

令和元年5月30日現在

機関番号：32612

研究種目：挑戦的研究(萌芽)

研究期間：2017～2018

課題番号：17K19612

研究課題名(和文)膵癌オルガノイドライブラリの構築による膵癌発癌機構の解明

研究課題名(英文) Establishment of pancreatic tumor organoid library reveals pathogenesis of pancreatic cancer

研究代表者

清野 隆史 (Seino, Takashi)

慶應義塾大学・医学部(信濃町)・助教

研究者番号：10649940

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 5,000,000円

研究成果の概要(和文)：ヒト臨床検体を用いて50例の膵癌オルガノイドによって構成される膵癌オルガノイドライブラリーの構築に成功した。遺伝学的情報ならびに表現型解析を比較検討した結果、膵癌はWntとRspodinという2つの細胞増殖因子を生存に必要とするかどうかで、3つのサブタイプに分類可能であることが示された。すなわちWnt分非分泌型膵癌、Wnt分泌型膵癌、Wnt/Rspo非依存型膵癌である。これらは段階的に悪性化していることが示唆され、表現型による膵癌の亜分類に成功した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

膵癌をWntとRspodinという2つ細胞増殖因子に対する要求性に基づいて、3つのサブタイプ、すなわちWnt分非分泌型膵癌、Wnt分泌型膵癌、Wnt/Rspo非依存型膵癌に分類可能であることを示した。Wnt分非分泌型膵癌はがん細胞周囲の線維芽細胞から供給されるWntを、Wnt分泌型膵癌は自己産生しているWntを化合物を用いて阻害することで増殖抑制が可能であることを示した。したがって、膵癌の治療標的の一つとしてWntシグナルが考えられ、臨床応用の可能性があることを明らかにした。

研究成果の概要(英文)：A library consisting of 50 human pancreatic tumor organoids was successfully established. Comparison between genetic information and phenotypic traits using the library revealed that pancreatic cancers were classified into three distinct subtypes based on Wnt or Rspodin dependence, namely Wnt non-secreting, Wnt secreting and Wnt/Rspodin independent type. This categorization suggested a gradual transition of pancreatic cancers to more malignant subtype along with the acquisition of Wnt Independence.

研究分野：膵癌の分子生物学

キーワード：膵癌 オルガノイド

1. 研究開始当初の背景

ヒト膵癌モデルとしては、主に膵癌細胞株や患者由来異種移植モデルが使用されてきたが、これらは臨床的に遭遇する患者の膵癌とは乖離がみられ、新たな膵癌モデルの確立が求められていた。

2. 研究の目的

研究協力者の佐藤俊朗らが開発に成功したオルガノイド培養技術(Sato T et al. Nature. 2009)は高率にヒト組織の体外培養を可能とすることから、この細胞培養技術を応用し、膵癌オルガノイドライブラリの構築によるヒト膵癌モデルの作製を目指す。

3. 研究の方法

膵癌患者から外科的切除、超音波内視鏡ガイド下穿刺吸引術、あるいは腹水穿刺により膵癌試料を採取し、既報のオルガノイド培養技術を最適化しながら膵癌オルガノイドを樹立することで、50例ほどの膵癌オルガノイドによるライブラリを構築する。樹立した膵癌オルガノイドからDNA、RNAを抽出し、全エクソンシーケンス、染色体コピー数、遺伝子発現マイクロアレイ、メチル化マイクロアレイを行うことで多階層的な遺伝情報を取得する。一方で、オルガノイド培養に必要な複数の細胞増殖因子、すなわちWnt、Rspo、EGF、Noggin、A83-01に対する依存性をすべてのオルガノイドで検討し、遺伝学的情報と比較する。また、細胞増殖因子に対する依存性の差が、膵癌の悪性度に与える影響ならびにその要因について、患者の臨床情報、既報の遺伝子発現サブタイプとの比較等によって考察する。

