

令和 3 年 6 月 8 日現在

機関番号：16101

研究種目：若手研究

研究期間：2019～2020

課題番号：19K17494

研究課題名(和文) Peutz-Jeghers syndromeにおける消化管ポリープ予防薬の開発

研究課題名(英文) Development of chemoprevention in patients with Peutz-Jeghers syndrome

研究代表者

田中 久美子(TANAKA, Kumiko)

徳島大学・病院・特任助教

研究者番号：80792382

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,200,000円

研究成果の概要(和文)：Peutz-Jeghers syndromeの患者に対して、小腸内視鏡検査を施行し、採取した小腸ポリープおよび正常粘膜組織からRNAを抽出して、ポリープに特異的な遺伝子発現Signatureを作成した。次にConnectivity Mapを用いて、ポリープに抑制的に働く薬剤を35種類選択した。また小腸ポリープ、正常粘膜組織からそれぞれオルガノイド細胞を樹立し、ポリープに有効な予防候補薬を3種類に絞り込んだ。今後はラットの十二指腸に小腸ポリープのオルガノイド細胞を移植し、3種類の薬剤を経口投与して腫瘍縮小効果を確認した後、ヒトを対象とした臨床試験に進む予定である。

研究成果の学術的意義や社会的意義

Peutz-Jeghers syndromeは、消化管ポリポシスと粘膜皮膚色素沈着を特徴とする遺伝性疾患であり、多発する消化管ポリープによりしばしば小児期より腸閉塞を来して開腹手術を繰り返すが、有効な治療法は無い。本患者の消化管ポリープ及び正常粘膜から採取した組織を用いて、現在国内で承認されている薬剤の中からポリープの縮小、癌化抑制に有効な予防薬を抽出し速やかに臨床試験に進むことで、早期に治療薬として用いることができ、手術の回避や癌化抑制につながると思われる。

研究成果の概要(英文)：We performed small intestinal endoscopy and took biopsies from the small intestinal polyp and normal mucosal tissue in the patient with Peutz-Jeghers syndrome. In addition, we extracted RNA from each tissue and determined gene expression signature in the polyp. We chose 35 kinds of preventive drugs based on connectivity map. We also established organoid cells from each tissue and chose the most effective 3 drugs for preventing polyps. Currently, we will administer the drugs to rat which transfused organoid cells of the small intestinal polyp into the duodenum. We are also planning a clinical trial for these drugs to evaluate inhibitory effect in human.

研究分野：消化器内科学

キーワード：Peutz-Jeghers syndrome オルガノイド 消化管ポリープ予防薬

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

Peutz-Jeghers syndrome(以下 PJS)は、消化管ポリポースと粘膜皮膚色素沈着を特徴とする常染色体優性遺伝性疾患であり、LKB-1 が原因遺伝子とされている。全消化管に過誤腫性ポリープを多発するが、特に小腸に多く発生するため小児期から腸閉塞を来し、しばしば腸閉塞を契機に診断される。腸閉塞をきたすと開腹手術が施行されることが多く、以後腸管癒着により小腸内視鏡が困難になる例が少なくない。また、開腹手術を繰り返し、短腸症候群による栄養障害をきたすなど様々な問題点が指摘されている。さらに、過誤腫性ポリープから一定の頻度で発癌することが報告されており、癌による手術例、死亡例があることも知られている。最近、小腸内視鏡によるポリープ摘除も行われているが、癒着による挿入困難例が少なくないこと、また生涯に渡り頻回に小腸内視鏡検査及び多数のポリープ切除を施行し続けることは極めて負担が大きく困難である。以上のことから、本症候群のポリープに対する有効な予防法の開発が求められている。

一方、Chemoprevention (化学予防)は発癌を防ぐ物質を積極的に摂取することにより癌を予防するという考え方であり、cost-benefit の観点から米国で提唱された概念である。欧米を中心にその基礎研究および臨床試験が精力的に進められ、大腸癌化学予防を目的とした臨床試験が数多く行われてきた。大腸腺腫(ポリープ)に対する cyclooxygenase-2 阻害剤、アスピリン、カルシウムなどの抑制効果が報告されている。しかし、これまで PJS の過誤腫性ポリープに有効な薬剤の報告は無い。

