

令和 4 年 6 月 1 日現在

機関番号：14301

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2019～2021

課題番号：19K08467

研究課題名(和文)大腸管状腺腫の遺伝子変異プロファイルおよび生物学的多様性についての研究

研究課題名(英文)Genetic profile and biological diversity of colorectal tubular adenoma

研究代表者

山田 敦(Yamada, Atsushi)

京都大学・医学研究科・特定准教授

研究者番号：20569610

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)：患者由来の大腸ポリープ(管状腺腫)を用いて、3次元培養であるオルガノイド培養に成功した。樹立したオルガノイドを単細胞に分離して培養したところ、3次元培養として増殖する能力の高い病変と低い病変とが存在することが明らかとなり、管状腺腫は単細胞からの増殖能の点で多様性を示すことが分かった。また単細胞から培養した管状腺腫細胞を再度単細胞に分離して培養した際にも増殖能の多様性を保持していたことから、大腸管状腺腫細胞の増殖能は遺伝子変異以外の機序により制御されている可能性が示唆された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

この研究により、大腸の主な前がん病変である管状腺腫の生物学的多様性を有することが明らかになり、遺伝子変異以外の機序が寄与していることが示唆された。管状腺腫が単細胞からの増殖能を獲得することが前がん病変からのがん化に關与する可能性も考えられ、本研究の成果が大腸発がんのメカニズムの解明につながることを期待される。また前がん病変の生物学的な特性を理解することが、将来的な発がん予防法の開発につながることを期待され、重要な意義を有する。

研究成果の概要(英文)：We utilized patient-derived tissue samples of colorectal tubular adenomas and performed organoid culture. We then separate colorectal adenoma-derived organoids into single cells and assessed their ability to grow as spheroids. As a result, single-cell spheroid forming and growth assay revealed the diversity of tubular adenomas in terms of proliferation capacity as spheroids when cultured single cells. In addition, because the diverse ability of tubular adenomas to grow as spheroids was retained after repeated single cell culture of single cell-derived spheroids, the spheroid proliferation capacity of colorectal tubular adenoma is suggested to be regulated by non-genetic mechanisms,

研究分野：腫瘍学

キーワード：大腸管状腺腫

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

大腸上皮細胞でがん抑制遺伝子である APC が機能喪失すると Wnt シグナル系が活性化し、管状腺腫 (Tubular adenoma) と呼ばれる前がん病変を形成する。さらに KRAS や TP53 など複数の遺伝子変異が蓄積すると、大腸がん (Carcinoma) に進展する。大腸がんの 80%以上はこの「Adenoma-Carcinoma Sequence」と呼ばれる多段階発がん過程を経て発生すると考えられており、管状腺腫は大腸がんのもっとも重要な前がん病変である。APC 遺伝子の生殖細胞系列での片アレル変異をもつ患者は、家族性大腸腺腫症 (Familial adenomatous polyposis, FAP) という遺伝性大腸がんを発症する。FAP 患者では、大腸上皮細胞において APC 遺伝子の 2nd hit を起こすことにより通常は 100 個以上の管状腺腫を形成し、高率に若年性の大腸がんを発生する。このように APC 遺伝子の異常は管状腺腫の発生に関与し、大腸発がんの初期段階において極めて重要な役割を担っている。

一方で、管状腺腫の一部では APC 以外の遺伝子が Wnt シグナル活性化に寄与することが分かってきた。リンチ症候群はミスマッチ修復遺伝子の生殖細胞系列変異が原因となる遺伝性大腸がんであり、体細胞性にミスマッチ修復遺伝子の 2nd hit を生じるとゲノムワイドに多数の遺伝子変異が蓄積して大腸がんや子宮体がんなどの悪性腫瘍を高頻度に発生する。リンチ症候群においても管状腺腫を経て大腸がんに進展すると考えられているが、そこでの Wnt シグナル系の活性化には RNF43 など APC 以外の遺伝子変異の関与することが多いとされる。またリンチ症候群に発生した管状腺腫は、多数の遺伝子変異の蓄積のため散発性の管状腺腫と比較して発育が速いと考えられている。