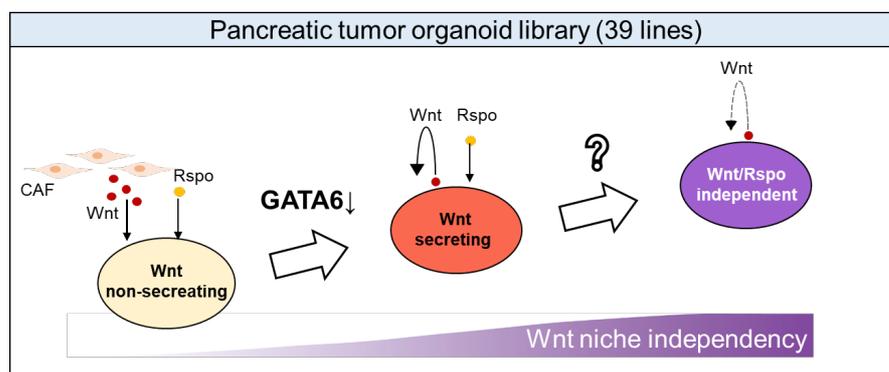
また、膵癌メカニズムの解明のため、遺伝子編集技術であるCRISPR/Cas9システムを利用し、正常膵管細胞由来オルガノイドに4つのドライバー遺伝子を導入することで人工膵癌オルガノイドを作製する。すなわち、変異KRAS遺伝子のノックイン、癌抑制遺伝子であるCDKN2A、TP53、SMAD4のノックアウトを順次加えることで、KCオルガノイド、KCTオルガノイド、KCTSオルガノイドを作製する。細胞増殖因子に対する依存性の変化、網羅的遺伝子発現解析、免疫不全マウスへの異種移植を行うとともに膵癌オルガノイドとの比較から、遺伝子変異による発癌の仕組みを理解する。

4. 研究成果

最終的には50例の膵癌オルガノイドによる大規模ライブラリの作製に成功したが、論文発表時は39例の膵癌オルガノイドに対して、遺伝学的かつ機能学的な解析を施行した。まず細胞増殖因子に対する要求性と遺伝子異常(全エクソンシーケンスによる遺伝子変異と染色体コピー数解析)の比較から、EGF、Noggin、A83-01に対する要求性、Nutlin-3に対する耐性に関しては対応関係が存在すると考えられた。すなわちKRAS変異によるEGF非依存性の獲得、SMAD4変異によるNoggin、TGFR2変異によるA83-01非依存性の獲得、およびTP53変異によるNutlin-3耐性の獲得である。ところが、Wnt、Rspoに関しては、そのシグナル経路上に存在するAPC、AXIN2、CTNNB1等の遺伝子異常とこれら2つの細胞増殖因子に対する依存性の間に対応関係はみられなかった。さらにWntとRspoに対する要求性の違いから膵癌は3つのタイプ、すなわち(1)WntとRspo両者が必要なタイプ、(2)Rspoのみが必要なタイプ、(3)WntもRspoも不要なタイプである。遺伝子発現マイクロアレイのデータから19種類のWntすべての発現値を膵癌オルガノイドライブラリと10例の正常膵臓オルガノイドで比較すると、先

