

令和元年5月30日現在

機関番号：12602

研究種目：研究活動スタート支援

研究期間：2017～2018

課題番号：17H06654

研究課題名(和文) ヒトIBD付随大腸発がん体外モデルの構築

研究課題名(英文) The establishment of human ex vivo model for the carcinogenesis of IBD associated cancer

研究代表者

日比谷 秀爾 (Hibiya, Shuji)

東京医科歯科大学・医学部附属病院・特任助教

研究者番号：20801963

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,100,000円

研究成果の概要(和文)：炎症性腸疾患(IBD)、特に潰瘍性大腸炎(UC)患者では長期の経過により、大腸がんになりやすいことがわかっています。さらに通常の大腸がんよりも悪性度が高く治療が効きにくいことが問題ですが、長期の炎症によりがんができる仕組みはわかりません。そこで、大腸上皮細胞を体外で培養するシステムを構築し、炎症刺激を加えることで長期間の疾患を再現することに成功しました。長期の炎症刺激により、上皮細胞が変化しがんに近づくこともわかり、遺伝子発現解析により発がんに関係する遺伝子の同定にも成功しました。

研究成果の学術的意義や社会的意義

長期間の病歴となるIBD患者では一旦寛解となるも長期間の観察にて癌が発生することから、炎症が沈静化しても上皮細胞は過剰応答状態にある可能性が高いと思われます。我々は炎症応答の蓄積が、がん化の根源と考えその機構を解明することによりIBD付随発がんの予防や一度過剰応答となった細胞をリセットするという新しいがん治療の基盤となることが期待されます。

研究成果の概要(英文)：It is well known that the patients with inflammatory bowel disease (IBD) particularly ulcerative colitis (UC) have an increased risk for colon cancer during long-term disease duration. Moreover, IBD related cancer has higher malignant potential than sporadic colon cancer, resulting in intractable cancer. However, the mechanism for carcinogenesis of IBD related cancer remains unknown. We therefore establish in vitro culture system using human colonic organoids to mimic the process of IBD related carcinogenesis. Finally, we found that colonic epithelial cells were transformed by long-term inflammation. We also identified key molecule correlated with carcinogenesis.