このように『APC 遺伝子の異常が端緒となって発生した管状腺腫』と『DNA 修復異常が端緒となって発生した管状腺腫』は病理組織学的には同じ管状腺腫と認識される病変でありながら、異なる分子変化や生物学的特性を示すことが示唆される。本研究では、大腸発がんにおける重要な前がん病変である管状腺腫の分子変化や生物学的特性の多様性に着目することにより、大腸発がんの早期段階においてがん化の進行に関与するメカニズムの解明を目指す。

2. 研究の目的

本研究の目的は、大腸管状腺腫における遺伝子変異プロファイルおよび生物学的特性の多様性を明らかにすることである。

3. 研究の方法

(1) 大腸腫瘍における遺伝子バリエーションの解析

・過去に手術・内視鏡的切除を行った大腸腫瘍 (がん・腺腫) のホルマリン固定パラフィン包埋 (FFPE) 組織から DNA を抽出する。

・大腸発がんに関与することが知られている既知の 25 遺伝子*を含む遺伝子パネルを作成し、次世代シーケンサー (Illumina MiniSeq システム) を使用して遺伝子解析を行う。

* 25 遺伝子: ACVR2, AMER1, APC, AXIN2, BRAF, CTNNA1, FBXW7, KRAS, MLH1, MSH2, MSH3, MSH6, MUTYH, NRAS, NTHL1, PIK3CA, PMS2, POLD1, POLE, RNF43, SMAD4, TCF7L2, TGFB2, TP53, and ZNRF3

(2) ヒト管状腺腫由来オルガノイド培養の確立

・下記を含む大腸腺腫患者のうち、内視鏡的切除術を予定している症例を前向きに登録する。

- 家族性大腸腺腫症
- Attenuated polyposis
- リンチ症候群
- 孤発性
- その他

・大腸内視鏡検査で通常白色光に加えて、Narrow-band imaging (NBI) やインジゴカルミン撒布による拡大観察を含めて管状腺腫と診断した病変を対象とする

・内視鏡的切除を行った組織の一部を実験部鏡観察下に採取して、Cancer Tissue-Originated Spheroid (CTOS) 法によるオルガノイド培養を行う。

(3) オルガノイド培養の病理学的評価

・樹立したオルガノイドの病理切片を作成して、Hematoxylin and eosin 染色や免疫染色を行い、オルガノイドと元の腫瘍組織との相同性を病理組織学的に検証する

(4) オルガノイド培養と元の管状腺腫組織における遺伝子解析

・オルガノイドおよび元の腫瘍組織の FFPE 組織から DNA を抽出する。

・次世代シーケンサーを用いて上記の 25 遺伝子からなる遺伝子パネル解析を行う。

・オルガノイドと元の管状腺腫組織において検出された遺伝子バリエーションが合致するか否かを検証する。

(5) ヒト由来オルガノイドを用いた管状腺腫の生物学的特性の検討

- ・増殖能：ATP assay などによりオルガノイドの増殖能を評価する
- ・ Single-cell-derived spheroid-forming and growth (SSFG) assay
：樹立したオルガノイドを単細胞に分離して培養し、14-21 日間にわたり追跡して spheroid 形成能と増殖を評価する

4. 研究成果

(1) 過去の大腸腫瘍の切除組織を用いた遺伝子変異解析の結果、リンチ症候群およびリンチ症候群が強く疑われる患者に発生した大腸がんでは、体細胞での APC 遺伝子バリエーションを認めない一方で RNF43 や ZNRF3 など APC 以外の Wnt シグナル系活性化に寄与する遺伝子バリエーション陽性の病変が認められた。このことから家族性大腸腺腫症における腺腫や散発性大腸腺腫の多くでは APC 遺伝子変異が端緒となって発生するのに対して、リンチ症候群における腺腫は異なる分子変化の特徴を示す可能性が示唆された。

(2) 患者由来の管状腺腫組織を使用して、家族性大腸腺腫症 8 例（うち生殖細胞系列での APC 遺伝子バリエーション陽性 6 例、APC 遺伝子バリエーション陰性あるいは未検査 2 例）、Attenuated polyposis（累計 20 病変以上の大腸腺腫を認めた症例）5 例、リンチ症候群 5 例、孤発性・その他 3 例の合計 21 症例に由来する 63 病変からのオルガノイド培養に成功した。

