

令和 3 年 6 月 21 日現在

機関番号：82606

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2018～2020

課題番号：18K07017

研究課題名(和文) 腸型・胃型胃癌オルガノイドを用いた新規癌幹細胞標的治療の探索

研究課題名(英文) Search for new therapeutic target against cancer stem cells using intestinal-/gastric type gastric cancer organoid

研究代表者

坂本 直也 (Naoya, Sakamoto)

国立研究開発法人国立がん研究センター・先端医療開発センター・ユニット長

研究者番号：20571798

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,300,000円

研究成果の概要(和文)：胃がんは免疫組織学的な粘液発現のパターンにより、腸型胃がん、胃型胃がんに大別される。両者は背景に存在する遺伝子・分子異常を含めたpathogenesisが大きく異なる。昨年度樹立した50例の胃癌オルガノイドを用いて、遺伝子・分子学的な情報を含めたライブラリーを構築した。加えて、代表的な薬剤に対する感受性も検討した。RNA sequencing解析による遺伝子発現プロファイルを行い、胃型、腸型粘液形質の双方で多剤耐性獲得に寄与する候補遺伝子を同定した。現在、胃癌症例における発現とin vitroの実験系を用いた分子生物学的な機能解析を進めている。また、特異的阻害剤のスクリーニングを行なっている。

研究成果の学術的意義や社会的意義

オルガノイドは幹細胞を豊富に含んでおり、胃癌オルガノイドは癌幹細胞を豊富に含んでいると考えられることから、今回同定した候補遺伝子は癌幹細胞を標的とした治療につながる可能性が考えられる。胃癌オルガノイドを用いた研究はこれまでになく、非常に新規性の高い研究であると考えられ、根治を目指した癌幹細胞を標的とした治療開発に加えて、胃型、腸型胃癌の病態形成のメカニズムなど、様々な新知見をもたらすものと期待される。

研究成果の概要(英文)：Gastric cancer (GC) is generally sub-classified into "intestinal type" that expresses MUC2 or CD10 and "gastric type" that expresses MUC5AC or MUC6 based on the immunohistochemical analysis. It is well known that both intestinal and gastric type cancers are underpinned by different genetic and molecular background.

We generated a GC organoid library that is composed of 50 GC cases, including the results of several IHC staining, MSI and mutation status. We also examined the drug sensitivity against representative anti-cancer drugs.

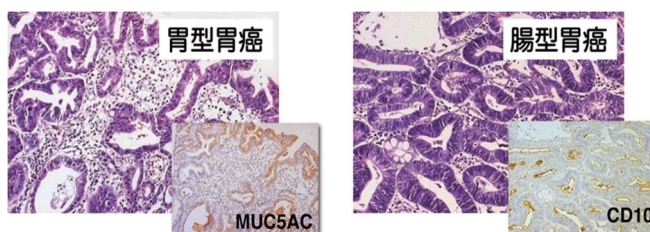
We then performed RNA sequence using GC organoids with intestinal and gastric types, and found out several candidate genes that are involved in the resistance against 5-FU and oxaliplatin. Currently, several studies that aim to reveal molecular machinery concerning attainment of drug resistance are ongoing. We are also conducting a screening of the specific inhibitors against above-mentioned candidates in collaboration with a pharmaceutical company.

研究分野：病理学

キーワード：胃癌 オルガノイド 幹細胞

1. 研究開始当初の背景

胃がんは免疫組織学的な粘液発現のパターンにより、MUC2 もしくは CD10 陽性の腸型胃がん、MUC5AC もしくは MUC6 陽性の胃型胃がんに大別される。腸型・胃型胃がんでは、背景に存在する遺伝子・分子異常を含めた pathogenesis が大きく異なることが知られている。胃がんの再発例や切除不能例に対する治療の中心は抗がん化学療法であるが、多くの症例では治療経過中に耐性を獲得し、最終的には癌患者を死に至らしめる。



	胃型胃癌	腸型胃癌
Phenotypic markers	HGM, M-GGMC-1 MUC5AC, MUC6	CD10, MUC2, villin
Transcription factor	SOX2	CDX1, CDX2
hMLH1 hypermethylation	Frequent	Infrequent
Microsatellite instability (MSI)	Frequent	Infrequent
p53 mutation	Infrequent	Frequent
TFF1 (pS2) expression	Preserved	Reduced
MMP-9 expression	High level	Low level

