

令和 6 年 6 月 17 日現在

機関番号：72602

研究種目：挑戦的研究（萌芽）

研究期間：2022～2023

課題番号：22K19468

研究課題名（和文）がん組織における分化転換機構の解明

研究課題名（英文）Molecular analysis of transdifferentiation in tumor tissue

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）：大腸癌の90%を占める高・中分化管状腺癌は、幹細胞を頂点とする正常大腸組織の細胞系譜を反映することが知られているが、細胞組成が異なる低分化大腸癌の発生・恒常性維持機構は十分に理解されていない。本研究では、患者由来オルガノイドを樹立し、解析プラットフォームを確立するとともに、遺伝子変異・発現解析に加え、シングルセルレベルでのクローニングと異所・同所移植実験を行い、低分化腺癌、粘液癌、印環細胞癌の3タイプの分化形質転換について検討した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

複数の細胞種が存在する低分化大腸癌から患者由来オルガノイドを樹立することにより、がん組織の細胞多様性と可塑性の細胞生物学的な解析が可能になったことは、学術的に意義があると考えられる。また、進行が早く、腹膜転移が多いとされ、予後不良であることが知られている低分化大腸癌の治療法開発の解析プラットフォームとしての貢献が期待される。

研究成果の概要（英文）：It is known that well- and moderately-differentiated tubular adenocarcinomas, which account for 90% of colorectal cancers, reflect the cellular lineage of normal colorectal tissues with stem cells at their apex. However, the mechanisms of development and homeostasis maintenance in poorly-differentiated colorectal cancers, which have different cellular compositions, are not well understood. In this study, we established patient-derived organoids and generated the analysis platform. Alongside gene mutation and expression analysis, we conducted single-cell level cloning and heterotopic and orthotopic transplantation experiments to investigate the differentiation conversion mechanisms of three types of poorly-differentiated colorectal cancer, including mucinous carcinoma, signet-ring cell carcinoma, and poorly-differentiated adenocarcinoma.

研究分野：細胞生物学

キーワード：大腸癌 患者由来オルガノイド

## 様式 C - 19、F - 19 - 1 (共通)

### 1. 研究開始当初の背景

生体組織は、厳密に制御されたプログラムに基づき、組織特異的な機能を維持する。各組織は、成体幹細胞(Adult Stem Cell, AdSC)の dormant な性質により数十年という長期間にわたり、組織恒常性が維持される。AdSC は、一定の割合で増殖細胞を生じることにより組織を構成する細胞数を維持し、さらにそこから固有の機能をもつ分化細胞が生じる。消化管組織では、腸陰窩の底部に存在する幹細胞から、水分と栄養の吸収に腸上皮細胞に加え、粘液やホルモンを分泌する分泌系細胞が産生される。大腸癌は、幹細胞にドライバー変異が生じることにより発生し、正常組織の細胞系譜を反映した細胞集団が構成されると考えられる。

大腸癌では、明瞭で大きな管状構造をもつ高分化管状腺癌、比較的小型の管状構造からなる中分化管状腺癌が 90% を占める。これらの高分化大腸癌は吸収上皮系細胞を主成分とし、その発生機構については、遺伝子変異解析に基づく多段階発がんモデルが提唱され、モデルマウスを用いた解析により個体レベルで実証されている。一方、進行が早く、腹膜転移が多いとされ、予後不良であることが知られている低分化大腸癌は、管腔構造に乏しい低分化腺癌、大量の粘液を産生し粘液の結節を形成する粘液癌、細胞内に粘液を貯留し管腔形成が極めて乏しい印環細胞癌で構成されるがそれらの発生機構および恒常性維持機構は、明らかになっていない。

### 2. 研究の目的

これまで多くのがん研究で用いられてきた二次元培養細胞は、粘液貯留を始めとする様々な低分化大腸癌細胞の形質の再現性に乏しいことが、研究推進の障害となっている。そこで本研究では、低分化大腸癌の手術検体から患者由来オルガノイド(patient derived organoids, PDOs)を樹立することにより解析基盤を確立することを第一の目的とした。

高分化管状腺癌では、幹細胞を頂点とする正常大腸組織の細胞系譜に従い発生するため、吸収上皮様細胞を主成分とするがん組織が構成されると考えられる。これに対して、低分化大腸癌は、多くの分泌系細胞で構成されることに加え、しばしば組織型が異なる複数のがん細胞で構成されることなどから、高分化管状腺癌とは異なる分子機構を持つと考えられる。そこで、本研究課題では低分化大腸癌組織の発生・恒常性維持機構を細胞生物学的に明らかにすることを目指した。