の(2)(3)のタイプは Wnt 7B、Wnt 10A を含む数種類の Wnt の発現が上昇していた。これらに対して Wnt の活性化を阻害する小化合物を投与すると、(2)のタイプは細胞増殖が著しく抑制されたが、(3)のタイプには基本的に無効であった。したがって(2)のタイプは自己分泌性の Wnt によって細胞増殖を維持し、(3)のタイプは Wnt を分泌するものの、その増殖シグナルは自身の生存には必須でなくなっていると考えられた。一方、(1)のタイプの Wnt 供給源については、膵癌が高度な線維化を示すことから、癌関連線維芽細胞から分泌されている可能性が考えられた。そこで膵癌オルガノイド樹立時に培養した癌関連線維芽細胞と膵癌細胞による新たな共培養系を確立することで、in vitro で膵癌細胞は癌関連線維芽細胞から Wnt の供給を受けていることが示される同時に、患者臨床検体を用いた in situ hybridization によって癌関連線維芽細胞から Wnt 2B から分泌されていることが明らかとなった。以上から膵癌は Wnt と Rspodin に対する依存性に基づいて3つのサブタイプに分類可能であり、これらは Wnt 非分泌型膵癌、Wnt 分泌型膵癌、Wnt/Rspo 非依存型膵癌と名付けられた。網羅的遺伝子発現マイクロアレイ解析から3つのサブタイプは Wnt と Rspodin に対する依存性に差があるのみではなく、根本的な遺伝子発現プログラムに違いがあると考えられた。そして、その要因として膵管細胞の発生過程において重要な役割を担う GATA6 の発現が関与していることが予想された。実際、Wnt 非分泌型の膵癌オルガノイドで GATA6 の発現を抑制すると、Wnt 分泌型の膵癌オルガノイドへ変化し、反対に Wnt 分泌型の膵癌オルガノイドで GATA6 を過剰発現すると Wnt 非分泌型の膵癌オルガノイドへ変化した。最後に、正常膵管細胞由来オルガノイドに変異 KRAS 遺伝子のノックイン、癌抑制遺伝子である CDKN2A、TP53、SMAD4 のノックアウトを順次加えることで、KC オルガノイド、KCT オルガノイド、KCTS オルガノイドを作製することに成功した。KCTS オルガノイドは培養環境から Wnt を除去しても、徐々に Wnt を自己分泌するように変化し、癌微小環境に適応していくことが明らかとなった。

本研究は、多数例の膵癌オルガノイドの樹立によってヒト膵癌のモデル化に成功したのみでなく、Wnt と Rspodin に対する依存性という癌の表現型に基づいて悪性度を分類できたことは意義深い。なぜなら Wnt シグナルを標的とした治療へ応用できる可能性があるからである。今後は Rspodin 非依存性獲得の仕組みを明らかにし、あらゆるサブタイプの膵癌でも効果的な治療標的を発見することが望まれる。



5 . 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計 1件)

1 . 著者名 Seino Takashi, Kawasaki Shintaro, Shimokawa Mariko, Tamagawa Hiroki, Toshimitsu Kohta, Fujii, Masayuki, Ohta Yuki, Matano Mami, Nanki Kosaku, Kawasaki Kenta, Takahashi Sirirat, Sugimoto, Shinya, Iwasaki Eisuke, Takagi Junichi, Itoi Takao, Kitago Minoru, Kitagawa Yuko, Kanai, Takanori, Sato Toshiro

論文標題 Human Pancreatic Tumor Organoids Reveal Loss of Stem Cell Niche Factor Dependence during Disease Progression

雑誌名 Cell Stem Cell

巻22

発行年 2018

最初と最後の頁 454 ~ 467

掲載論文のDOI 10.1016/j.stem.2017.12.009

査読の有無 有

〔学会発表〕(計 1件)

1. 発表者名: 清野 隆史

発表標題: オルガノイドによる膵癌進行過程のモデリング

学会等名: 第104回日本消化器病学会総会 シンポジウム

発表年: 2018

〔図書〕(計 1件)

1. 著者名 佐藤 俊朗、武部 貴則、永樂 元次、清野 隆史、他

出版社 羊土社

書名 決定版オルガノイド実験スタンダード

2019年

総ページ数 261-271ページ

〔産業財産権〕

出願状況(計 0件)

取得状況(計 0件)

〔その他〕

なし

6. 研究組織

(1) 研究分担者

なし

(2) 研究協力者

研究協力者氏名: 佐藤 俊朗

ローマ字氏名: SATO, Toshiro

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。