2009 年に、マウスの小腸からオルガノイドと呼ばれる生体内の組織に類した構造を in vitro で培養する技術が報告されて以来、胃がんも含め全身諸臓器由来の癌から樹立が報告されている。オルガノイドは細胞株を用いた解析と異なり、実際の組織構築を模倣できるという利点から、疾患研究に積極的に応用されている。

抗がん剤耐性の獲得の詳細なメカニズムは不明であるが、癌幹細胞の関与が報告されている。腸型・胃型胃がんでは癌幹細胞の性質が異なっている可能性があり、薬剤への反応にも差異が見られることが推測される。抗がん剤耐性の解析は、細胞株を用いた解析が中心であり、実際の癌組織内の多様性や症例間の相違等、抗がん化学療法の実態を反映していない。

2. 研究の目的

腸型・胃型胃がんの抗がん剤への感受性、抵抗性の差異を明らかにすることが、本研究の一番の命題である。これまでに腸型・胃型胃がんの様々な相違点が報告されているものの、治療に直結する差異は報告がない。免疫組織学的な特徴も含めた形態像と治療効果の相関を示唆する基盤データとなり、コンパニオン診断の確立に繋がるものと期待される。

3. 研究の方法

1) 腸型・胃型胃がんオルガノイドモデルの樹立

外科的切除材料から、胃がん組織及び非腫瘍部胃粘膜を採取する。胃がんオルガノイドの樹立に際しては、サンプルを二分し、胃もしくは小腸/結腸オルガノイド培養の medium (準備状況に詳細を記載) を用い、腸型・胃型胃がんを樹立する。各々のオルガノイドを各種染色標本により、腸型・胃型胃がんとしての特性を確認する。50 例を目標に胃がんオルガノイドの樹立を行う。

2) 胃がんオルガノイドの分子・遺伝子異常の検討

胃がんに特徴的な分子・遺伝子異常を中心に解析を行う。具体的には p53・MLH1・-catenin の免疫染色、MSI 解析、TP53・KRAS・RHOA・TGFB2・ARID1・ACVR2A の遺伝子変異は全例 PCR base のシーケンスによって検討する。

3) 既存の抗がん剤に対する胃がんオルガノイドの感受性・耐性のスクリーニング

50 症例の胃がんオルガノイドライブラリーを用いて、胃がんの化学療法に用いられる代表的な薬剤 (S-1、シスプラチン等) に対する薬剤感受性を検討する。加えて、トラスツズマブ等の分子標的薬に対する感受性も検討し、現在までに報告されている化学療法のデータと比較する。いずれの解析結果も、腸型・胃型胃がん症例間で比較を行う。

4) RNA シークエンスによる分子、遺伝子異常の解析

上記 3 のスクリーニングで抗がん剤の感受性が高い症例、耐性例を腸型・胃型胃がん各 3 例ずつ抽出し、RNA シークエンス解析を行う。高頻度に見られた異常に関しては、全例のオルガノイドを材料に qRT-PCR での validation を行い、腸型・胃型胃がん各々における特異性を確認する。

5) 同定した分子・遺伝子異常のマーカーとしての有用性、細胞生物学的機能の検討

上記の検討で同定した新規転写産物、発現変化が見られた分子に関しては、免疫染色等により、組織内での発現変化を確認する。また組織切片上での発現の有無と抗がん剤の治療効果を retrospective に検討する。加えて、分子の発現亢進、消失に関しては細胞株を用いた強制発現・ノックダウンの系を作成し、腫瘍の増殖・浸潤・転移等の癌の生物学的な特性への寄与に関する検討を行う。