(3) オルガノイド培養を樹立した管状腺腫の一部について、オルガノイドから病理標本を作製して、組織学的に元の管状腺腫に類似した形態を保持していることを確認した。

(4) オルガノイド培養を樹立した管状腺腫の一部について、元の腫瘍の FFPE 検体とオルガノイドから DNA を抽出して次世代シーケンサーによる遺伝子パネル検査を行い、APC、KRAS、MSH2 遺伝子に病的バリエーションを同定した。SMAD4 および TP53 遺伝子の病的バリエーションは認めず、これらの遺伝子異常が大腸がんの比較的遅い段階で生じるイベントであるとの既存研究に合致する結果であった。

元腫瘍と樹立したオルガノイドのペアで遺伝子解析を行った病変では、いずれも同一の遺伝子バリエーションが同定され、管状腺腫における遺伝子変異がオルガノイドでも保持されていることが確認された。

(5) SSFG assay の結果、管状腺腫由来オルガノイドを構成する細胞の一部が単細胞からの spheroid 形成能を有することが分かった。また spheroid 増殖能を評価したところ、管状腺腫には大小の幅広いサイズの spheroid を形成する spheroid 増殖能の高い病変と、小さい spheroid のみを形成する spheroid 増殖能の低い病変とが存在することが明らかとなった。このことから、管状腺腫は spheroid 増殖能の点で生物学的な多様性を示すと考えられた。

(6) Spheroid 増殖能に関して、下記の特徴を確認した。

- ・同一病変由来のオルガノイドを用いて複数回 SSFG assay を施行したところ、spheroid 増殖能の結果は再現性を示した
- ・ Spheroid 形成能と spheroid 増殖能とは相関しない
- ・スフェロイド増殖能は、APC、KRAS、ミスマッチ修復遺伝子などの遺伝子バリエーションの有無と明らかな関連を認めない

(7) SSFG assay で高い増殖能を示した管状腺腫由来 spheroid を再度単細胞に遊離して培養したところ、大小の幅広いサイズの spheroid を形成する性質が保持されていた。単クローン由来の管状腺腫細胞から大小の幅広いサイズの spheroid が形成されたことから、spheroid 増殖能はエピジェネティクスや遺伝子発現の変化など、遺伝子変異以外の機序により制御されている可能性が示唆された。

一方で、小さい spheroid のみを形成する増殖能の低い spheroid を再度単細胞に遊離して培養したところ小さい spheroid のみが形成され、spheroid 増殖能の低い細胞から spheroid 増殖能の高い細胞への分化は生じにくいと考えられた。

(8) 正常大腸上皮および大腸がん由来のオルガノイドについても spheroid 増殖能を評価したところ、正常大腸上皮由来オルガノイドは spheroid 増殖能が低く、大腸がん由来のオルガノイドは spheroid 増殖能が高いことが示された。

管状腺腫由来のオルガノイドには spheroid 増殖能の高い病変、すなわちがんに類似した性質を示す病変と、spheroid 増殖能の低い正常上皮に類似した性質を示す病変とが含まれており、管状腺腫細胞が高い spheroid 増殖能を獲得することが、がん化過程における重要なイベントである可能性が考えられた。

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 Yamada A, Kawada K, Seno H, Ohashi S, Muto M.
2. 発表標題 Clinicopathological and molecular characterization of deficient mismatch repair colorectal cancer.
3. 学会等名 第80回 日本癌学会学術総会
4. 発表年 2021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
研究分担者	井上 正宏 (Inoue Masahiro) (10342990)	京都大学・医学研究科・特定教授 (14301)	
研究分担者	鎌田 真由美 (Kamada Mayumi) (70749077)	京都大学・医学研究科・准教授 (14301)	
研究分担者	近藤 純平 (Kondo Jumpei) (80624593)	京都大学・医学研究科・特定助教 (14301)	

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
---------	---------