

令和元年6月4日現在

機関番号：32612

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2016～2018

課題番号：16K09325

研究課題名(和文) 遺伝子ネットワーク摂動による人工的な転移性大腸癌の作製

研究課題名(英文) Generation of artificial colorectal cancer by gene network perturbation

研究代表者

股野 麻未 (Matano, Mami)

慶應義塾大学・医学部(信濃町)・研究員

研究者番号：20439889

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)：正常大腸上皮より浸潤・転移をきたす悪性度の高い大腸癌の形成過程は未だ明らかになっていない。我々の作成した遺伝子改変正常大腸上皮オルガノイドもその再現には至らなかったため、本研究ではエピジェネティクスな変化の関与を想定し、転写因子群を同定することを目的とした。具体的には我々が保有する大腸癌のデータベースより転写因子を抽出、過剰発現ベクターを作成、遺伝子改変正常大腸上皮オルガノイドに導入し、マウスでの肝転移形成の有無につき評価を行った。結果的にはいずれの転写因子の組み合わせでも肝転移は認められず、今後更なる検討が必要であると考えられた。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究結果の学術的意義は、今回我々が選択した転写因子だけでは既存の大腸発癌の理論を補完・再現するには不十分である可能性が示唆されたことである。本成果より、今回着目した転写因子の変動をきたす、より根源的原因の探索の必要性が考えられた。社会的意義として、その根源的原因が今後の治療標的となる可能性が示唆された。

研究成果の概要(英文)：The factors contributing in the malignant transformation process of normal colon epithelium are still unknown. The genetically-engineered normal colon organoids in our laboratory did not develop into a colorectal cancer, suggesting the involvement of additional factors. We assumed the involvement of the epigenetic changes and aimed to identify the transcription factors. To identify the transcription factors, we extracted the transcription factors using our database of colorectal cancer organoids, and constructed the overexpression vectors. We introduced them into genetically-engineered normal colon organoids and transplanted to mice to evaluate the presence of liver metastasis. Consequently, no liver metastasis were observed with any combination of transcription factors, and we concluded that further study is required.

研究分野：消化器内科学

キーワード：大腸癌 オルガノイド

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19、CK - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

本邦における大腸癌の新規罹患患者数は年々増加傾向にある。正常大腸上皮からの発癌に関しては良性腫瘍である腺腫を経る adenoma-carcinoma sequence の発癌機構が提唱されており、多段階の遺伝子変異が大腸癌の悪性形質転換をきたすと考えられてきた。しかし、プロスペクティブに正常大腸上皮より転移性大腸癌形成を行った報告はない。我々の研究室では腸管上皮幹細胞の同定と幹細胞ニッチの理解により、基底膜細胞を擬似した Matrigel 中にニッチ因子を加えることで大腸正常上皮の永続的なオルガノイド培養を可能にした (Sato T et al. Nature. 2009, Sato T et al. Gastroenterology. 2011)。我々は本腸管上皮培養法を用いて正常大腸上皮を培養し、CRISPR-Cas9 遺伝子改変技術を用いて既存の 5 つの遺伝子変異 (APC, KRAS, TP53, SMAD4, PIK3CA) を組み込むことで人工大腸癌の作成を試みた。作成した遺伝子改変オルガノイドを用いて mRNA 発現プロファイルやマウス移植での動態の検討を行い、患者由来の大腸癌オルガノイドとの比較・検討を行った (図 1)。その結果、人工的に作成した遺伝子改変オルガノイドの mRNA 発現プロファイルは大腸腺腫と類似し患者由来の大腸癌とは異なること、また肝転移を起こさず大腸癌を形成しないことが示された (Matano M et al. Nature Medicine. 2015)。本成果は、今まで提唱されてきた大腸発癌メカニズムをプロスペクティブに検証する成果であり、既存の理論では大腸発癌メカニズムには至らないことを示す世界で初めての報告となった。そのため、我々は転移性大腸癌の形成には遺伝子異常のみでなく更なる変化が必要と考え、転写因子によるエピジェネティックな変化を加えることで大腸上皮の悪性化を試みた。

