

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 6 月 2 日現在

機関番号：12601

研究種目：基盤研究(A) (一般)

研究期間：2013～2015

課題番号：25253080

研究課題名(和文) マイクロサテライト不安定性を呈する発癌機構の統合的理解と新たな治療体系の確立

研究課題名(英文) A Comprehensive Approach Encompassing New Therapeutics for
Microsatellite-instability Associated Colorectal Neoplasms

研究代表者

渡邊 聡明 (Watanabe, Toshiaki)

東京大学・医学部附属病院・教授

研究者番号：80210920

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 33,500,000円

研究成果の概要(和文)：大腸鋸歯状病変およびマイクロサテライト不安定性(MSI)を呈する大腸癌を含めた計55株の大腸腫瘍オルガノイド株を樹立し、詳細な分子生物学的検討を行った。オルガノイドは患者体内における組織学的特性を反映しており、固有の遺伝子発現や遺伝子変異のパターンを有していた。MSI大腸癌は多数の遺伝子変異を有しており、増殖因子が極めて乏しい環境でも発育可能であった。移植による担癌マウスモデルにおいても同様の傾向が保持され、MSI大腸癌オルガノイドは有意に腫瘍形成能が優れていた。以上の結果より、MSI大腸癌は他の大腸癌とは生物学的特徴が全く異なる疾患であり、個別の治療アプローチの重要性が示唆された。

研究成果の概要(英文)：We generated 55 organoid lines from colorectal neoplasms, including serrated lesions and MSI colon cancers, and elaborated their biological properties. The organoids pathophysiologically recapitulated the patient tumors and exhibited unique gene expression and genetic mutation patterns. MSI colon cancers harbored substantial number of non-synonymous mutations, allowing their robust growth in hostile conditions with poor growth factors. Similar property of the MSI colon cancer organoids was observed in the xenograft models, in which the MSI colon cancer organoids displayed significantly higher tumorigenic capacity. These data suggested that the MSI colorectal cancers distinctively differ from the other sporadic colorectal cancers in molecular and biological characters, highlighting the significance of the individual therapeutics toward eradication of the MSI colorectal cancers.

研究分野：消化器外科学

キーワード：大腸癌 マイクロサテライト不安定性 オルガノイド DNAメチル化 鋸歯状腺腫 次世代シーケンス
マイクロアレイ

1. 研究開始当初の背景

本邦において大腸癌罹患患者数および死亡者数は増加の一途をたどっており、同疾患に対する対策は社会的急務である。散発性大腸癌の約 15%は DNA ミスマッチ修復遺伝子の機能欠失に伴う DNA マイクロサテライト不安定性 (Microsatellite Instability: MSI) を呈し、腺腫を経て発生する一般的な大腸癌とは全く異なる臨床的および分子生物学的な特徴を有する。MSI 大腸癌では BRAF 遺伝子変異およびプロモーター領域における DNA メチル化 (CpG アイランドメチル化: CIMP) が高頻度で認められるが、これら分子異常の成因や発癌への寄与は全く明らかとなっていない。さらに MSI 大腸癌の再発後の予後は極めて不良であり、現在の画一的な化学療法にかわる新規治療の創出が求められる。

一方で、腸管上皮幹細胞を体外で永続的に培養する画期的な培養方法が近年確立され、大腸癌細胞の培養にも応用可能であることが示されている。本培養条件下では、幹細胞は体内の粘膜組織に類似した三次元構造 (オルガノイド) を自律的に構築する。オルガノイドは遺伝子機能解析や薬効試験など様々な分野への応用が可能であり、従来の細胞株やマウスにかわる研究ツールとして大いに期待されている。

2. 研究の目的

オルガノイド培養方法および最新の遺伝子編集技術を応用し、MSI 大腸癌に特徴的な BRAF 遺伝子変異および CIMP の発癌過程における寄与を明らかにする。最終的には、正常大腸粘膜から MSI 大腸癌に至る過程、いわゆる serrated pathway を体外にて再構築することで、その詳細な分子メカニズムを解明したい。

さらに臨床への応用を見据え、異種移植による担癌マウスモデルを用いた薬効評価プラットフォームを確立し、MSI 大腸癌を標的とした新規治療体系の創出を目指す。

3. 研究の方法

(1) オルガノイドに対する遺伝子編集技術の確立

BRAF 遺伝子変異をはじめとした遺伝子変異に伴う直接的な作用を観察するためには、遺伝子ノックアウトあるいは変異ノックイン技術が必要であるが、オルガノイドに対する応用は報告されていない。そのため、本研究ではヒト大腸オルガノイドに対して正確な遺伝子編集を可能にする技術体系の確立を行った。遺伝子編集には近年報告された CRISPR/Cas9 システムを採用し、オルガノイドに効率的な遺伝子導入手法の条件検討を行った。

