泌され、脂質二重膜を有し顆粒の内部には蛋白質、核酸(mRNA、miRNA、DNA)、脂質を含み、細胞外に分泌され別の細胞に移動する事が可能で、受容体や酵素と全く異なった細胞間伝達機構、細胞の恒常性維持機構として注目されている。オルガノイドにおけるニッチ因子とEVの関与についての検討を目的に追加した。

(4)大腸癌培養細胞、および大腸癌オルガノイドがEVを分泌しているか  
大腸癌培養細胞のSW480、及び樹立したオルガノイドを用いて細胞からのEV放出の有無を確認する。得られた培養細胞株の上清を回収。遠心(2000×g,30min)し細胞をペレットとする。Total Exosome Isolation(invitrogen)を用いて抽出する。抽出したEVの個数・形態をナノ粒子アナライザー(qNano)・電子顕微鏡で解析する。得られたEVサンプルからTotal Exosome RNA and Protein Kit(invitrogen)を用いてtotalRNAを精製する。バイオアナライザーを用いてmicroRNAの抽出を確認する。マイクロアレイにて網羅的に遺伝子発現プロファイルを比較する。GreenChip miRNA assayを用いて2群間で発現が異なるmiRNAを絞り込む。

## 4. 研究成果

### (1)ヒト大腸癌組織の単離と長期培養

これまで 27 の臨床検体（腺腫～早期癌、進行癌）を用いて大腸癌オルガノイドの長期培養を試みた。標本から単離した細胞をマトリゲル内に包埋し培養する。マトリゲルを用いる事と、疑似的にニッチを形成する事で癌細胞はオルガノイドを形成する事が可能であった。基本培地以外に Wnt3a、EGF、Noggin、R-spondin1、B-27、ガストリン、ニコチンアミド、A83-01、p38 阻害剤を添加し疑似的なニッチを保った。この状態で 6 検体で長期培養に培養に成功し、臨床検体からも大腸癌が長期培養可能であることを示した。ニッチ因子を十分補充する事で培養可能であった事は、大腸癌、大腸腺腫幹細胞も、生存、維持には周囲のニッチ因子が必要不可欠である事が判明した。樹立した 6 検体の内訳は、腺腫 3 検体（株名：AD1,AD2,AD3）、早期癌 2 検体（株名:HGD1,HGD2）、進行癌 1 検体(CRC1)で、腫瘍の進行度に関わらず安定した長期培養が可能であることを確認した。初代培養から長期培養へと手技が安定するまで時間を要した。

### (2)樹立したオルガノイドの病理学的評価

樹立したオルガノイドを iP gelI を用いてパラフィン固定した。固定した標本に HE 染色を施行して、顕微鏡観察した。オルガノイドは腺管に類似した構造をしており、この形態は培養元の腫瘍組織類似している事を確認した。

### (3)樹立したオルガノイドのニッチ要求性

各々のオルガノイドを用いて、オルガノイドとニッチ要求性、腫瘍の組織との相関関係を示した。株名 AD1 では p38 阻害剤(SB202190)、EGF が発育に必須であった。株名 AD3 では、EGF のみニッチ形成に必須であった。AD1,AD3 共に病理学的には同じ腺腫であったが、細胞種によりニッチ要求性が異なる事が判明した。株名 CRC1 では、EGF,Noggin,A83-01,p38inhibitor すべてのニッチ因子は不要であった。進行度により大腸癌幹細胞の維持に必要なニッチ因子が減る傾向が示された。これらの研究により、大腸腺腫、大腸癌幹細胞はニッチ因子により発育を制御されている事が明らかとなった。また、ニッチの要求性は、既存の病理組織検査では

### (4)大腸癌培養細胞、および大腸癌オルガノイドが EV を分泌しているか

これまで、大腸腺腫、癌オルガノイドから EV を抽出した報告はなかった。EV 抽出は 培養上清のみ、培養上清および、マトリゲルを

融解したものの 2 種類で測定した。Total Exosome Isolation(invitrogen)を用いて抽出した EV から、microRNA を精製。バイオアナライザーで検出した所、培養上清からは microRNA が抽出できなかったが、マトリゲルを融解したもので microRNA が確認された。これはオルガノイドから分泌されている EV であり、EV がニッチ形成因子に関与している可能性が示唆された。現在、ターゲットとなる microRNA を検索中である。

### 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）

本研究課題と直接ならびに間接的に関わる研究成果を以下に示す

〔雑誌論文〕(計 8 件)