研究分野：消化器内科学

キーワード：IBD付随がん 発がん体外モデル ヒト大腸オルガノイド 上皮細胞機能不全

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

### 1. 研究開始当初の背景

炎症性腸疾患 (IBD) 特に潰瘍性大腸炎 (UC) は長期の持続炎症により癌化を引き起こし患者の予後に密接に関わる。UC 患者では罹患期間 30 年で 25% の患者が IBD 付随がんを発症するという報告もあり、発がん率として非常に高率である。さらに本邦では IBD 患者数が急増していること、内科的治療の発達により大腸を温存したまま長期罹患する患者が多いことから将来的に IBD 付随がん患者の急増が危惧されており、早急な発癌・抗癌機構の解明が望まれている。IBD 付随がんの問題点としては、進展様式が平坦型・易浸潤性のため早期発見が困難なこと、進行癌に対する化学療法が無効なことが多いため散発性大腸がんよりも予後が悪いことが挙げられる。その病型からも散発性大腸がんとは独立した病態が考えられることから、散発性大腸がんに対する研究・臨床の病態機構を応用することが出来ず、IBD 付随がんに特化した病態解明・治療薬開発が必要な状況である。この臨床問題の解決には炎症発癌細胞の形質理解が必要であるが、申請者らは IBD 付随がんでは粘液産生癌や印環細胞癌が有意に多く含まれることに着目し、炎症発癌の粘液産生機構と癌形質との関連について解析した。申請者の教室では腸管上皮細胞の粘液産生に必須な分化制御遺伝子である転写因子 Atoh1 の機能解析を行い、散発性大腸がんでは APC 変異による Wnt signal の破綻は GSK3 が標的を カテニンから Atoh1 にスイッチし、ユビキチン・プロテアソーム蛋白分解により積極的に粘液産生を抑制し上皮細胞機能不全を維持することを発見した (Gastroenterol. 2007)。申請者らは大腸癌における Atoh1 発現の影響を明らかとするため Atoh1 安定発現変異体を作成し散発性大腸癌由来細胞株に遺伝子導入したところ、Atoh1 蛋白発現に伴い粘液産生のみならず、Lgr5 発現上昇、腫瘍形成能、抗癌剤耐性、遊走能亢進など癌幹細胞形質、悪性形質を獲得することを見いだした (BBRC 2013)。また、Atoh1 発現細胞株を腫瘍形成させたところ、腫瘍の一部は印環細胞様に形質転換を認めたことから世界で初めて人工的な印環細胞癌作成に成功した。興味深いことに IBD 付随がんでは Atoh1 が発現していることを見出し、TNF を始めとした炎症性サイトカインが NFkB シグナル亢進により GSK3 を不活化することで Atoh1 蛋白分解が解除され、粘液産生形質と悪性形質を獲得することを見出した。つまり、持続炎症が IBD 付随がんの粘液産生形質獲得と密接に関連することを初めて明らかとした (Cancer Sci. 2015)。しかしながら、これまでの解析は全て大腸癌由来細胞を用いた解析であったため IBD 付随大腸がんの発がん機構解析は不可能であった。申請者の教室では大腸上皮の初代培養系の確立を試み、無血清培地とコラーゲンゲルによる 3 次元培養により幹細胞を含む上皮構成細胞全てを維持した大腸オルガノイドの半永久的な持続継代初代培養に成功した (Nat Med 2012)。そこで、申請者は炎症性サイトカイン添加を持続的に行うことで、慢性腸炎状態を模倣できると着想した。その結果、1 年以上の炎症刺激をマウス大腸オルガノイドに行うことにより、炎症シグナルが刺激時間依存性に蓄積すること、炎症刺激を除去しても上皮細胞の炎症応答が遷延することを見出した。さらに網羅的遺伝子発現解析により長期炎症応答による発現遺伝子を初めて明らかにするなど、長期炎症による大腸上皮細胞の形質転換を体外にて経時的に追跡可能なシステムの構築に成功した (J Crohns Colitis 2017)。以上より、これは IBD 患者の腸内環境を模倣した体外モデルであることが示唆された。また、一部のオルガノイドは Wnt シグナル非依存性の不死化形質を獲得したことから発がん過程までも模倣しているシステムであることが示唆された。

### 2. 研究の目的

本研究ではマウスで構築したモデルをさらに発展させ、IBD 患者由来のヒト細胞を用いた IBD 再現モデルを構築することにより、持続炎症による大腸上皮細胞の形質転換及び発がん機構を明らかにすることを目的とする。具体的には、1) ヒト IBD 患者由来大腸オルガノイドの持続炎症モデル構築、2) ヒト IBD 患者由来大腸オルガノイド遺伝子編集による発がん候補遺伝子機能解析を中心課題に据え、ヒト IBD 体外モデルを構築することにより IBD 病歴による発がん過程を解明することを目的とした。

### 3. 研究の方法

正常大腸及び IBD 患者由来大腸から大腸上皮オルガノイドを樹立する。それぞれ、炎症刺激を行い 1 年間刺激の後に形質変化を評価する。また遺伝子編集により、IBD 付随がん認められる P53 変異を CRIPR/Cas9 システムにて導入し、がん形質獲得を評価する。特に、Wnt シグナル非依存性不死化形質獲得を指標とし、がん化オルガノイドを樹立する。がん化オルガノイドをヌードマウスに接種し腫瘍化させ、がん悪性形質能を評価することで、IBD 付随がんの悪性形質獲得機構を明らかとする。さらに、長期炎症特異的、IBD 患者由来特異的遺伝子を同定し、発がん過程、悪性形質獲得に関する寄与度を評価することで、IBD 付随がん責任遺伝子を新規に同定する。最終的には責任遺伝子を欠損させ、細胞の炎症暴露による形質転換がリセット可能かを評価し、新規治療薬の標的として有用であるか確認する。以上より、長期炎症病態・IBD 付随がん発がん機構を明らかとし、新規治療薬の開発基盤を構築する。

