

令和 6 年 5 月 29 日現在

機関番号：17501

研究種目：基盤研究(C)（一般）

研究期間：2021～2023

課題番号：21K06924

研究課題名（和文）オルガノイド樹立による大腸粘液癌の病態解明と治療標的の同定

研究課題名（英文）Elucidation of pathogenesis and identification of therapeutic targets in colorectal mucinous carcinoma by establishing organoids

研究代表者

赤木 智徳（Akagi, Tomonori）

大分大学・医学部・講師

研究者番号：80572007

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）：大腸腺癌の一亜型である粘液癌は、通常の大腸腺癌に比べてリンパ管侵襲性が高く予後不良である。私たちは、通常の大腸腺癌ではDUSP4が癌細胞の増殖・浸潤に関わるがん抑制遺伝子であると報告した。一方、粘液癌ではDUSP4の発現亢進が観察され、通常の大腸腺癌における機能とは異なることが示唆された。そこで、DUSP4高発現細胞株でDUSP4の発現を低下させると増殖能が顕著に抑制された。これらの知見から、「DUSP4は通常の大腸腺癌ではがん抑制遺伝子として、粘液癌ではがん遺伝子として機能する」との仮説を得た。本研究では、粘液癌の病態解明のため粘液癌オルガノイドの樹立を試みた。

研究成果の学術的意義や社会的意義

現在、公的細胞バンクには大腸粘液癌の形質を保持した細胞株がない。本研究では、患者検体から粘液癌のがんオルガノイドを樹立し、粘液癌の新規研究ツールとしての培養モデルを確立する。さらに、これらを用いて粘液癌の発症・進展に関わる分子メカニズムを解明する。本研究の成果は粘液癌の早期診断法や新規治療法の開発に役立ち、大腸癌全体の治療成績の向上に寄与することが期待される。

研究成果の概要（英文）：Mucinous carcinoma, a subtype of colorectal adenocarcinoma, has a higher lymphatic invasion and poorer prognosis than conventional colorectal adenocarcinoma. We have reported that DUSP4 is a tumor suppressor gene involved in regulation of cell proliferation and invasion in conventional colorectal adenocarcinoma. On the other hand, increased expression of DUSP4 was observed in mucinous carcinoma, suggesting that its function is different from that in conventional colorectal adenocarcinoma. By downregulation of DUSP4 expression in a colorectal cancer cell line highly expressing DUSP4, the proliferation ability was significantly suppressed. From these findings, we hypothesized that DUSP4 functions as a tumor suppressor gene in normal colorectal adenocarcinoma, and as an oncogene in mucinous carcinoma. In this study, we attempted to establish mucinous cancer organoids to elucidate the pathogenesis of mucinous cancer.

研究分野：人体病理学

キーワード：大腸粘液癌 オルガノイド がん関連遺伝子

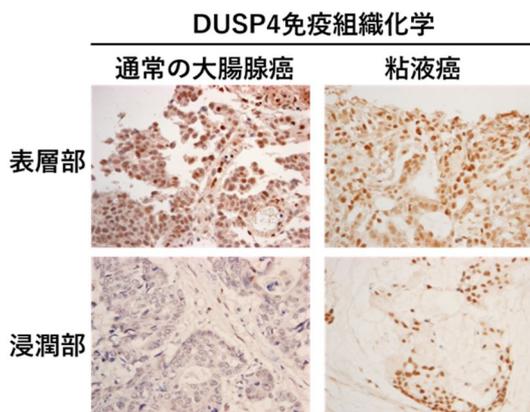
様式 C - 19、F - 19 - 1 (共通)

1. 研究開始当初の背景

全大腸癌症例の10%前後を占める粘液癌は、大腸腺癌の一亜型である。発生部位(回盲部と直腸に多い)やゲノム異常(マイクロサテライト不安定性で、KRASやBRAFの変異頻度が高く、APCやp53の変異頻度は低い)に特徴があり、通常の大腸腺癌に比べ、リンパ管侵襲性が高く予後不良であると報告されている。