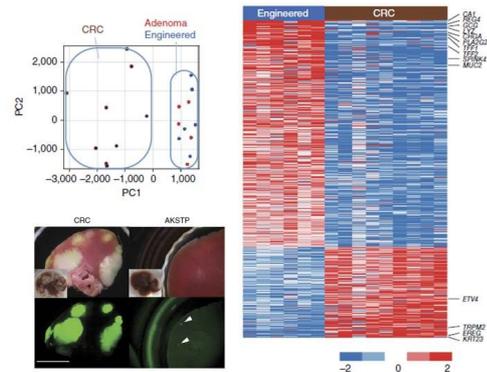


図 1: 遺伝子改変オルガノイドと患者由来の大腸癌のマイクロアレイデータと PCA, 肝転移の図

2. 研究の目的

本研究は大腸発癌におけるエピジェネティックな変化の関与を想定し、その転写因子群を同定することで大腸発癌機構の解明、創薬に結び付けることを目的とした。

3. 研究の方法

本研究計画では大腸発癌におけるエピジェネティックな変化の関与を想定し、その転写因子群を同定することで大腸発癌機構を解明する。下記の要領で研究計画を進めた (図 2)。

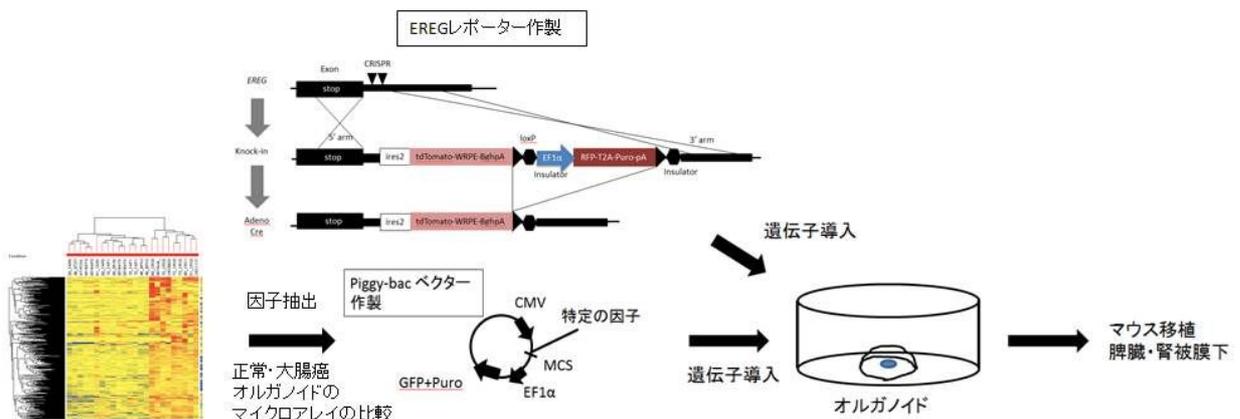


図 2: 実験全体のシエマ

(1) 大腸上皮悪性化への関連が想定される転写因子抽出からの実験系の確立

我々の研究グループで解明した大腸癌と正常大腸上皮オルガノイドのマイクロアレイデータを比較・検討, 更に TCGA 等の既存のデータベースと比較することで候補となる転写因子を選択する。各々の因子に対しては Piggy-bac GFP 発現ベクターを作製し, EF1 promoter-GFP を用いて, ベクターが導入された細胞を GFP により可視化できる仕組みを作製する。転写因子のランダムな組み合わせが細胞ゲノムへ導入されることが期待され, 最低 1 つの転写因子が人為的に導入されたオルガノイドを選択できるように調整する。

(2)悪性化の指標となるレポーターアッセイ系の確立

我々の研究グループで得られた大腸癌遺伝子発現データの解析から、腺腫から癌へのエピジェネティックな変化に関与していると考えられたエピレギュリン (EREG)の発現を定量可能にするシステムを作製する。CRISPR-Cas9 システムを用いて EREG の発現していない遺伝子改変オルガノイドに knock-in, 内在性の EREG 転写に応じて蛍光タンパクが発現するアッセイ系を作製する。

(3) 免疫不全マウスの腎被膜下・脾臓への転移能の評価、悪性化機序に関与する転写因子群の同定

全ての候補因子がランダムに入った遺伝子改変オルガノイドを免疫不全マウスの脾臓・腎被膜下に移植し、2か月後に解剖、肝転移の出現ならびに遺伝子発現の変化に関して解析する。具体的にはそれぞれの転移巣より細胞を抽出し、オルガノイドを個々に作製、次世代シーケンズやマイクロアレイ、Primary Component Analysis(PCA)で共通する因子の検索を行う。脾臓の各転移巣において共通している因子を抽出し、その因子のみを導入したオルガノイドを作製、悪性化に必要な最低限の因子を同定する。