#### (1) ヒト IBD 患者由来大腸オルガノイドの持続炎症モデル構築

##### 免疫応答における遺伝子発現解析

非 IBD 患者 (正常大腸) 及び IBD 患者大腸より上皮細胞を単離し、独自に開発した 3 次元初代培養法 (TMDU 法) にて大腸上皮オルガノイドを培養する。定常状態におけるサイトカイ

ン産生、酸化ストレス関連遺伝子の発現差異を PCR にて解析する。

オルガノイドでの TLR4,5, TNFR, IL-6R などの局在を確認した後、各菌体成分、サイトカインを培地に添加し、10 分後の遺伝子発現をマイクロアレイにて網羅的に解析する。刺激物質としては Flagellin, LPS, IL-6, TNF, IL-1 を候補とし、それぞれもしくは混合して添加する。さらに 8-60 週間持続添加後にオルガノイドを回収し、遺伝子発現をマイクロアレイにて比較検討する。マウスモデルと同様に炎症応答の蓄積及び長期刺激特異的な発現遺伝子を抽出する。また ELISA にて培養上清中の分泌サイトカインを定量化する。幹細胞を含めた上皮構成細胞の変化を発現形質の免疫染色にて解析し長期炎症蓄積との関連を解析する。正常大腸からの持続炎症が作動しない場合は、長期罹患している IBD 患者由来オルガノイドを長期暴露オルガノイドとして短期間の炎症応答解析を行う。

#### 酸化ストレス応答解析

ROS 蛍光プローブを添加した後に各刺激物質を投与し、Time lapse live imaging および共焦点蛍光顕微鏡により酸化ストレス応答細胞を同定する。また長期刺激オルガノイドと同様に蛍光プローブを添加し酸化ストレス応答細胞の同定を試みる。特に Lgr5 promoter-GFP を遺伝子導入することにより、ヒト上皮幹細胞を GFP にて可視化できるため、長期刺激による幹細胞の酸化ストレス状態を解析し、幹細胞-癌幹細胞移行の有無を観察する。

#### NFκB シグナル応答細胞解析

NFκB シグナルを反映する p65 の核内移行を免疫染色にて解析し、各炎症性サイトカインにて応答する細胞を同定する。また NFκB 結合配列に mCherry を結合させたレポーターを用い、レンチウイルスベクターにて大腸オルガノイドに導入する。短期および長期刺激による NFκB 応答を可視化し、応答細胞を同定する。

(2) ヒト IBD 患者由来大腸オルガノイド遺伝子編集による発がん候補遺伝子機能解析  
遺伝子編集には CRIPR/Cas9 システムを用いる。Lenti-CRISPR v2<sup>®</sup>はガイド塩基配列と CAS9 が 1 つのベクターに組み込んであり、レンチウイルス作成により容易・高効率に導入可能である。レンチウイルスのオルガノイド導入効率率は非常に高く、GFP 遺伝子の導入ではほぼ 100%のオルガノイドで蛍光を認めている。まずは、IBD 付随がんで P53 変異を認めることから、P53 変異オルガノイドを樹立する。

#### (3) ヒト IBD 患者由来大腸オルガノイドの発がん評価解析

##### Wnt シグナル非依存性不死化オルガノイドの樹立

前年度の実験により、正常大腸由来オルガノイド長期炎症刺激モデル、IBD 患者由来オルガノイド長期炎症刺激モデル、及び P53 変異オルガノイドが樹立されている予定である。がん形質の特徴である Wnt 非依存性不死化を確認するため、培養液から Wnt 3a, Rspodin1 を除去し、生存するか確認する。

##### がん形質評価

樹立した不死化オルガノイドをヌードマウスに接種し、腫瘍形成を確認する。さらに、病理組織にて粘液がんが含有するか評価するとともに、がん幹細胞分画、増殖能、浸潤能、抗がん剤耐性などの悪性形質獲得を評価する。