私たちはこれまで、通常の大腸腺癌ではDUSP4の発現が表層で亢進し、浸潤部では低下すること(右図)を見出し、DUSP4が癌細胞の増殖・浸潤に関わるがん抑制遺伝子であると報告した(Cancer Sci. 2018)。一方、多くの粘液癌症例では、表層から浸潤部に至るまでDUSP4の発現亢進が観察され(右図)通常の大腸腺癌における機能とは異なることが示唆された。そこで、DUSP4高発現細胞株において、siRNAでDUSP4の発現を低下させると、アポトーシス誘導と細胞周期遅延が生じて、増殖能が抑制された(Biochem Biophys Res Commun. 2020)。

これらの知見から、「DUSP4は通常の大腸腺癌ではがん抑制遺伝子として、粘液癌ではがん遺伝子として機能する」との仮説を得た。通常の大腸腺癌とは異なる発癌機序を呈する粘液癌の病態解明は、早期診断法や新規治療法の開発に役立ち、大腸癌全体の治療成績の向上に寄与することが期待される。



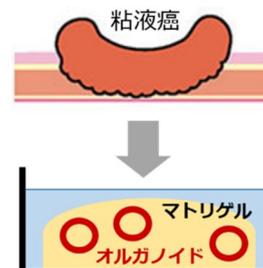
2. 研究の目的

粘液癌を対象としてこれまで多くの臨床病理学的解析が施行されているが、そのほとんどがホルマリン固定された組織ブロックと臨床病理情報を用いたものである。「粘液癌はどのシグナルパスウェイに依存して増殖・浸潤するのか?」「どの分子が治療標的となりうるのか?」といった細胞生物学的な問いに答えるためには、粘液癌の組織培養が必須となる。しかし現時点で、公的細胞バンクには粘液癌の形質が保持された細胞株はない。本研究で私たちは、手術検体から粘液癌の組織培養系(オルガノイドや細胞株)を樹立する。そして、「生きている組織」を用いた機能解析を遂行することで、粘液癌の発症・進展に関わる分子メカニズムの解明と得られた知見の臨床応用を目指す。

3. 研究の方法

大腸粘液癌の組織培養系の確立

(1) 粘液癌切除組織の癌部および非癌部から3-5 mm大の検体を採取する。それぞれ細切・酵素処理にて上皮細胞を分散させ、立体培養(オルガノイド:右図)と平面培養(細胞株)を開始する。オルガノイドの培養条件は通常の大腸腺癌のものに準拠する。細胞株の培養はオルガノイドの培養液を用いて行い、樹立完了後、一般細胞株の条件に順応させる。樹立後は一部を細胞保存液に分散させて液体窒素タンクに保管する。



(2) 樹立したオルガノイドおよび細胞株の *in vitro* における生物学的特性(増殖能、浸潤能、運動能)を調べる。また、オルガノイドについてはパラフィンブロックを作製し、その切片を用いて組織学的所見(増殖パターン、細胞極性、核異型性など)を得る。さらに、免疫組織化学を施行して、粘液癌の形質(粘液産生能、細胞増殖能、細胞内シグナル経路の活性化レベル)を確認する。

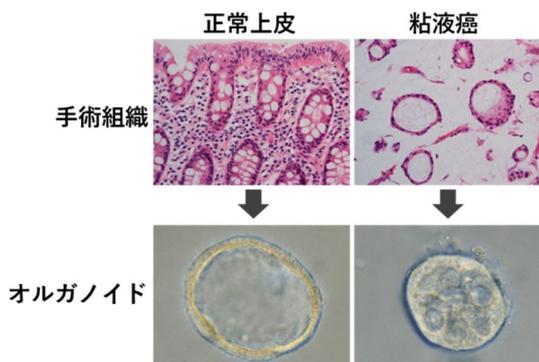
(3) 免疫不全マウスに皮下移植して、腫瘍形成性と粘液癌の組織形態像を確認する。マウスに生着可能なオルガノイドについては腫瘍形成後に、各種抗がん剤を投与して腫瘍縮小効果を観

