

令和 3 年 5 月 22 日現在

機関番号：17102

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2018～2020

課題番号：18K07202

研究課題名(和文) 胃印環細胞癌発癌モデルの構築及び新規治療ターゲットの同定

研究課題名(英文) Establishment of in vitro human gastric signet-ring carcinogenesis model.

研究代表者

有山 寛 (Ariyama, Hiroshi)

九州大学・大学病院・助教

研究者番号：80713437

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,400,000円

研究成果の概要(和文)：手術により切除した組織の一部から、胃組織幹細胞の培養に成功した。培養を続けると壁細胞以外の細胞への分化を認めた。CRISPR-Cas9 systemを用いてE-カドヘリンをノックアウトすると印環細胞の出現を認めた。この印環細胞は高い運動性を持ち、MMP3が運動性に関与することを確認した。オルガノイドでは核内にCXCR4の発現を認めたが、印環細胞では細胞膜へ移動することを確認した。AMD3100によりCXCR4-CXCL12シグナルをブロックすると印環細胞にアポトーシスが誘導された。ヒト印環細胞においてもMMP3およびCXCR4-CXCL12シグナルは治療ターゲットになりうると思われた。

研究成果の学術的意義や社会的意義

胃印環細胞がんは若年女性に多く、高い運動性に基づき早期に転移、特に腹膜播種をきたす予後不良な疾患である。今回我々は印環細胞がんをin vitroで作成することに成功し、その高い運動性にMMP3が関与することを確認した。またCXCR4からのシグナルをブロックすることにより印環細胞にアポトーシスが誘導されることを確認し、印環細胞の新たな治療ターゲットとして期待される薬物と考えられた。これらの結果は予後不良な胃印環細胞がんの新たな治療法開発に役立つものと考えられる。

研究成果の概要(英文)：We succeeded in culture of gastric stem cell from surgical specimen in vivo. Gastric stem cell differentiated into pit cells, mucous neck cells, chief cells and G cells, but not parietal cells. We detected signet-ring cells after knock out of E-cadherin by using CRISPR-Cas9 system in organoid cells. These cells showed higher mobility than normal organoid cells. MMP3 is associated with this cell mobility. We also detected CXCR4 in the nucleus in normal organoid cells, but CXCR4 was translocated from the nucleus to cellular membrane after E-cadherin knock out. Apoptosis was induced by AMD3100, which is the inhibitor of CXCR4-CXCL12 axis. MMP3 and CXCR4 could be therapeutic targets of signet-ring cell carcinoma.

研究分野：腫瘍内科学

キーワード：胃印環細胞がん E-cadherin CXCR4 MMP3

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

すでに **H.Clevers** のグループなどから胃オルガノイドの培養に成功したとの報告がなされているが、壁細胞への分化には成功していない。すでに我々のグループでもオルガノイド作製に成功し、**CRISPR-Cas9** システムを用いて **E-カドヘリン** をノックアウトすることにより印環細胞の出現を確認していた。

胃オルガノイド培養系を用いてヘリコバクターを感染させ、胃発癌モデルを構築する研究についてはこれまで提案がなされている。しかしながら印環細胞についての研究はなされておらず、印環細胞癌発癌モデルを構築したとの報告はない。そのため我々の印環細胞癌発癌モデルが最初の **in vitro** 発癌モデルとなる。マウスモデルにおいては **E-カドヘリン** に加えて **TP53** をノックアウトすることで浸潤癌の作製に成功しており、今回のモデルにおいても今後 **TP53** をさらにノックアウトし、免疫不全マウスモデルにおける造腫瘍性など悪性形質獲得の検討を行う。

