

令和 3 年 6 月 15 日現在

機関番号：72602

研究種目：挑戦的研究(萌芽)

研究期間：2019～2020

課題番号：19K22570

研究課題名(和文)大腸がんの進展に伴う細胞多様性の変化

研究課題名(英文)cellular heterogeneity of colorectal cancer

研究代表者

八尾 良司(YAO, Ryoji)

公益財団法人がん研究会・がん研究所 細胞生物部・部長

研究者番号：80291095

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)：大腸がんは転移・再発を生じることにより治療が著しく困難になるが、その分子機構や病巣間の違いは十分に明らかにされていない。本研究では、転移・再発に伴う細胞多様性の変化を明らかにするために、同一患者に生じた原発巣、転移巣、再発巣から患者由来オルガノイドを樹立した。1細胞発現解析の結果、転移に伴い、幹細胞様および分化細胞様の細胞集団が減少していることが明らかになった。さらに、OLFM4が大腸がん幹細胞マーカーとして同定され、原発巣ではOLFM4陽性細胞がオルガノイドの再構成に必須であるのに対し、転移巣では不要であった。以上の結果から、転移に伴う細胞多様性の変化と生物学的意義が明らかにされた。

研究成果の学術的意義や社会的意義
がん組織を構成する細胞多様性は、転移・再発過程に関連する重要な要因であるとともに、化学療法に対する抵抗性の原因であることが知られている。本研究では、独自に同一患者の原発巣、転移巣、再発巣からオルガノイドを樹立し、解析を行った。1細胞解析で幹細胞マーカーとして同定されたOLFM4は、マウス小腸組織の幹細胞マーカーであるLgr5のサロゲートとして報告がある。さらに転移に伴い、細胞多様性が変化し、OLFM4陽性細胞の生物学的機能にも差があることが示された。進行大腸がんは病巣間の不均一性が存在することは、今後の大腸がん患者の層別化や多剤療法の開発などへの貢献が期待される。

研究成果の概要(英文)：Metastasis is the major cause of cancer-related death, but whether metastatic lesions exhibit the same cellular composition as primary tumors has yet to be elucidated. To investigate the cellular heterogeneity of metastatic colorectal cancer (CRC), we established patient-derived organoids (PDOs) from primary, metastasis and recurrent lesions developed in the same patient. scRNA-seq analysis revealed decreased gene expression of markers for differentiated cells in PDOs derived from metastatic lesions. Paradoxically, expression of potential intestinal stem cell markers was also decreased. We identified OLFM4 as cancer stem cell marker, and found OLFM4+ cells to be capable of initiating organoid culture growth and differentiation capacity in primary PDOs. These cells were required for the efficient growth of primary PDOs but dispensable for metastatic PDOs. These observations demonstrate that metastatic lesions have a cellular composition distinct from that of primary tumors.

研究分野：細胞生物学

キーワード：患者由来オルガノイド 大腸がん 転移・再発 がん幹細胞

様式 C-19、F-19-1、Z-19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

大腸がんは、国内の部位別がん死亡数が第2位であり、2017年度は、年間5万3千人の死亡が予測されている(がんの統計'17(がん研究振興財団))。10年生存率は、StageIIIで74.3%であるのに対し、転移を伴うStageIVでは、8.3%まで低下する。このような外科的な切除術による完治を目指すことが困難な大腸がんでは、全身性の化学療法の対象となる。しかし、一時的に腫瘍退縮が認められても、必ず治療抵抗性となり病巣は増大する。この原因の一つにがん組織の細胞多様性が挙げられる。

申請者はがん研究会・がん研有明病院大腸外科との密接な連携を行い、様々な病態を示す大腸がん患者由来オルガノイド(Patient-derived organoids, PDOs)を樹立している。これらのなかには同一患者由来の原発巣・転移巣・再発巣のセットが含まれている。PDOsは、オリジナル組織の細胞多様性を再現することが知られていることから、これらの1細胞解析により、各病巣の類似性と相違点を明らかにすることができると考えられた。さらに*in vitro*の解析結果を臨床検体で検証し、生体内組織での再現性を確認することができれば、患者層別化や多剤療法の開発などへの貢献が期待された。

