

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 6 月 7 日現在

機関番号：32612

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2015～2016

課題番号：15K19349

研究課題名(和文) HTS技術による消化器がん幹細胞を標的とした個別化医療開発

研究課題名(英文) High-throughput screening for personalized medicine targeting gastrointestinal cancer stem cell.

研究代表者

高野 愛 (TAKANO, AI)

慶應義塾大学・医学部(信濃町)・研究員

研究者番号：50647584

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)：ヒト消化器がん(大腸、胃、肝臓、膵臓)患者から採取した生検組織からがんオルガノイドを樹立し、最適化した培養環境下において大量培養することに成功した。また遺伝子操作技術を用いて蛍光蛋白レポーター-Lgr5遺伝子座位へのノックインによりがん幹細胞の可視化に成功し、この技術を利用して、樹立した消化器がん幹細胞の可視化を行った。これらの樹立したがんオルガノイドを用いてHTSを行った。可視化した消化器がんオルガノイドに対し、360種類のPKI libraryを用い、HTSを行った結果、各消化器がん細胞及びがん幹細胞に効果を有する薬剤がいくつか得られた。

研究成果の概要(英文)：We have established gastrointestinal cancer organoids from the patient. As a result, we succeeded in isolating 4 kinds of tumor organoids including colorectal, gastric, liver, and pancreatic cancer from patient. It was possible to continuously and long-term culture of each of the human gastrointestinal cancer organoids by optimizing the culture condition based on the organoid culture protocol. We also have been successful knocked-in reporter to LGR5 locus of intestinal organoids using genome editing. Each gastrointestinal cancer organoids derived from patients became culture in 384-well plate. Furthermore, we have established tumor organoids; based High-throughput drug screen system. Image analysis was performed with 360 drugs on tumor organoids using High Contents Analyzer. Our results suggest that our established HTS for tumor organoids will be apply to genetic mutation based drug discovery and personalized medicine.

研究分野：下部消化管学

キーワード：消化器がん HTS 大腸癌 がん幹細胞

1. 研究開始当初の背景

近年、エビデンスレベルの高い化学療法の進歩や、明確な治療ターゲットをもつ分子標的薬の進歩により、切除不能消化器がんの生存期間延長が達成された。

一方、我が国の消化器がんはがん死亡率の50%以上を占めており、進行がんの根治治療法の開発は依然として課題となっている。最近のがんゲノムプロジェクトにより、腫瘍間での分子遺伝学的な Heterogeneity が明らかにされ、従来の画一的な治療から個別の患者腫瘍に最適な治療薬を投与する Precision Medicine への期待が高まっている。

我々は患者腫瘍を体外で高密度に増殖させ、人体に投与可能な全ての薬剤に対する感受性を培養皿上で試験する技術を実現するために本研究を考案した。

2. 研究の目的

申請者研究室において既に開発および培養が確立された、患者由来の消化器がん(大腸、胃、肝臓、膵臓、胆管、胆嚢がん)の3次元組織構造体(オルガノイド)を応用し、蛍光蛋白レポーターの導入によりがん幹細胞を可視化し、それらを用いた High Throughput Screening(HTS)に基づく新たな創薬スクリーニングの確立を目的とする。

3. 研究の方法

申請者の研究室では既に、消化器がん(食道・胃・大腸・肝臓・胆管・膵臓・胆嚢がん)からのがんおよび隣接正常組織の培養と遺伝子解析に関わる研究が慶應義塾大学医学部倫理委員会にて承認されている。インフォームド・コンセントの得られた患者より、外科手術または内視鏡によって採取された組織を大腸がん細胞培養に準じた方法(Sato T et al. Gastroenterology 2011)で、がん細胞を分離する。

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う(基本培養プロトコルは Sato T et al. Nature 2009 に基づく)。

具体的にはヒト消化器がん(大腸・膵臓)手術検体または内視鏡生検検体から、正常腸管上皮および大腸癌組織を採取し、オルガノイドを樹立する。樹立した消化器がんオルガノイドは至適培養条件で大量培養を行い 384 well プレートの各 well に均等にオルガノイドを Cell Sorter にて播種し、約 360 種類の Protein Kinase Inhibitor (PKI) library を用い、High Throughput スクリーニングを行う。その後、High Contents Analyzer (In Cell analyser 6000)を用い解析を行う。

樹立したオルガノイドに対し、ゲノム編集技術を用いた遺伝子ノックアウト・ノックイン技術の導入を行う。

人工的な大腸発がん系確立のため、ドライバー遺伝子と呼ばれる、大腸発がんへの寄与が統計学的に確認されている遺伝子群をノックインまたはノックアウトする。さらに、大腸がん幹細胞の可視化および細胞系譜解析のため、がん幹細胞のマーカー遺伝子である LGR5 遺伝子領域に蛍光蛋白または遺伝子組換え酵素である CreER のノックインを行う。

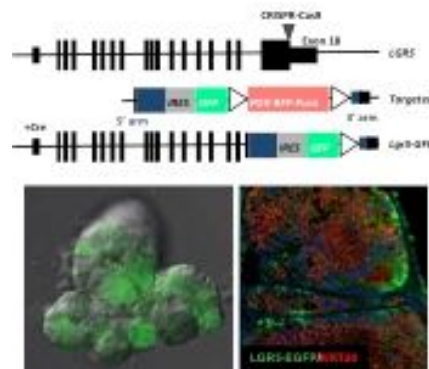
作製したがん幹細胞可視化消化器癌を用いてがん幹細胞を標的とした治療薬の効果を検討する。また、HTS の一次スクリーニングで得られた Hits 化合物の中には偽陽性がいくつか含まれるため、それらを排除するためにバリデーション(生物学的検証)を行う。その際、IC50 値に基づいて濃度検討を行い、細胞増殖阻害を示す至適濃度を確認する。