察する。コントロールとして、すでに樹立している通常型大腸腺癌のオルガノイドを用いる。粘液癌および通常型大腸腺癌の移植腫瘍を採取して、RNA およびタンパクを抽出して、トランスクリプトーム解析やリン酸化プロテオーム解析を施行して、両者の治療抵抗性の差異に関連する分子を同定する。

4. 研究成果

(1) 大腸粘液癌オルガノイドの樹立

研究期間内に計 15 症例の大腸粘液癌患者から 8 例のがんオルガノイドに樹立に成功した。成功した 8 例のうち、組織学的に粘液癌の所見を呈していたのは 3 例だった。そのうちの 1 例を右図に示す。



残りの 5 例は、通常型の腺癌の像を示した。粘液癌は、通常型腺癌の部分が混在するものが多い。おそらくその部分から組織片を採取したためと考える。また、オルガノイド樹立が失敗した 7 例については、培養中に増殖停止したのが

5 例、細菌のコンタミネーションが 2 例であった。粘液癌の培養には通常型腺癌に用いる培養液にさらなる培養試薬（増殖因子や分化抑制因子など）の添加が必要となることが示唆された。また、粘液癌は直腸の痔瘻癌として発症する割合が多く、コンタミネーションを認めた 2 例とも直腸痔瘻癌であり、有効な抗生剤の追加も望まれた。

(2) 大腸粘液癌オルガノイドの細胞生物学的解析

樹立した粘液癌オルガノイド 3 例の増殖能を検討した。通常型腺癌のオルガノイドと比較して、同等あるいはやや低下していた。癌細胞の特徴とともに培養条件も影響するため、今後症例数を増やしていく過程で培養条件の最適化も必要である。

(3) 免疫不全マウスでの生着能の検討

樹立した粘液癌オルガノイド 3 例について、免疫不全マウス（NSG マウス）に皮下移植して生着能を検討した。いずれのオルガノイドも移植後数日で微小な腫瘍は形成するものの、その後、増殖傾向は認めなかった。消退した腫瘍組織を採取して組織学的に観察したが、明らかな粘液癌はみられなかった。移植するオルガノイド数の増量や免疫不全マウスの変更、皮下移植に加えて、マウス脾臓への同所移植を検討しているところである。

現在、オルガノイド培養の条件の最適化を進めている。具体的には、既存の培養液に含まれる培養試薬の必要性を検証することと、新たな増殖因子の有用性を検討している。また、細菌や真菌に有効な抗生剤、抗菌薬の選択も行っている。

【今後の展開】

重要なシグナルパスウェイの同定と治療応用

(1) 粘液癌、通常型腺癌、および正常上皮由来のオルガノイドから RNA を抽出して、網羅的発現解析 (Agilent) を行う。粘液癌で発現変動する遺伝子群を抽出し、それらをパスウェイ解析データベース (Ingenuity Pathway Analysis, Ingenuity Systems) に連携して、粘液癌特異的に活性化しているシグナルパスウェイの概要を得る。さらに、オルガノイドのタンパク液を抽出して、リン酸化タンパクアレイを用いて活性化シグナルパスウェイを確認する。

(2) 活性化シグナルパスウェイを構成する分子の中から、特異的阻害剤が存在し標的分子となりうる分子を選択する。免疫不全マウス移植モデルを作成して、移植したオルガノイドが生着後、阻害剤を投与（経口、腹腔）して、腫瘍の縮小効果や遠隔臓器（肝、肺、脳など）への転移抑制効果、生存期間の延長効果などを調べる。

以上の研究項目を実施することで大腸粘液癌の病態解明と、得られた知見に基づく新規治療法の開発を目指す。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計6件（うち査読付論文 6件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 2件）