2. 研究の目的

本研究課題では、大腸がん手術検体から樹立されたPDOsの1細胞解析を行い、(1)がん進展に伴う細胞多様性の変化を明らかにし、(2)生物学的な実証実験により細胞階層性・可塑性を明らかにする。さらに(3)臨床検体の組織・病理学的解析を行い、*in vitro*の解析結果について、ヒト病理検体を用いて検証する。

細胞多様性は、転移や化学療法抵抗性などで中心的な生命現象であるにも関わらず、その理解は十分とは言えない。本研究課題では、がん組織の細胞多様性について明らかにし、生物学的な実証と臨床病理学的な検証により、治療標的分子の探索や患者層別化など、新たな治療法開発を推進するための学術基盤を構築することを目的とする。

3. 研究の方法

がん進展に伴う細胞多様性の変化を明らかにするために、同一患者の原発巣、転移巣、再発巣から樹立されたPDOsセットを解析対象とし、以下の3つの研究方法により解析を行う(図1)。

(1) 1細胞解析 (scRNA-seq)

同一患者に発生した原発巣、転移巣、再発巣に由来するPDOsセットの1細胞解析を行い、それぞれの組織を構成する細胞集団クラスターを明らかにするとともに、がん幹細胞マーカーを同定する。

(2) ゲノム編集

ゲノム編集によりがん幹細胞の可視化と選択的除去実験を行うマーカー遺伝子にIRES-蛍光タンパク質遺伝子-P2A-inducible Caspase9 (iCas9)カセットを挿入する。ソーティングによりがん幹細胞を単離し、オルガノイドの再構成実験を行うとともに、がん幹細胞除去によるオルガノイドの変化を観察する。これら一連の解析をもとに、がん幹細胞の実証実験と、がん進展に伴う細胞多様性の変化を明らかにする。

(3) 組織学的解析

PDOsが由来するオリジナル検体の病理学的解析により、PDOsの1細胞解析結果の生体組織における妥当性を検証する。PDOs樹立時に作製・保存されたパラフィン包埋検体や凍結組織等を用いて、免疫染色や*in situ* hybridizationを行う。

4. 研究成果

(1) PDOsの細胞多様性の解明と転移・再発に伴う変化

同一患者の原発巣、転移巣、再発巣から樹立されたPDOsのscRNA-seq(10x Chromium)解析を行った。それぞれ独立にデータを取得し、統合的に解析を行い、5つのクラスターを同定した(図2)。これらのクラスターは、幹細胞様クラスター、二つのTA細胞様クラスター、二つの分化細胞様クラスターにアノテーションされる。すなわち、IV期進行大腸がんにおいても、正消化管組織に見られる幹細胞/TA細胞/分

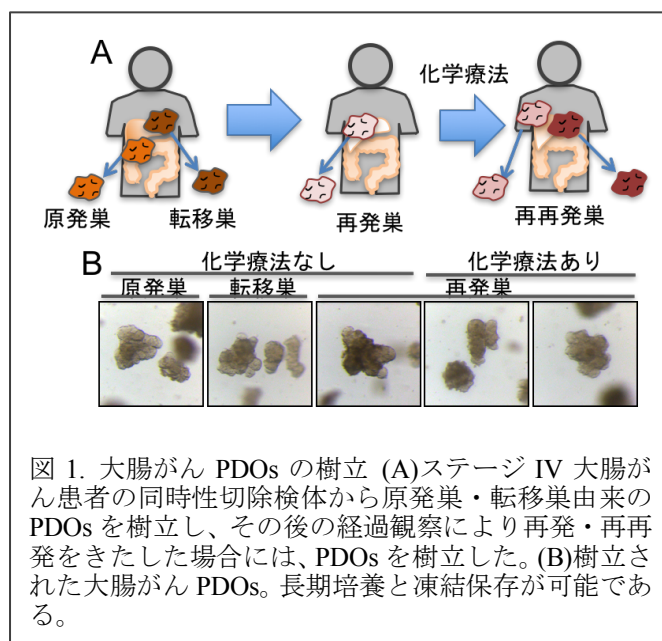


図1. 大腸がん PDOs の樹立 (A)ステージ IV 大腸がん患者の同時性切除検体から原発巣・転移巣由来の PDOs を樹立し、その後の経過観察により再発・再再発をきたした場合には、PDOs を樹立した。(B)樹立された大腸がん PDOs。長期培養と凍結保存が可能である。