2. 研究の目的

我々が開発した胃印環細胞癌発癌マウスモデルの解析結果から、ヒトにおいても胃印環細胞が胃組織幹細胞に由来し、ニッチを形成する自然リンパ球・血管内皮細胞あるいはマクロファージからの **WNT5a**、**CXCL12-CXCR4** シグナルが新規治療ターゲットになり得ると考えた。すでに我々はヒト胃組織幹細胞の培養系を確立し、**E-cadherin** をノックアウトすることで **in vitro** においてヒト印環細胞癌を作成することに成功している。この発癌モデルは、印環細胞癌の発癌・悪性形質獲得メカニズムの解析、印環細胞癌に対する新規治療ターゲットの同定ならびに薬剤感受性試験に非常に有用であり、より効率的な胃組織幹細胞の培養系の確立並びに印環細胞癌の悪性形質獲得メカニズムに基づいた新たな治療ターゲットの同定を目的に今回の研究を提案する。

3. 研究の方法

手術検体より非癌部の組織を一部採取し、物理的・酵素的に細胞を単離しマトリゲル上で培養しオルガノイドを作成した。オルガノイドにおける **LGR5** および **MIST1** の発現は **in situ hybridization** および免疫染色により確認した。また各種分化マーカーの発現を免疫染色により確認した。

これらのオルガノイドにおいて **CRISPR-Cas9** システムを用いて **E-カドヘリン** のノックアウトを行い、印環細胞を作成した。印環細胞の運動性は **KEYENCE** の **All-in-one fluorescence microscopy** を用いて、同社の **time-lapse tracking system** による解析を行った。

ヒト胃印環細胞癌発癌メカニズムの解析及び新規治療ターゲットの同定に関しては正常オルガノイド、**E-カドヘリン** ノックアウトオルガノイド(印環細胞)および **E-カドヘリン/TP53** ダブルノックアウトの **3** つを使用し、イルミナ社の次世代シーケンシングシステムにより **RNA-seq** 解析を行った。

また上記の **3** つのオルガノイド、**E-カドヘリン** ノックアウトオルガノイド、**E-カドヘリン/TP53** ノックアウトオルガノイドを **NOG** マウス皮下に投与し、造腫瘍性の確認を行った。

4 . 研究成果

切除検体から一部組織を採取し、オルガノイド培養に成功した。胃組織幹細胞のマーカールとして報告されている **LGR5**、**MIST1** を発現した細胞を確認し、壁細胞以外の **pit cell**, **mucous neck cell**, **chief cell**, **G cell** への分化を認め、長期間オルガノイドを培養することに成功している。特に **WNT** シグナルを **afarmin** により増強すると **LGR5** 陽性細胞の増加が確認された。一方で **WNT** を培養上清から除去することで **mRNA** レベルでは **ATP4b** を確認することが出来た。

オルガノイドを構成する細胞において、**CRISPR-Cas9 system** を用いて **E-カドヘリン** をノックアウトすることで印環細胞の出現を認め、その高い運動性を **BZ-X700** 顕微鏡システムを用いて確認した。またオルガノイドを構成する細胞においては核内に **CXCR4** の発現を認めたが、印環細胞では細胞膜上に移動することを確認した。**AMD3100** により **CXCR4-CXCL12** シグナルをブロックすることで印環細胞にアポトーシスが誘導され、ヒト印環細胞においても **CXCR4-CXCL12** シグナルは治療ターゲットになりうると考えられた。通常のオルガノイドおよび **E-カドヘリン** をノックアウトしたオルガノイドを用いて遺伝子発現の差を確認したところ、血管新生関連の遺伝子並びに細胞外マトリックス分解酵素 **MMP** 特に **MMP3** の発現が亢進しており、細胞の運動性亢進の一因と考えられた。またオルガノイド構成細胞において **E-カドヘリン** と **TP53** のダブルノックアウトを行い、**NOG** マウス皮下に移植したが、腫瘍形成は認められなかった。これらのダブルノックアウト細胞の遺伝子発現を解析したところ、細胞増殖・アポトーシス関連遺伝子の発現に変化は見られなかった。上記について現在論文投稿中である。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計1件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 山口享子
2. 発表標題 Loss of E-cadherin Expression is the Morphological Determinant of Human Gastric Signet Ring Cell Carcinoma
3. 学会等名 第77回日本癌学会学術総会
4. 発表年 2018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
---------	---------