6) 候補となる新規の分子・遺伝子異常に対する特異的阻害剤の創薬

上記の検討で同定した新規の異常もしくは遺伝子発現変化に対して、

低分子医薬: がん特異的に発現する蛋白全般

抗体医薬: 特にがん特異的に作用する細胞膜蛋白、増殖因子として働く分泌蛋白

がんペプチドワクチン: 腫瘍特異的な免疫反応の誘導が示唆される分子

の創薬の可能性を探索する。

7) 作製した新規分子標的薬の効果、有害事象の検討

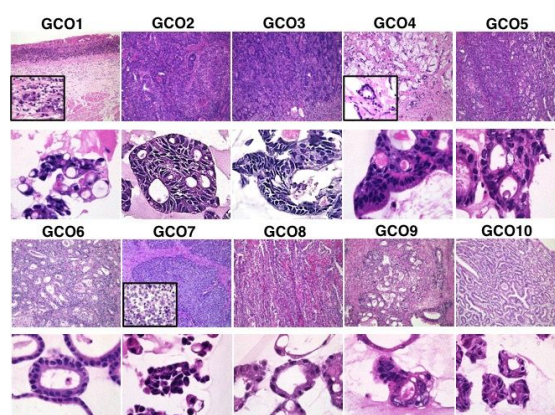
作製した新規分子標的薬の腫瘍抑制効果を、腸型・胃型胃がんオルガノイドを用いて検討する。非腫瘍部のオルガノイドでも検討し、有害事象の予測の指標とする。具体的には薬剤添加後のオルガノイドの大きさ、個数の変化を観察する。加えて、阻害剤投与後のサンプルをパラフィン包埋して、TUNEL 染色、Ki-67 免疫染色で細胞の viability を検討する。

胃がんオルガノイドを用いて、同所性移植、腹膜播種、遠隔転移 (肝、肺)xenograft モデルを作製し、薬剤の効果を検討することで、drug delivery や有害事象を確認する。

4. 研究成果

1) 腸型・胃型胃がんオルガノイドライブラリーの樹立

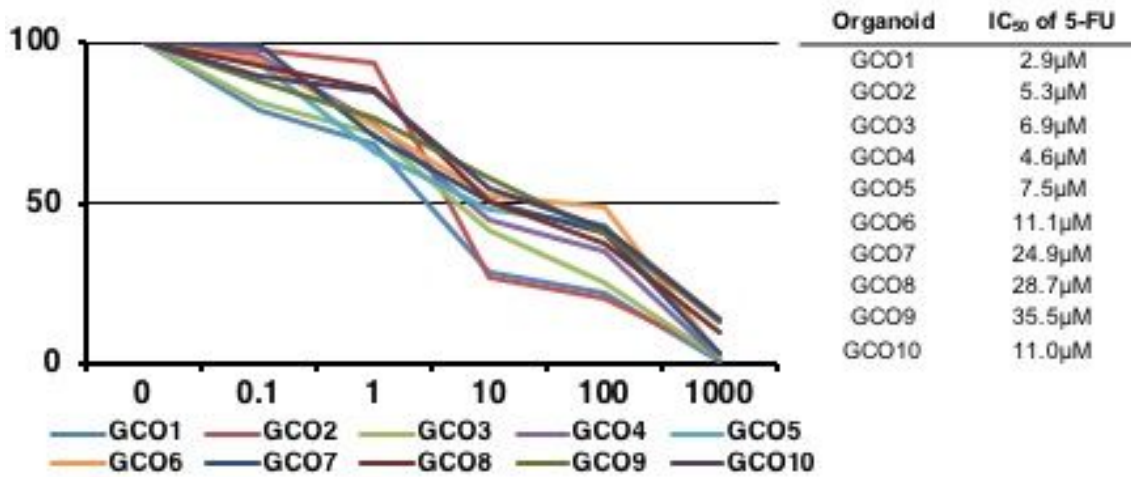
50 例の胃癌オルガノイド(胃型:17 例、腸型:15 例、胃腸混合型:18 例、分類不能型:3 例)を樹立した。p53、MLH1、 β -catenin の免疫染色や、MSI 解析、TP53、KRAS、RHOA、TGFB2、ARID1、ACVR2A の遺伝子変異解析を行い、樹立した 50 例の胃癌オルガノイド全ての情報を含めたライブラリーを構築した。



2) 既存の抗がん剤に対する胃がんオルガ

ノイドの感受性・耐性のスクリーニング

胃がんの化学療法に用いられる代表的な薬剤 (5-FU、オキサリプラチン) に対する薬剤感受性の検討も進めており、50例全例において5-FU、オキサリプラチンのIC₅₀値の測定を終えた。