### 3. 研究の方法

#### (1) 低分化大腸癌由来 PDOs の基盤整備

手術時に低分化大腸癌の可能性が指摘された患者から PDOs を樹立するとともに、由来する患者の属性やがん組織の発生部位や最終的な病理診断などの臨床病理学的情報を収集した。一部の手術検体については、エクソームシーケンスと RNA-seq を行った。

#### (2) オミックス解析

PDOs のエクソームシーケンスおよび RNA-seq を行った。さらに一部の PDOs については、由来する手術検体の空間的トランスクリプトーム解析を実施した。

#### (3) 細胞生物学的解析

PDOs の増殖を制御するニッチ因子を検討し、培養条件を最適化した。組織学的解析では、固定・包埋による薄切標本の免疫染色に加え、オルガノイドの三次元構造を維持する固定および免疫染色標本作成のプロトコルを作成した。さらにハイスループットな三次元画像取得と画像解析技術を開発した。

#### (4) 異所・同所移植実験

PDOs の免疫不全マウスの腎臓への異所移植を行い、移植組織の組織学的解析を行った。また小型内視鏡を用いた直腸への移植を行い、同所移植による組織学的解析および転移能の検討を行った。

### 4. 研究成果

#### (1) 低分化大腸癌由来 PDOs の基盤整備

低分化大腸癌と診断された 20 名の患者から PDOs を樹立した。原発巣に複数の病変が認められた 3 症例からはそれぞれ 2 系統の原発巣由来 PDOs を、また肝転移が認められた症例からは 3 つの独立した転移巣から PDOs を樹立した結果、計 26 個の PDOs を解析対象とした。手術後の病理診断では、低分化腺癌 8、粘液癌 11、印環細胞癌 1、高・中分化管状腺癌 1、混在型 5 に分類された。また原発巣

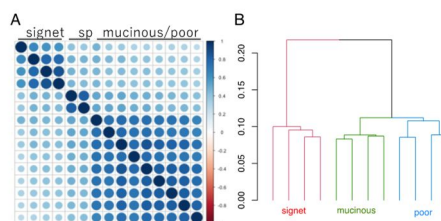


図 1 低分化大腸癌患者由来オルガノイドのオミックス解析 A. 遺伝子変異解析。ピアソン相関係数を示す B. 遺伝子発現解析。階層的クラスタリング解析を示す。Poor: 低分化腺癌、muc: 粘液癌、Signet: 印環細胞癌、sp: 手術検体

に複数病変を認められた 3 症例では、1 症例で 2 つとも粘液癌、2 症例では異なる組織型に分類された。肝転移症例から樹立された 4 つの PDOs は、いずれも低分化腺癌と診断された。また原発巣の占拠部位は、右側、左側でそれぞれ 52%と 48%であった。

#### (2) オミックス解析

PDOs の遺伝子変異解析の結果、33%で APC 遺伝子変異、59%で TP53 遺伝子変異が生じていた。興味深いことに、41%に BRAF V600E 変異、15%に KRAS G12D/G13C/G13D 変異が確認された。APC、TP53、KRAS 変異の頻度は一般的な大腸癌に比べて低く、また BRAF 変異の頻度が高いことから、解析対象となる PDOs セットは、生体内の低分化大腸癌の特徴を維持すると考えられた。興味深いことに、BRAF 変異と KRAS 変異は相互排他的であり、遺伝子発現解析では、異なるクラスターリングに分類されることが明らかになった。

#### (3) 細胞生物学的解析

ヒト大腸癌由来 PDOs は様々な形態を呈することが明らかになっていることから、AI による分類器を開発した(Okamoto et al., 2022)。一方、96 ウエルオブティカルプレート上で培養した PDOs の 3 次元免疫染色法を開発した(Sakahara et al., 2023)。各ウエルは低倍率レンズのスキャンによりオルガノイドの位置を検索し、保存された位置情報に基づき高倍率レンズで 3 次元撮像を行った。さらに独自プロトコルを作成し、ハイスループット解析を行った。PDOs の形態に基づき、各オルガノイドを低分化腺癌、粘液癌、印環細胞癌に分類した。