最近、Golub らは約 1300 種類の小分子化合物を種々の培養癌細胞に添加し、マイクロアレイ解析により得られた遺伝子発現プロファイルデータベース化して Connectivity Map を作成した。つまり、各薬剤を加えたときに positive 及び negative に変動した遺伝子を順番に並べた signature を作成した(図 1)。これらの遺伝子発現データを利用して、消化管ポリープと正常組織における signature を作成すれば、ポリープを抑制する作用を持つ薬剤を網羅的に検索することが可能である。一方、佐藤らは、大腸腫瘍または正常大腸粘膜より生検して得られた細胞に 6 種類の増殖因子を添加し、マトリゲルの中で培養すると腺管を形成するオルガノイドとして長期間培養しうることを報告した¹⁾。研究代表者は、この技術を応用して、既に複数例の PJS の小腸ポリープよりオルガノイドを樹立することに成功している(図 2)。このオルガノイドに Connectivity Map により抽出した候補薬剤を添加することにより、PJS のポリープに対する抑制効果を in vitro で検証することが可能であると考えた。

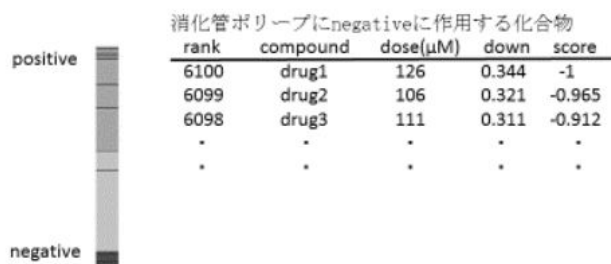


図1 Connectivity Map解析

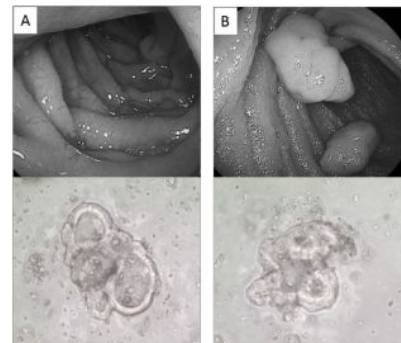


図2. Peutz-Jeghers syndromeの小腸ポリープ及び正常粘膜のオルガノイド培養
正常粘膜(A)、ポリープ(B)ともに腺管を形成して増殖。

2. 研究の目的

本研究では、PJS の消化管ポリープに対する有効な予防薬の開発を目的とし、まず PJS の小腸ポリープ(過誤腫)及び正常粘膜上皮より生検採取した組織を用いて遺伝子発現プロファイルを作成し、Connectivity Map 解析を行い、ポリープの予防薬となりうる候補薬剤を抽出する。次いで、小腸ポリープ(過誤腫)及び正常粘膜上皮より作成したオルガノイドを用いて、小腸ポリープに対する抑制効果を検証する。さらに、オルガノイドの同所移植モデルや LKB1 KO マウスを用いて、得られた薬剤の有効性を検証する。

3. 研究の方法

- (1). PJS 患者の小腸ポリープ及び正常粘膜から組織を採取し、マイクロアレイ解析を行う。
- (2). 小腸ポリープにおける遺伝子発現 Signature を作成し、予防薬の抽出を行う。
- (3). 小腸ポリープ、正常粘膜組織からオルガノイド培養を行い、抗腫瘍活性を検索する。

4. 研究成果

- (1). PJS 患者の小腸ポリープ及び正常粘膜から組織を採取し、マイクロアレイ解析を行った。
PJS の症例に対して、ダブルバルーン小腸内視鏡検査を施行し、小腸ポリープおよび正常粘膜