化細胞という細胞系譜が反映されていた。クラスター間の DEG 解析では、OLFM4 が幹細胞クラスターに最も相関が高い遺伝子として同定された。OLFM4 は、マウス消化管組織における Lgr5 のヒト大腸組織のサロゲート遺伝子として同定されており、オルガノイドの unbiased 解析により同定されたことは、PDOs の研究リソースとしての妥当性が示唆された。興味深いことに、がんの進行に伴い、幹細胞様クラスターと分化細胞様クラスターが減少し、TA 細胞様クラスターが増加していることが明らかになった(図 2)。これらの結果は、がんの進展に伴い、がん組織を構成する細胞集団の多様性が減少し、増殖能が高い細胞集団が増えていることを示唆する。

(2) がん幹細胞の可視化と機能的評価

3 名の IV 期大腸がん患者からの原発巣と転移巣から樹立された 5 個の PDOs を対象に、1 細胞発現解析においてがん幹細胞マーカーとして同定された OLFM4 遺伝子の 3'UTR 領域に、IRES-EGFP-P2A-iCas9 カセットを導入した。FACS を用いて原発巣由来 PDOs を構成する細胞をソートし、シングルセル からオルガノイドを再構成したところ、GFP 陽性細胞は、陰性細胞の約 6 倍の効率でオルガノイドを生じた。GFP 陽性細胞からのオルガノイド構成過程では、播種後 3 日までに GFP 陽性細胞が増加し、その後、陰性細胞が生じた。一方、GFP 陰性細胞から生じるオルガノイドは、BB ホモダイマー処理によりオルガノイドの再構成が阻害された。これらの結果から、原発巣由来 PDOs では、OLFM4 陽性細胞は、自己複製能と分化能を有すること、OLFM4 陰性細胞からのオルガノイド再構成の過程では、OLFM4 陽性細胞への逆戻りが生じることが明らかになった。興味深いことに、転移・再発巣由来 PDOs では、GFP 陽性細胞は確認されず、また BB ホモダイマーにコロニー数の減少は観察されなかった。

(3) 臨床検体における実証

4 名の IV 期大腸がん患者の原発巣、転移巣、再発巣から樹立された計 12 個の PDOs の病理標本を作製し、OLFM4 の免疫染色を行った。その結果、原発巣は、転移もしくは再発巣に比べて OLFM4 発現が高いことが明らかになった。さらにそれぞれが由来する大腸がん組織の免疫染色でも、原発巣の発現が高いことが示された。興味深いことに、OLFM4 陽性細胞は、がん組織内で均一には存在せず、クラスターを作っていた。これまでも同一患者由来の原発巣と転移巣の

トランスクリプトーム解析が行われてきたが、OLFM4 遺伝子の発現に関する報告はない。がん組織の発現解析では、間質細胞の混入、組織の壊死、などがノイズとなりがん細胞多様性の変化を正確に検出できなかったことに加え、組織内での OLFM4 陽性細胞の局在があることが原因であると考えられた。これらの結果から、OLFM4 陽性細胞が生体組織においてもがん幹細胞として機能し、また、転移に伴い細胞多様性が変化すると考えられた。さらに、PDOs が組織レベルのがん研究における有用なリソースであることが明らかになった。