混在型 PDOs については、オルガノイドレベルのクローニングを行い、培養を継続したところ、印環細胞癌型 PDOs は、その形態を維持したのに対し、低分化腺癌型 PDOs からは、粘液細胞癌型 PDOs が生じ、二つのタイプが混在した。この結果は、単一のオルガノイドに二種類の細胞が存在し、継代の際にオルガノイドを細分化した結果、一方が優勢となり結果として 2 タイプ混在となる。あるいは、低分化腺癌型から粘液癌型に形質転換した。という二つの可能性が考えられた。そこで、細胞レベルのクローニングを行い、シングルセルからオルガノイドを作成したところ、低分化腺癌型と粘液細胞型の 2 つのタイプを独立に得た。しかし、長期間培養すると、いずれのクローンも 2 つのタイプが混在した。これらの結果は、低分化大腸癌型から粘液細胞癌型に加え、粘液細胞癌型から低分化大腸癌型へ、細胞レベルで形質転換を生じることを示している。

混在型 PDOs のプライマリーおよびサブクローンの遺伝子変異解析では、多くのドライバー変異を共有しており、起源細胞を同一にすることが予想された。また、印環細胞型クローンとそれ以外の 2 群に分かれ、異なる遺伝子変異にはクロマチンリモデリング制御に関わる分子が含まれていた(図 1 A)。低分化腺癌クローンと粘液癌クローンとの間に明らかな遺伝子変異の違いを見出すことはできなかった。一方、遺伝子発現データの階層クラスタ分析では、印環細胞癌型オルガノイドとそれ以外のクローンの 2 群に分かれ、さらに低分化腺癌クローンと粘液癌クローンに分けられた(図 1 B)。

以上の結果から、低分化大腸癌の組織学的形質は、遺伝子変異による不可逆的な細胞運命決定機構と遺伝子発現による可逆的な分子機構により制御されている可能性が示唆された。

#### (4) 異所・同所移植実験

樹立された PDOs の腎臓移植を行い、生着したがん組織の病理学的解析を行ったところ、印環細胞癌由来 PDOs は、患者検体と類似性が高い印環細胞癌組織を形成した。一方、粘液癌由来 PDOs では粘液癌組織に加え、低分化腺癌組織を形成するクローンが確認された。また、混在型低分化大腸癌組織から樹立され、形態分類で低分化腺癌、粘液癌、印環細胞癌の 3 タイプが存在する PDOs は、移植巣でも 3 つのタイプが存在していた。興味深いことに、オルガノイドの形態に基づき、それぞれの組織型に分けられたクローンの移植巣は、印環細胞癌オルガノイドは印環細胞癌組織を形成したのに対し、低分化腺癌と粘液癌オルガノイドは、いずれも二つの組織が混在する腫瘍組織を形成した。これらの結果から、本研究で定義されたオルガノイドの形態と生体内での組織型は一致すること、印環細胞癌は比較的安定であるのに対し、低分化腺癌と粘液癌はその形質をお互に変化させることが示唆された。

PDOs の転移能を検討するために、混在型低分化大腸癌から樹立され、それぞれの形態に基づきクローン化されたオルガノイドを直腸に同所移植した。その結果、低分化腺癌および粘液細胞癌由来オルガノイドでは転移は認められなかったのに対し、印環細胞癌由来オルガノイドの一部で、肺転移が確認された。これらのサブクローンは、同一の起源細胞を有することから、癌の進展過程に生じる変化により転移能を獲得したと考えられる。

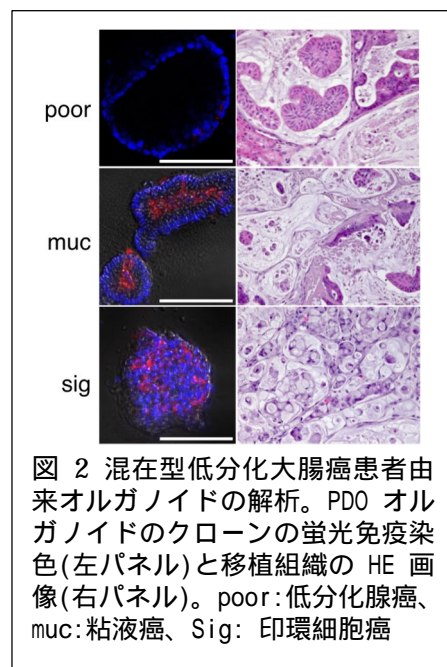


図 2 混在型低分化大腸癌患者由来オルガノイドの解析。PDO オルガノイドのクローンの蛍光免疫染色(左パネル)と移植組織の HE 画像(右パネル)。poor:低分化腺癌、muc:粘液癌、Sig: 印環細胞癌