から生検を行った。その検体から RNA を抽出し、T7 oligodT primer, T7 RNA polymerase を用いて増幅するとともに、Cy3 による蛍光標識を行い、ヒト全ゲノム cDNA chip (Whole Human Genome 4x44K v2, Agilent) とハイブリダイゼーションを行った。さらに、解析ソフトウェア (Array-Pro Analyzer) によりスキャニング・データの解析を行った。

(2). 小腸ポリープにおける遺伝子発現 Signature を作成し、予防薬の抽出を行った。

得られた小腸ポリープにおける遺伝子発現と正常粘膜における遺伝子発現をサブトラクションし、ポリープにおける特異的な遺伝子発現 Signature を作成した。次に、Connectivity Map を用いて、小腸ポリープの遺伝子発現 Signature より、ポリープに抑制的に作用する薬剤を上位 100 種類選択した。このうち、本邦で承認されている薬剤のうち予防薬として用いることができる薬剤を 35 種類に絞り込んだ。

(3). 小腸ポリープ、正常粘膜組織からオルガノイド培養を行い、抗腫瘍活性を検索した。

まず、ダブルバルーン小腸内視鏡検査下に採取した小腸ポリープ及び正常粘膜の組織を cold PBS で洗浄後、EDTA 溶液及び collagenase を含む Digestion buffer で処理し、オルガノイド基礎培養液である AdDF 培養液 (Advanced DMEM/F12, Penicillin/Streptomycin, GlutaMAX, 1M HEPES) に懸濁後、遠心した。上清を除去し、氷上にて細胞沈殿物を 100 μ l の細胞外基質ゲル (マトリゲル®) に懸濁し、48 ウェルプレートに 25 μ l ずつドーム状にスポットした。プレートを 37 $^{\circ}$ C に 10 分間静置することにより、細胞外基質ゲルを固化させ、その後、各種増殖因子を含む AdDF 基礎培養液 (Gastrin, B27, NAC, EGF, Noggin, R-spondin, Wnt conditioned medium, A83-01, SB202190, Y27632) を添加して 37 $^{\circ}$ C 5%CO₂ 下で培養した (図 3)。樹立した小腸ポリープ及び正常粘膜由来のオルガノイドを用いて、35 種類の予防候補薬のスクリーニングを行った。各候補薬剤を種々の濃度でオルガノイド培地に添加し、48~72 時間後に感受性試験 (WST-8 assay) を行い Cell viability を測定し、IC₅₀ を算出した。その結果、ポリープにのみ高い細胞障害性を示す薬剤を最終的に 3 種類選択した。

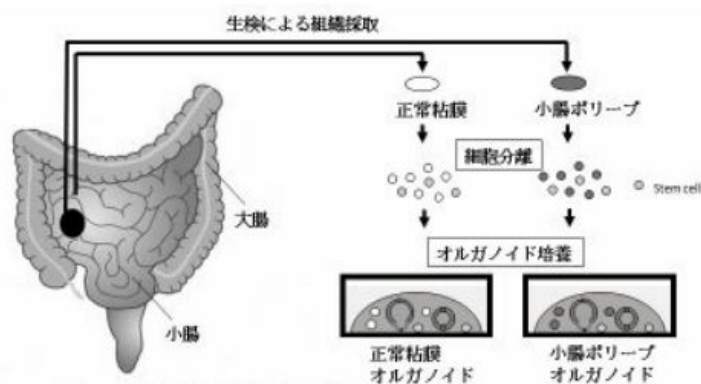


図3 オルガノイド作成方法

今後は実際にヌードラットの十二指腸に小腸ポリープのオルガノイド培養細胞を移植し、3 種類の予防候補薬を経口投与して腫瘍縮小効果を確認する。また、LKB1 ノックアウトマウスに予防候補薬を経口投与し、その予防効果を検討する。さらに、残存ポリープについて、Ki67 や PCNA などの免疫染色、TUNEL 染色などを行い、ポリープ抑制効果の機序を調べる予定である。

(参考文献)

1) Sato T, Vries RG, Snippert HJ et al. Single Lgr5 stem cells build crypt-villus structures in vitro without a mesenchymal niche. Nature 2009;459(7244):262-265

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計0件

〔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
---------	---------