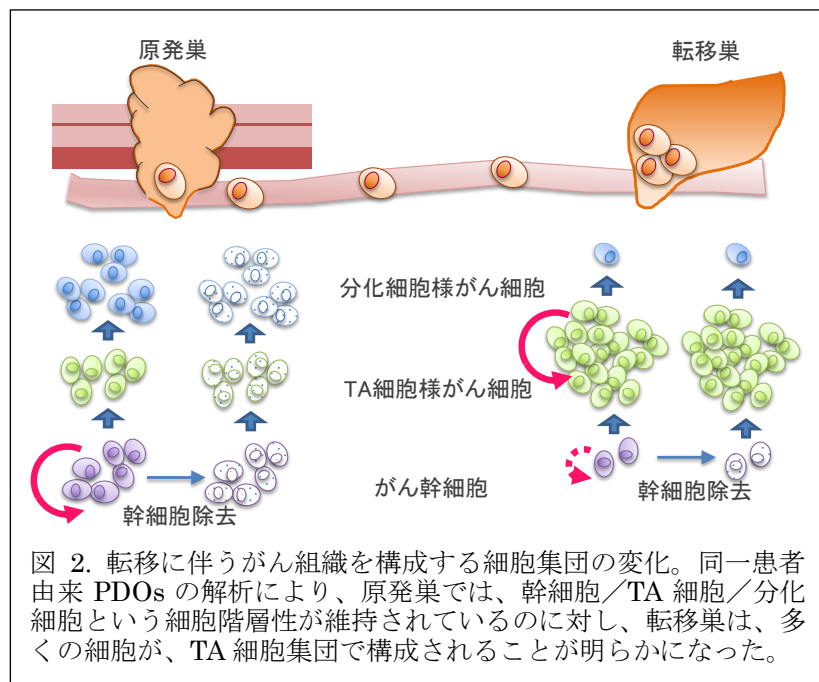


図 2. 転移に伴うがん組織を構成する細胞集団の変化。同一患者由来 PDOs の解析により、原発巣では、幹細胞/TA 細胞/分化細胞という細胞階層性が維持されているのに対し、転移巣は、多くの細胞が、TA 細胞集団で構成されることが明らかになった。

【引用文献】

- (1) Sakahara, M., Okamoto, T., Oyanagi, J., Takano, H., Natsume, Y., Yamanaka, H., Kusama, D., Fusejima, M., Tanaka, N., Mori, S., *et al.* (2019). IFN/STAT signaling controls tumorigenesis and the drug response in colorectal cancer. *Cancer Sci* 110, 1293-1305.
- (2) Osumi, H., Muroi, A., Sakahara, M., Kawachi, H., Okamoto, T., Natsume, Y., Yamanaka, H., Takano, H., Kusama, D., Shinozaki, E., *et al.* (2020). Evaluation of the RAS signaling network in response to MEK inhibition using organoids derived from a familial adenomatous polyposis patient. *Scientific reports* 10, 17455.
- (3) Okamoto, T., duVerle, D., Yaginuma, K., Natsume, Y., Yamanaka, H., Kusama, D., Fukuda, M., Yamamoto, M., Perraudeau, F., Srivastava, U., *et al.* (2021). Comparative Analysis of Patient-Matched PDOs Revealed a Reduction in OLFM4-Associated Clusters in Metastatic Lesions in Colorectal Cancer. *Stem cell reports* 16, 1-14.

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計4件（うち査読付論文 4件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 4件）