#### (4) ヒト IBD 患者由来大腸オルガノイドの発がんリセット探索

前年度までの解析から、IBD 患者特異的な発現遺伝子、長期炎症特異的な発現遺伝子をマイクロアレイにて抽出する。さらにがん化オルガノイドにおいても発現を維持している遺伝子を選択し、IBD 発がんに関与するかを検討する。具体的には長期炎症刺激オルガノイドに CRIPR/Cas9 システムにて候補遺伝子を欠損させることで、計画 1) の酸化ストレスなど長期炎症暴露形質及び IBD 患者由来特異的な形質がリセットされるかを確認する。さらに計画 3) の発がん形質が抑制されるかを評価する。長期炎症暴露形質及び発がん抑制、もしくはがんオルガノイドでのがん形質抑制を認めた遺伝子を IBD 付随がん責任遺伝子として同定する。

## 4. 研究成果

### (1) ヒト IBD 患者由来大腸オルガノイドの持続炎症モデル構築

#### 免疫応答における遺伝子発現解析

非 IBD 患者 (正常大腸) 及び IBD 患者大腸より上皮細胞を単離し、独自に開発した 3 次元初代培養法 (TMDU 法) にて大腸上皮オルガノイドを培養した。培地にはサイトカインは含まれていない。定常状態におけるサイトカイン産生、酸化ストレス関連遺伝子の発現差異を PCR にて解析した。

オルガノイドでの TLR4,5, TNFR, IL-6R などの局在を確認した後、各菌体成分、サイトカインを培地に添加し、10 分後の遺伝子発現をマイクロアレイにて網羅的に解析した。刺激物質としては Flagellin, LPS, TNF, IL-1 を混合して添加した。さらに 8-60 週間持続添加後にオルガノイドを回収し、遺伝子発現をマイクロアレイにて比較検討した。データベース上の潰瘍性大腸炎患者生検検体と健常者生検検体を網羅的な発現解析を利用し、潰瘍性大腸炎患者に高発現する遺伝子群を抽出した。これらの群と、オルガノイドを炎症刺激して発現上昇した遺伝子

群を GSEA にて比較したところ類似性があることを確認した。つまり、オルガノイド炎症刺激は潰瘍性大腸炎を模倣したモデルであることが示唆された。

#### 酸化ストレス応答解析

ROS 蛍光プローブを添加した後に各刺激物質を投与し、Time lapse live imaging および共焦点蛍光顕微鏡により酸化ストレス応答を確認した。また長期刺激オルガノイドに同様に蛍光プローブを添加し酸化ストレスが経時的に蓄積することを明らかとした。

#### NFκB シグナル応答細胞解析

大腸オルガノイドの Whole mount 免疫染色により、3次元による全オルガノイド細胞の蛋白局在解析を可能とした。NFκB シグナルを反映する p65 の核内移行を免疫染色にて解析し、各炎症性サイトカインでの応答を確認した。また長期刺激オルガノイドでは NFκB シグナルが経時的に蓄積することを明らかとした。

### (2) ヒト IBD 患者由来大腸オルガノイド遺伝子編集による発がん候補遺伝子機能解析

遺伝子編集には CRIPR/Cas9 システムを用いた。まずは、IBD 付随がんでは P53 変異を認めることから、P53 変異オルガノイドを樹立した。P53 ガイド塩基配列を含んだ CRIPR/Cas9 プラスミド構築及びレンチウイルスによる導入を行い、変異 P53 の蛋白発現を確認した。Nutlin 耐性、幹細胞分画、分化形質、増殖能などを解析し、P53 変異による上皮形質変化を評価した。