(1) Kakuta Y, Kimura T, Negoro K, Kuroha M, Shiga H, Endo K, Kinouchi Y, Shimosegawa T. Increased expression of IL12B mRNA transcribed from the risk haplotype for Crohn's disease is a risk factor for disease relapse in Japanese patients. J Gastroenterol. 2017 Feb 22. doi: 10.1007/s00535-017-1322-5. 査読有

(2) Onodera M, Endo K, Kakuta Y, Kuroha M, Kimura T, Hiramoto K, Kanazawa Y, Negoro K, Shiga H, Kinouchi Y, Shimosegawa T. ATP-binding cassette subfamily B member 1 1236C/T polymorphism significantly affects the therapeutic outcome of tacrolimus in patients with refractory ulcerative colitis. J Gastroenterol Hepatol. 2017 Jan 30. doi: 10.1111/jgh.13753. 査読有

(3) Tadano T, Kakuta Y, Hamada S, Shimodaira Y, Kuroha M, Kawakami Y, Kimura T, Shiga H, Endo K, Masamune A, Takahashi S, Kinouchi Y, Shimosegawa T. MicroRNA-320 family affects tumor proliferation by targeting cyclin-dependent kinases 6 and is downregulated in colorectal adenoma and submucosal invasive carcinoma. World J Gastrointest Oncol. 2016 Jul 15;8(7):532-42. doi: 10.4251. 査読有

(4) Chiba H, Endo K, Fujishima F, Ohtsuka H, Naitoh T, Kuroha M, Kimura T, Shiga H, Kakuta Y, Kinouchi Y, Unno M, Shimosegawa. A case of a ruptured submucosal aneurysm of the small intestine identified using double-balloon enteroscopy. T. Clin J Gastroenterol. 2016 Apr;9(2):49-54. 査読有

(5) Endo K, Onodera M, Shiga H, Kuroha M, Kimura T, Hiramoto K, Kakuta Y, Kinouchi Y, Shimosegawa T. A Comparison of Short- and Long-Term Therapeutic Outcomes of Infliximab- versus Tacrolimus-Based Strategies for Steroid-Refractory Ulcerative Colitis. *Gastroenterol Res Pract*. 2016;2016:3162595. doi:10.1155/2016/3162595. 査読有

(6) Shiga H, Kuroha M, Endo K, Kimura T, Kakuta Y, Kinouchi Y, Kayaba S, Shimosegawa T. Colorectal endoscopic submucosal dissection (ESD) performed by experienced endoscopists with limited experience in gastric ESD. *Int J Colorectal Dis*. 2015 Dec;30(12):1645-52. doi:10.1007/s00384-015-2334-3. 査読有

(7) Kakuta Y, Naito T, Onodera M, Kuroha M, Kimura T, Shiga H, Endo K, Negoro K, Kinouchi Y, Shimosegawa T. NUDT15 R139C causes thiopurine-induced early severe hair loss and leukopenia in Japanese patients with IBD. *Pharmacogenomics J*. 2015 Jun 16. doi: 10.1038/tpj.2015.43 査読有

(8) Naito T, Shiga H, Endo K, Kuroha M, Kakuta Y, Kinouchi Y, Shimosegawa T. De novo Crohn's disease following orthotopic liver transplantation: a case report and literature review. *Intern Med*. 2015;54(2):199-204. doi:10.2169/internalmedicine.54.3156. 査読有

〔学会発表〕(計2件)

(1) Naito T, Kakuta Y, Onodera M, Kimura T, Kuroha M, Shiga H, Endo K, Negoro K, Kinouchi Y, Shimosegawa T. Genotyping of NUDT15 R139C Could Be a Companion Diagnostic Test for Thiopurine-Induced Leucopenia and Hair Loss in Japanese Patients With IBD. *Digestive Disease Week 2015*. May 16 - 19, Washington, DC

(2) Naito T, Kakuta Y, Onodera M, Kimura T, Kuroha M, Shiga H, Endo K, Negoro K, Kinouchi Y, Shimosegawa T. Thiopurine-induced leucopenia and hair loss were inevitable in Japanese IBD patients homozygous for NUDT15 R139C : a case series. 10th Congress of ECCO 2015. Sep 25-29, Vienna, Austria.

〔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

<http://www.gastroente.med.tohoku.ac.jp>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

黒羽 正剛 (KUROHA MASATAKE)

東北大学・病院・特任助手

研究者番号：70709469