3) RNA シークエンスによる分子、遺伝子異常の解析

オルガノイドサンプルを用いたRNA sequencing解析による遺伝子発現プロファイルを行い、胃型、腸型粘液形質の双方で5-FU、オキサリプラチン耐性に寄与する候補遺伝子を同定した。現在候補遺伝子に関して、胃癌症例における発現とin vitroの実験系を用いた分子生物学的な機能解析を進めている。加えて、製薬会社との共同研究の下で、特異的阻害剤のスクリーニングに着手し、現在検討中である。

同時に5-FUの耐性獲得に関しては、マイクロアレイ解析の結果から、KHDRBS3を同定し、CD44のsplicingを制御することで耐性獲得に寄与し、予後や5-FUを含めた抗がん剤の治療効果の予測マーカーになることを明らかにし、報告した。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計16件（うち査読付論文 16件／うち国際共著 3件／うちオープンアクセス 2件）

1. 著者名 Oue N, Sentani K, Sakamoto N, Uraoka N, Yasui W.	4. 巻 24
2. 論文標題 Molecular Carcinogenesis of Gastric Cancer: Lauren Classification, Mucin Phenotype Expression, and Cancer Stem Cells	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Int J Clin Oncol.	6. 最初と最後の頁 771-778
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1007/s10147-019-01443-9.	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -
1. 著者名 Naito Y, Yamamoto Y, Sakamoto N, Shimomura I, Kogure A, Kumazaki M, Yokoi A, Yashiro M, Kiyono T, Yanagihara K, Takahashi RU, Hirakawa K, Yasui W, Ochiya T.	4. 巻 38
2. 論文標題 Cancer Extracellular Vesicles Contribute to Stromal Heterogeneity by Inducing Chemokines in Cancer-Associated Fibroblasts	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Oncogene	6. 最初と最後の頁 5566-5579
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1038/s41388-019-0832-4	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -
1. 著者名 Shigematsu Y, Oue N, Sekino Y, Sakamoto N, Sentani K, Uraoka N, Hayashi T, Teishima J, Matsubara A, Yasui W.	4. 巻 86
2. 論文標題 SEC11A Expression Is Associated With Basal-Like Bladder Cancer and Predicts Patient Survival	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Pathobiology	6. 最初と最後の頁 208-216
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1159/000497206	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -
1. 著者名 Taniyama D, Taniyama K, Kuraoka K, Yamamoto H, Zaitzu J, Saito A, Sakamoto N, Sentani K, Oue N, Yasui W.	4. 巻 39
2. 論文標題 CD204-Positive Tumor-associated Macrophages Relate to Malignant Transformation of Colorectal Adenoma	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Anticancer Res.	6. 最初と最後の頁 2767-2775
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.21873/anticancerres.13403.	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Sekino Y, Sakamoto N, Sentani K, Oue N, Teishima J, Matsubara A, Yasui W.	4. 巻 97
2. 論文標題 miR-130b Promotes Sunitinib Resistance Through Regulation of PTEN in Renal Cell Carcinoma	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Oncology	6. 最初と最後の頁 164-172
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1159/000500605	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Saito Y, Hinoi T, Adachi T, Miguchi M, Niitsu H, Kochi M, Sada H, Sotomaru Y, Sakamoto N, Sentani K, Oue N, Yasui W, Tashiro H, Ohdan H.	4. 巻 14
2. 論文標題 Synbiotics Suppress Colitis-Induced Tumorigenesis in a Colon-Specific Cancer Mouse Model	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 PLoS One	6. 最初と最後の頁 e0216393
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1371/journal.pone.0216393	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Kofuji S, Hirayama A, Eberhardt AO, Kawaguchi R, Sakamoto N, Kitahara S, Wolfe K, Lange L, Onishi N, Uematsu M, Saya H, Soga T, Grummt I, Bierhoff H, Sasaki AT.	4. 巻 21
2. 論文標題 IMP dehydrogenase-2 Drives Aberrant Nucleolar Activity and Promotes Tumorigenesis in Glioblastoma	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Nat Cell Biol	6. 最初と最後の頁 1003-1014
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1038/s41556-019-0363-9	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 該当する