バリデーションで得られた薬剤の *in vivo* での効果を検証する。免疫不全マウスの Xenograft 技術を用いてがんオルガノイドあるいは幹細胞可視化大腸癌を腎皮膜下に移植し、生着、増殖能、浸潤転移したがん幹細胞に対して、選定した薬剤投与の効果判定を行う。

4. 研究成果

ヒト消化器がん(大腸、胃、肝臓、膵臓)患者から採取した生検組織から、我々の確立した方法(Sato T et al. Nature 2009, Jung P, Sato T et al. Nature Medicine 2011)でがんオルガノイドを樹立し、最適化した培養環境下において大量培養することに成功した。

また遺伝子操作技術を用いて蛍光蛋白レポーター-Lgr5 遺伝子座位へのノックインによりがん幹細胞の可視化に成功しており(Fig.1, 下図)(Shimokawa M et al. Nature 2017)、この技術を利用して、樹立した消化器がん幹細胞の可視化を行った。



これらの樹立したがんオルガノイドを用いて High Throughput Screening (HTS)を行った。

具体的には可視化した上皮オルガノイドを 384 well プレートに Cell Soter を用いて Single sort し, High Contents Analyzer (In Cell analyser 6000) を用いた High Throughput の化合物スクリーニングを確立した。可視化した消化器がんオルガノイドに対し, 360 種類の Protein Kinase Inhibitor (PKI) library を用い, High Throughput Screening(HTS)を行った結果, 各消化器がん細胞及びがん幹細胞に効果を有する薬剤がいくつか得られた(Fig.2,3. 下図参照)。

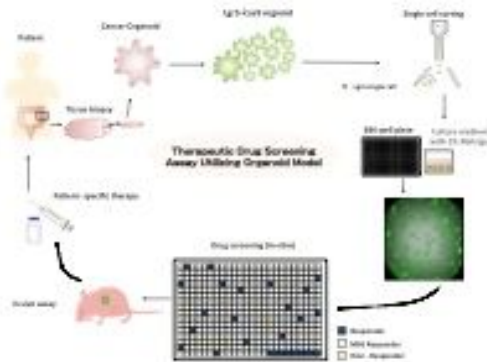


Fig.2

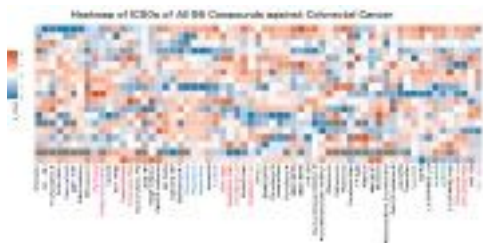
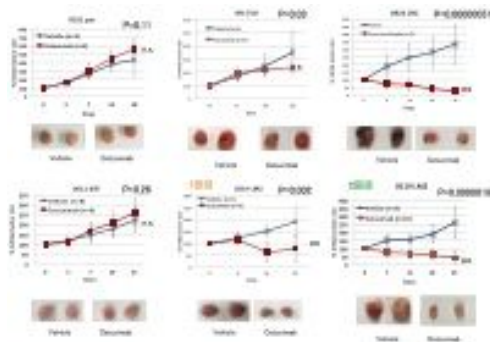


Fig.3

バリケーションで得られた薬剤の in vivo での効果も検証も行った。免疫不全マウスの Xenograft 技術を用いてがんオルガノイドを

腎皮膜下に移植し、生着、増殖能、浸潤転移したがん幹細胞に対して、選定した薬剤投与の効果判定を行った。(Fig.4. 下図参照)



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2件)

全て査読あり

- (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 May 11;545(7653):187-192. doi: 10.1038/nature22081. Epub 2017 Mar 29.
- (2) Fujii M, Shimokawa M, Date S, Takano A, Matano M, Nanki K, Ohta Y, Toshimitsu K, Nakazato Y, Kawasaki K, Uraoka T, Watanabe T, Kanai T, Sato T. A Colorectal Tumor Organoid Library Demonstrates Progressive Loss of Niche Factor Requirements during Tumorigenesis. Cell Stem Cell. 2016 Jun 2;18(6):827-38. doi: 10.1016/j.stem.2016.04.003. Epub 2016 May 19.
- (3) Matano M, Date S, Shimokawa M, Takano A, Fujii M, Ohta Y, Watanabe T, Kanai T, Sato T. Modeling colorectal cancer using CRISPR-Cas9-mediated engineering of human intestinal organoids. Nature medicine. 2015 Mar;21(3):256-62. doi: 10.1038/nm.3802. Epub 2015 Feb 23.

〔学会発表〕(計0件)

〔図書〕(計0件)

〔産業財産権〕

出願状況(計0件)

名称:

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：
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

6．研究組織

(1)研究代表者

高野 愛 (Ai Takano)
慶應義塾大学・医学部・研究員
研究者番号：50647584

(2)研究協力者

佐藤 俊朗 (SATO, Toshiro)
慶應義塾大学・医学部・特任准教授
研究者番号：70365245

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