1. 著者名 Sakahara Mizuho, Okamoto Takuya, Oyanagi Jun, Takano Hiroshi, Natsume Yasuko, Yamanaka Hitomi, Kusama Daisuke, Fusejima Mishio, Tanaka Norio, Mori Seiich, Kawachi Hiroshi, Ueno Masashi, Sakai Yoshiharu, Noda Tetsuo, Nagayama Satoshi, Yao Ryoji	4. 巻 110
2. 論文標題 IFN/STAT signaling controls tumorigenesis and the drug response in colorectal cancer	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Cancer Science	6. 最初と最後の頁 1293 ~ 1305
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1111/cas.13964	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 Weng Jane S., Nakamura Takanori, Moriizumi Hisashi, Takano Hiroshi, Yao Ryoji, Takekawa Mutsuhiro	4. 巻 2
2. 論文標題 MCRIP1 promotes the expression of lung-surfactant proteins in mice by disrupting CtBP-mediated epigenetic gene silencing	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Communications Biology	6. 最初と最後の頁 227
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1038/s42003-019-0478-3	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 Ito Chizuru, Akutsu Hidenori, Yao Ryoji, Yoshida Keiichi, Yamatoya Kenji, Mutoh Tohru, Makino Tsukasa, Aoyama Kazuhiro, Ishikawa Hiroaki, Kunimoto Koshi, Tsukita Sachiko, Noda Tetsuo, Kikkawa Masahide, Toshimori Kiyotaka	4. 巻 9
2. 論文標題 Odf2 haploinsufficiency causes a new type of decapitated and decaudated spermatozoa, Odf2-DDS, in mice	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Scientific Reports	6. 最初と最後の頁 14249
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1038/s41598-019-50516-2	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 Okamoto Takuya, duVerle David, Yaginuma Katsuyuki, Natsume Yasuko, Yamanaka Hitomi, Kusama Daisuke, Fukuda Mayuko, Yamamoto Mayuko, Perraudeau Fanny, Srivastava Upasna, Kashima Yukie, Suzuki Ayako, Kuze Yuuta, Takahashi Yu, Ueno Masashi, Sakai Yoshiharu, Noda Tetsuo, Tsuda Koji, Suzuki Yutaka, Nagayama Satoshi, Yao Ryoji	4. 巻 16
2. 論文標題 Comparative Analysis of Patient-Matched PDOs Revealed a Reduction in OLFM4-Associated Clusters in Metastatic Lesions in Colorectal Cancer	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Stem Cell Reports	6. 最初と最後の頁 954 ~ 967
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.stemcr.2021.02.012	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 -

〔学会発表〕 計12件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 1件）

1. 発表者名 八尾 良司
2. 発表標題 Comparative analysis of patient-derived organoids from primary colorectal cancer and matched metastatic and recurrent lesions.
3. 学会等名 Cell Symposium: Engineering Organoids and Organs (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 八尾 良司
2. 発表標題 Patient derived organoid bank as a platform to investigate colorectal cancer.
3. 学会等名 基盤医学持論・特徴あるプログラム「Cancer Science Course」
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 八尾 良司、長山 聡、鈴木 穰
2. 発表標題 進行大腸がんオルガノイドの1細胞解析
3. 学会等名 第78回日本癌学会学術総会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 岡本 拓也、柳沼 克幸、長山 聡、八尾 良司
2. 発表標題 大腸がん同所移植モデルマウスを用いた転移の再現
3. 学会等名 第78回日本癌学会学術総会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 長山 聡、岡本 拓也、八尾 良司
2. 発表標題 大腸癌発生と薬剤感受性におけるIFN/STATシグナル伝達系の関与
3. 学会等名 第78回日本癌学会学術総会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 八尾 良司
2. 発表標題 Computational modeling of ERK signaling in patient-derived organoids established from colorectal cancer.
3. 学会等名 数理腫瘍学 国際研究ネットワークの構築 テーマ「生命科学と数理科学の融合」
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 八尾 良司
2. 発表標題 がん患者由来オルガノイドを用いた研究
3. 学会等名 第79回日本癌学会学術総会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 柳沼 克幸、岡本 拓也、長山 聡、八尾 良司
2. 発表標題 ヒト大腸がんオルガノイド同所移植マウスモデルにおける転移腫瘍の発生とEMTマーカーの発現
3. 学会等名 第79回日本癌学会学術総会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 岡本 拓也、柳沼 克幸、長山 聡、八尾 良司
2. 発表標題 患者由来大腸がんオルガノイド同所移植マウスモデルにおける転移播種細胞の同定
3. 学会等名 第79回日本癌学会学術総会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 長山 聡、岡本 拓也、八尾 良司
2. 発表標題 大腸癌組織を構成する細胞集団の多様性
3. 学会等名 第79回日本癌学会学術総会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 八尾 良司
2. 発表標題 患者由来オルガノイドを用いた大腸がんの発生、転移・再発機構の解明
3. 学会等名 患者由来がんモデル講演会 -基礎研究から臨床応用まで-
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 八尾 良司
2. 発表標題 患者由来オルガノイドを用いた大腸がん組織の細胞不均一性の解明
3. 学会等名 第20回日本再生医療学会総会
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
--	---------------------------	-----------------------	----

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