1. 著者名 Ishikawa A, Sakamoto N, Honma R, Taniyama D, Fukada K, Hattori T, Sentani K, Oue N, Yanagihara K, Tanabe K, Ohdan H, Yasui W.	4. 巻 43
2. 論文標題 Annexin A10 Is Involved in the Induction of Pancreatic Duodenal homeobox in Gastric Cancer Tissue, Cells and Organoids	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Oncol Rep	6. 最初と最後の頁 581-590
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3892/or.2019.7422	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Honma R, Sakamoto N, Ishikawa A, Taniyama D, Fukada K, Hattori T, Sentani K, Oue N, Tanabe K, Ohdan H, Yasui W.	4. 巻 38
2. 論文標題 Clinicopathological and Prognostic Significance of Epithelial Gremlin1 Expression in Gastric Cancer	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Anticancer Res	6. 最初と最後の頁 1419-1425
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) なし	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Pham QT, Oue N, Sekino Y, Yamamoto Y, Shigematsu Y, Sakamoto N, Sentani K, Uraoka N, Yasui W.	4. 巻 95
2. 論文標題 TDO2 Overexpression Is Associated with Cancer Stem Cells and Poor Prognosis in Esophageal Squamous Cell Carcinoma.	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Oncology	6. 最初と最後の頁 297-308
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1159/000490725	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 該当する

1. 著者名 Kobayashi G, Sentani K, Hattori T, Yamamoto Y, Imai T, Sakamoto N, Kuraoka K, Oue N, Sasaki N, Taniyama K, Yasui W.	4. 巻 84
2. 論文標題 Clinicopathological significance of claspin overexpression and its association with spheroid formation in gastric cancer.	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Hum Pathol	6. 最初と最後の頁 8-17
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.humpath.2018.09.001.	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Sekino Y, Sakamoto N, Goto K, Honma R, Shigematsu Y, Quoc TP, Sentani K, Oue N, Teishima J, Kawakami F, Karam JA, Sircar K, Matsubara A, Yasui W.	4. 巻 8
2. 論文標題 Uc.416+A promotes epithelial-to-mesenchymal transition through miR-153 in renal cell carcinoma.	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 BMC Cancer	6. 最初と最後の頁 952
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1186/s12885-018-4863-y.	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 該当する

1. 著者名 Hattori Y, Sentani K, Shinmei S, Oo HZ, Hattori T, Imai T, Sekino Y, Sakamoto N, Oue N, Niitsu H, Hinoi T, Ohdan H, Yasui W.	4. 巻 74
2. 論文標題 Clinicopathological significance of RCAN2 production in gastric carcinoma.	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Histopathology	6. 最初と最後の頁 430-442
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1111/his.13764	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Sekino Y, Oue N, Mukai S, Shigematsu Y, Goto K, Sakamoto N, Sentani K, Hayashi T, Teishima J, Matsubara A, Yasui W.	4. 巻 79
2. 論文標題 Protocadherin B9 promotes resistance to bicalutamide and is associated with the survival of prostate cancer patients.	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Prostate	6. 最初と最後の頁 234-242
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1002/pros.23728	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Sekino Y, Oue N, Koike Y, Shigematsu Y, Sakamoto N, Sentani K, Teishima J, Shiota M, Matsubara A, Yasui W.	4. 巻 8
2. 論文標題 KIFC1 Inhibitor CW069 Induces Apoptosis and Reverses Resistance to Docetaxel in Prostate Cancer.	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 J Clin Med.	6. 最初と最後の頁 E225
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3390/jcm8020225	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている(また、その予定である)	国際共著 -

1. 著者名 Sekino Y, Sakamoto N, Ishikawa A, Honma R, Shigematsu Y, Hayashi T, Sentani K, Oue N, Teishima J, Matsubara A, Yasui W.	4. 巻 41
2. 論文標題 Transcribed ultraconserved region Uc.63+ promotes resistance to cisplatin through regulation of androgen receptor signaling in bladder cancer.	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Oncol Rep	6. 最初と最後の頁 3111-3118
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) なし	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

〔学会発表〕 計1件（うち招待講演 1件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 坂本直也、本間りりの、鶴飼翔一、仙谷和弘、大上直秀、安井 弥
2. 発表標題 オルガノイドを用いた癌幹細胞特異的な遺伝子・分子異常の解析.
3. 学会等名 第108回日本病理学会総会、シンポジウム 5「オルガノイドとPDX」（招待講演）
4. 発表年 2019年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
---------------------------	-----------------------	----

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------