1. 著者名 Akagi Tomonori, Endo Hideki, Inomata Masafumi, Shiroshita Hidefumi, Yamaguchi Shigeki, Eguchi Susumu, Wada Norihito, Kurokawa Yukinori, Seki Yosuke, Sakai Yoshiharu, Yamamoto Hiroyuki, Kakeji Yoshihiro, Kitagawa Yuko, Taketomi Akinobu, Mori Masaki	4. 巻 8
2. 論文標題 Investigation of the impact of COVID 19 on postoperative outcomes using a nationwide Japanese database of patients undergoing laparoscopic distal gastrectomy and low anterior resection for gastric cancer and rectal cancer	5. 発行年 2024年
3. 雑誌名 Annals of Gastroenterological Surgery	6. 最初と最後の頁 521 ~ 529
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1002/ags3.12776	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 Aiba Takayuki, Hijiya Naoki, Akagi Tomonori, Tsukamoto Yoshiyuki, Hirashita Yuka, Kinoshita Keisuke, Uchida Tomohisa, Nakada Chisato, Kurogi Shusaku, Ueda Yoshitake, Shiroshita Hidefumi, Shiraishi Norio, Murakami Kazunari, Inomata Masafumi, Moriyama Masatsugu	4. 巻 91
2. 論文標題 Overexpression of VSNL1 Enhances Cell Proliferation in Colorectal Carcinogenesis	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 Pathobiology	6. 最初と最後の頁 121 ~ 131
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1159/000533877	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 Akagi T, Suzuki K, Kono Y, Ninomiya S, Shibata T, Ueda Y, Shiroshita H, Etoh T, Shiomi A, Ito M, Watanabe J, Murata K, Hirano Y, Shimomura M, Tsukamoto S, Kanemitsu Y, Inomata M; Colorectal Cancer Study Group of Japan Clinical Oncology Group.	4. 巻 52
2. 論文標題 Success rate of acquiring informed consent and barriers to participation in a randomized controlled trial of laparoscopic versus open surgery for non-curative stage IV colon cancer in Japan (JCOG1107)	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Jpn J Clin Oncol	6. 最初と最後の頁 1270-1275
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1093/jjco/hyac112	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 Akagi T, Nakajima K, Hirano Y, Abe T, Inada R, Kono Y, Shiroshita H, Ohyama T, Inomata M, Yamamoto S, Naitoh T, Sakai Y, Watanabe M; Japan Society of Laparoscopic Colorectal Surgery.	4. 巻 7
2. 論文標題 Laparoscopic versus open resection for stage II/III rectal cancer in obese patients: A multicenter propensity score-based analysis of short- and long-term outcomes	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Ann Gastroenterol Surg	6. 最初と最後の頁 71-80
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1002/ags3.12599	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 Saito Shuji, Akagi Tomonori, Katayama Hiroshi, Wakabayashi Masashi, Inomata Masafumi, Yamamoto Seiichiro, Ito Masaaki, Kinugasa Yusuke, Egi Hiroyuki, Munakata Yasuhiro, Kokuba Yukihito, Bando Hiroyuki, Yasui Masayoshi, Ikeda Masataka, Nakajima Kentaro, Shida Dai, Kanemitsu Yukihide, Kitano Seigo	4. 巻 5
2. 論文標題 Identification of patient subgroups with unfavorable long term outcomes associated with laparoscopic surgery in a randomized controlled trial comparing open and laparoscopic surgery for colon cancer (Japan Clinical Oncology Group Study JCOG0404)	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Annals of Gastroenterological Surgery	6. 最初と最後の頁 804 ~ 812
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1002/ags3.12475	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 Hirashita Y, Tsukamoto Y, Kudo Y, Kakisako D, Kurogi S, Hijiya N, Nakada C, Uchida T, Hirashita T, Hiratsuka T, Akagi T, Ueda Y, Shiroshita H, Etoh T, Mizukami K, Honda K, Okimoto T, Kodama M, Inomata M, Moriyama M, Murakami K.	4. 巻 101
2. 論文標題 Early response in phosphorylation of ribosomal protein S6 is associated with sensitivity to trametinib in colorectal cancer cells	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Laboratory Investigation	6. 最初と最後の頁 1036 ~ 1047
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1038/s41374-021-00590-w	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7件(うち招待講演 0件/うち国際学会 0件)