## 5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計5件（うち査読付論文 3件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 3件）

1. 著者名 Sakahara Mizuho, Okamoto Takuya, Srivastava Upasna, Natsume Yasuko, Yamanaka Hitomi, Suzuki Yutaka, Obama Kazutaka, Nagayama Satoshi, Yao Ryoji	4. 巻 7
2. 論文標題 Paneth-like cells produced from OLFM4+ stem cells support OLFM4+ stem cell growth in advanced colorectal cancer	5. 発行年 2024年
3. 雑誌名 Communications Biology	6. 最初と最後の頁 27
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1038/s42003-023-05504-8	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 Saeki Sumito, Kumegawa Kohei, Takahashi Yoko, Yang Liying, Osako Tomo, Yassen Mahmut, Otsuji Kazutaka, Miyata Kenichi, Yamakawa Kaoru, Suzuka Jun, Sakimoto Yuri, Ozaki Yukinori, Takano Toshimi, Sano Takeshi, Noda Tetsuo, Ohno Shinji, Yao Ryoji, Ueno Takayuki, Maruyama Reo	4. 巻 25
2. 論文標題 Transcriptomic intratumor heterogeneity of breast cancer patient-derived organoids may reflect the unique biological features of the tumor of origin	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 Breast Cancer Research	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1186/s13058-023-01617-4	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, Natsume Yasuko, Doi Motomichi, Nosato Hirokazu, Iwaki Toshiyuki, Yamanaka Hitomi, Yamamoto Mayuko, Kawachi Hiroshi, Noda Tetsuo, Nagayama Satoshi, Sakanashi Hidenori, Yao Ryoji	4. 巻 113
2. 論文標題 Integration of human inspection and artificial intelligence based morphological typing of patient derived organoids reveals interpatient heterogeneity of colorectal cancer	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Cancer Science	6. 最初と最後の頁 2693-2703
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1111/cas.15396	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 八尾 良司	4. 巻 48
2. 論文標題 患者由来オルガノイドを用いた細胞個性解析	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Medical Science Digest	6. 最初と最後の頁 585-588
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） なし	査読の有無 無
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 大隅 寛木、篠崎 英司、大木 暁、八尾 良司	4. 巻 45
2. 論文標題 BRAF V600E変異陽性大腸癌オルガノイドを用いたEGFR、BRAF及びMAPK阻害の耐性に関わるバイオマーカーの解明	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 大和証券ヘルス財団研究業績集	6. 最初と最後の頁 58-63
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) なし	査読の有無 無
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 八尾 良司
2. 発表標題 大腸がん組織の恒常性維持機構の解明
3. 学会等名 日本患者由来がんモデル学会学術集会
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 長山 聡、坂原 瑞穂、岡本 拓也、鈴木 穰、小濱 和貴、八尾 良司
2. 発表標題 大腸癌におけるPaneth様細胞はOLFM4陽性幹細胞から派生し、同細胞の増殖を支持する
3. 学会等名 第82回日本癌学会学術総会
4. 発表年 2023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から見てきたがん組織の細胞社会ダイバーシティ
3. 学会等名 第45回日本分子生物学会年会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 長山 聡、岡本 拓也、八尾 良司
2. 発表標題 患者由来大腸癌オルガノイドのAIによる形態タイピングの試み
3. 学会等名 第81回日本癌学会学術総会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 八尾 良司
2. 発表標題 同一患者に由来するヒト大腸がんオルガノイドを用いたがんの発生・転移機構の解明
3. 学会等名 第81回日本癌学会学術総会
4. 発表年 2022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使った大腸癌組織細胞多様性の解析
3. 学会等名 第4回 学際的がん研究 夏の学校@別府
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 八尾 良司
2. 発表標題 消化管組織の細胞社会ダイバーシティ
3. 学会等名 細胞社会ダイバーシティの統合的解明と制御 研究成果報告 公開シンポジウム 細胞社会ダイバーシティの理解と制御 -これまでとこれから-
4. 発表年 2022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
---------	---------