### (3) ヒト IBD 患者由来大腸オルガノイドの発がん評価解析

#### Wnt シグナル非依存性不死化オルガノイドの樹立

正常大腸由来オルガノイド長期炎症刺激モデル、IBD 患者由来オルガノイドモデル、及び P53 変異オルガノイドを樹立したことから、がん形質の特徴である Wnt 非依存性不死化を確認するため、培養液から Wnt 3a, Rspodin1 を除去し、生存するか確認した。マウス大腸由来オルガノイドでは長期炎症刺激に加えて GSK3 阻害剤の一時添加により、不死化オルガノイドの樹立に成功していたが、ヒトオルガノイドでは現時点において不死化オルガノイドは確認できていない。GSK3 阻害剤の一時添加や他のがん遺伝子の導入により、不死化モデルを構築中である。

#### がん形質評価

樹立したオルガノイドをヌードマウスに接種し、腫瘍形成を確認したが、腫瘍は形成しなかった。現在、マウス大腸粘膜に移植し、組織的な構造異型の有無を検討する予定である。

### (4) ヒト IBD 患者由来大腸オルガノイドの発がんリセット探索

IBD 患者特異的発現遺伝子、長期炎症特異的発現遺伝子をマイクロアレイにて抽出した。P53 変異オルガノイドにおいても発現を維持している遺伝子を選択し、IBD 発がんに関与するかを検討した。抽出した遺伝子の中には IBD 付随がんにおいても高発現していることを確認し、IBD 発がんに関与する遺伝子の同定に成功した。

## 5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計 3 件) 査読あり

1. Nishimura R, Shirasaki T, Tsuchiya K, Miyake Y, Watanabe Y, Hibiya S, Watanabe S, Nakamura T, Watanabe M. Establishment of a system to evaluate the therapeutic effect and the dynamics of an investigational drug on ulcerative colitis using human colonic organoids. *J Gastroenterol*. 2019 Jan 1. doi: 10.1007/s00535-018-01540-y. [Epub ahead of print] 査読あり
2. Hibiya S, Tsuchiya K, Hayashi R, Fukushima K, Horita N, Watanabe S, Shirasaki T, Nishimura R, Kimura N, Nishimura T, Gotoh N, Oshima S, Okamoto R, Nakamura T, Watanabe M. Long-term Inflammation Transforms Intestinal Epithelial Cells of Colonic Organoids. *J Crohns Colitis*. 2017 May 1;11(5):621-630. doi:10.1093/ecco-jcc/jjw186. 査読あり
3. Tsuchiya K, Hayashi R, Fukushima K, Hibiya S, Horita N, Negi M, Itoh E, Akashi T, Eishi Y, Motoya S, Takeuchi Y, Kunisaki R, Fukunaga K, Nakamura S, Yoshimura N, Takazoe M, Iizuka B, Suzuki Y, Nagahori M, Watanabe M. Caudal type homeobox 2 expression induced by leukocytapheresis might be associated with mucosal healing in ulcerative colitis. *J Gastroenterol Hepatol*. 2017 May;32(5):1032-1039. doi:10.1111/jgh.13645. 査読あり

〔学会発表〕(計 3 件)

1. Tsuchiya K, Watanabe S, Shirasaki T, Nishimura R, Katsukura N, Hibiya S, Okamoto R, Nakamura T, Watanabe M: TP53 mutation in human colonic organoids acquires resistance to in vitro long-term inflammation. ECCO2019, Copenhagen (Denmark), 2019.03.09.

2. Hibiya S, Tsuchiya K, Nishimura R, Shirasaki T, Watanabe S, Katsukura N, Okamoto R, Nakamura T, Watanabe M: Lesion-specific gene expression in the Epithelial cells of Crohn ' s disease by comparing Small intestinal organoids from active and inactive Lesion in the same patient. UEGW 2018, Vienna ( Austria ) , 2018.10.22.
3. Hibiya S, Tsuchiya K, Watanabe S, Nishimura R, Shirasaki T, Oshima S, Okamoto R, Nakamura T, Watanabe M: Human colonic organoid treated with inflammatory factors might mimic the pathophysiology of epithelial cells in ulcerative colitis. DDW 2018, Washington D.C ( USA ) , 2018.06.05.

〔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

## 6 . 研究組織

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。