1. 発表者名 赤木 智徳, 猪股 雅文, 塩見 明生, 伊藤 雅昭, 渡邊 純, 村田 幸平, 平能 康充, 下村 学, 塚本 俊輔, 金光 幸秀
2. 発表標題 【下部】切除不能な遠隔転移を有する局所進行大腸癌に対する集学的治療戦略 治療切除不能大腸癌に対する腹腔鏡の有用性に関する多施設共同ランダム化比較第3相試験 JCOG1107試験
3. 学会等名 第78回日本消化器外科学会総会
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 赤木 智徳, 中嶋 健太郎, 河野 洋平, 白下 英史, 大山 哲司, 齊藤 修治, 賀川 義規, 中村 隆俊, 大沼 忍, 小島 豊, 猪股 雅史, 山本 聖一郎, 内藤 剛, 坂井 義治, 渡邊 昌彦
2. 発表標題 肥満大腸癌患者に対する腹腔鏡下手術の腫瘍学的安全性を評価する後ろ向き試験(腹腔鏡大腸切除研究会プロジェクト研究)からわかる最新の知見
3. 学会等名 第78回日本大腸肛門病学会学術集会
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 赤木 智徳, 中嶋 健太郎, 河野 洋平, 白下 英史, 齊藤 修治, 賀川 義規, 中村 隆俊, 大沼 忍, 小島 豊, 猪股 雅史, 山本 聖一郎, 内藤 剛
2. 発表標題 肥満症を伴った大腸癌に対する治療戦略 肥満大腸癌症例に対する腹腔鏡下手術は有用か? 腹腔鏡大腸切除研究会プロジェクト研究
3. 学会等名 第36回日本内視鏡外科学会総会
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 赤木 智徳, 中嶋 健太郎, 河野 洋平, 平能 康充, 阿部 友哉, 稲田 涼, 猪股 雅史, 山本 聖一郎, 内藤 剛
2. 発表標題 肥満直腸癌患者に対する腹腔鏡下手術の腫瘍学的安全性を評価する後ろ向き多施設共同研究
3. 学会等名 第77回 日本消化器外科学会総会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 赤木 智徳, 猪股 雅史, 塩見 明生, 伊藤 雅昭, 渡邊 純, 村田 幸平, 平能 康充, 下村 学, 大塚 幸喜, 瀧井 康公, 岡村 修, 西村 淳, 塚本 俊輔, 金光 幸秀
2. 発表標題 困難症例に対する大腸癌手術:手技の工夫と成績 症状を伴う治癒切除不能大腸癌に対する腹腔鏡の有用性に関する多施設共同ランダム化比較第3相試験 JCOG1107試験の主たる解析結果
3. 学会等名 第35回日本内視鏡外科学会総会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 赤木 智徳, 河野 洋平, 鈴木 浩輔, 柴田 智隆, 上田 貴威, 當寺ヶ盛 学, 白下 英史, 衛藤 剛, 白石 憲男, 猪股 雅史
2. 発表標題 直腸癌手術における内視鏡外科の現状と課題 大規模臨床研究からわかる腹腔鏡下直腸癌手術の現状と課題
3. 学会等名 第34回日本内視鏡外科学会総会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 赤木 智徳, 白下 英史, 河野 洋平, 二宮 繁生, 上田 貴威, 衛藤 剛, 白石 憲男, 猪股 雅史
2. 発表標題 Stage IV大腸癌に対する腹腔鏡下原発巣切除の短期成績
3. 学会等名 第76回日本消化器外科学会総会
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
研究分担者	塚本 善之 (Tsukamoto Yoshiyuki) (00433053)	大分大学・医学部・助教 (17501)	
研究分担者	猪股 雅史 (Inomata Masafumi) (60315330)	大分大学・医学部・教授 (17501)	
研究分担者	泥谷 直樹 (Hijiya Naoki) (80305036)	大分大学・医学部・准教授 (17501)	

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