4 . 研究成果

研究グループの有する大腸癌・正常大腸上皮オルガノイドのマイクロアレイデータを慎重に比較・検討することで、我々は大腸上皮悪性化への関与が疑われた 13 個の転写因子を選択した。その後、これら 13 個の因子の過剰発現ベクターを作成した。これらの因子のうち少なくとも 1 つの転写因子ベクターが導入されたオルガノイドが選択できるようにベクターには抗生剤耐性と GFP での蛍光標識を行った。次にこれらの転写因子ライブラリーを遺伝子改変オルガノイドに導入した。導入にあたってはランダムな組み合わせを起こすために 13 個全ての転写因子を同時に導入した。導入される因子の個数は抗生物質選択により最低 1 つの転写因子は導入されているオルガノイドが選択されたが、その導入転写因子数は確率に依存することとした。なお、ランダムサンプリングを行い、転写因子が導入されていることは PCR 法を用いて確認され、その過剰発現ベクターの機能はウェスタンブロット法を用いて確認された。その後、転写因子が導入されたオルガノイドを免疫不全マウスの脾臓・腎被膜下に移植、2か月後に解剖し、肝転移の出現ならびに遺伝子発現の変化に関して解析した。

結果的には本実験を複数回繰り返しても肝転移を引き起こす遺伝子改変オルガノイドを得ることはできなかった。選択された転写因子の導入は移植前に確認されていたため、想定した転写因子が導入されなかったのではなく、転写因子の不足、転写因子同士の相互作用等が原因として想定された。また、今回は転写因子過剰発現に限って検討を行ったが、メチル化等の発現低下の想定も検討が必要と考えられた。

今後の研究では、転写因子の同定を目的として大腸癌のデータの更なる拡張を行うと共に新しいスクリーニング方法の検討や因子の追加を検討したい。

5 . 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計5件)

1. Fujii M, Matano M, Toshimitsu K, Takano A, Mikami Y, Nishikori S, Sugimoto S, Sato T. Human Intestinal Organoids Maintain Self-Renewal Capacity and Cellular Diversity in Niche-Inspired Culture Condition. Cell Stem Cell. 査読あり . 2018 Dec 6;23 :787-793.e6. DOI: 10.1016/j.stem.2018.11.016.
2. Nanki K, Toshimitsu K, Takano A, Fujii M, Shimokawa M, Ohta Y, Matano M, Seino T, Nishikori S, Ishikawa K, Kawasaki K, Togasaki K, Takahashi S, Sukawa Y, Ishida H, Sugimoto S, Kawakubo H, Kim J, Kitagawa Y, Sekine S, Koo BK, Kanai T, Sato T. Divergent Routes toward Wnt and R-spondin Niche Independency during Human Gastric Carcinogenesis. Cell 査読あり . 2018 Aug 9;174:856-869.e17. DOI: 10.1016/j.cell.2018.07.027.
3. Seino T, Kawasaki S, Shimokawa M, Tamagawa H, Toshimitsu K, Fujii M, Ohta Y, Matano M, Nanki K, Kawasaki K, Takahashi S, Sugimoto S, Iwasaki E, Takagi J, Itoi T, Kitago M, Kitagawa Y, Kanai T, Sato T. Human Pancreatic Tumor Organoids Reveal Loss of Stem

Cell Niche Factor Dependence during Disease Progression. Cell Stem Cell 査読あり .
2018 Mar 1;22:454-467.e6.

DOI: 10.1016/j.stem.2017.12.009.

4. Sugimoto S, Ohta Y, Fujii M, Matano M, Shimokawa M, Nanki K, Date S, Nishikori S, Nakazato Y, Nakamura T, Kanai T, Sato T. Reconstruction of the Human Colon Epithelium In Vivo. Cell Stem Cell 査読あり . 2018 Feb 1;22:171-176.e5.

DOI: 10.1016/j.stem.2017.11.012.

5. 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 査読あり . 2017 May 11;545:187-192.

DOI: 10.1038/nature22081.

6 . 研究組織

(1)研究分担者

研究分担者氏名：佐藤 俊朗

ローマ字氏名：SATOU, Toshiro

所属研究機関名：慶應義塾大学

部局名：医学部

職名：教授

研究者番号（8桁）： 70365245

科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属されます。