(2) 大腸癌発癌過程の体外再構築

大腸癌は大腸上皮幹細胞における遺伝子変

異の蓄積に伴い発生すると考えられている。その実証として、(1)で確立したオルガノイドへの遺伝子編集技術を応用し、ヒト正常大腸上皮オルガノイドに大腸癌において高頻度で認められる遺伝子変異を導入し、その形質評価を行った。これまでの研究報告から、非 MSI 大腸癌と MSI 大腸癌は遺伝子変異では遺伝子変異プロファイルは異なるものの、主要なシグナルパスウェイ変異 (Wnt 経路, RAS-MAPK 経路, PI3K-AKT 経路, TGF **経路**, TP53 経路) の頻度は相似していることが分かっている。そのため、まずはそれぞれのパスウェイにおける代表的な遺伝子変異を連続的に導入することで、大腸癌発癌過程を体外で再構築することを目指した。

(3) ヒト大腸鋸歯状病変・MSI 大腸癌からのオルガノイド樹立、分子生物学的解析
現在、ヒト大腸鋸歯状病変 (過形成ポリープ, sessile serrated adenoma/polyp: SSA/P) の細胞株は確立されていない。そのため、in vitro で活用可能な生きたツールを確立するため、書面による同意が得られた大腸鋸歯状病変患者より、内視鏡下生検にて検体を採取し、オルガノイド樹立を行った。同様に、serrated pathway の最終像である MSI 大腸癌の内視鏡下生検あるいは手術検体を入手し、オルガノイドを樹立した。

樹立したオルガノイド株は非鋸歯状病変との差別化のため、変異特異的 PCR により BRAF 遺伝子変異、および定量 PCR (Methylight 法) により DNA メチル化を確認した。さらに、大腸癌で認められる代表的な変異遺伝子のターゲットリシーケンスあるいはエキソームシーケンスによる遺伝子変異解析、SNP マイクロアレイによる DNA コピーナンバー解析、発現マイクロアレイによる網羅的遺伝子発現解析を体系的に展開し、詳細な分子生物学的プロファイルの同定を行った。

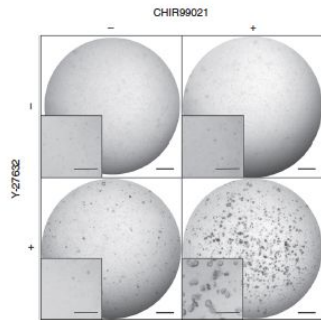
(4) 異種移植による非臨床モデルの作製

In vitro で得られた知見をベッドサイドに還元するための橋渡しとして、非臨床モデルの確立が肝要である。項目(2),(3)と連動し、得られた遺伝子改変オルガノイドあるいは鋸歯状病変オルガノイドの腫瘍学的性質を評価するため、超免疫不全マウス (NOG マウス) への異種移植モデルの作製を行った。それぞれのオルガノイドを蛍光標識し、腎被膜下カプセルおよび脾臓へ移植した。腎被膜下における腫瘍面積を局所腫瘍形成能、肝転移面積を転移能の指標とした。

4. 研究の成果

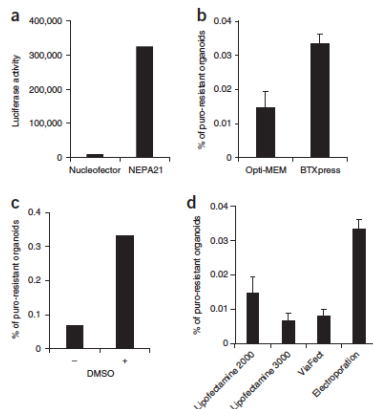
(1) ヒト大腸オルガノイドに対する効率的な遺伝子導入方法および編集技術の確立
従来のレンチウイルス感染やリポフェクション法に代わる、より効率的かつ簡便なオルガノイドへの遺伝子導入法を確立するため

の条件検討を行った。効果的な遺伝子導入には対象が単細胞化されていることが肝要であるが、単細胞化されたヒト大腸上皮オルガノイドは容易に細胞死 (anoikis) に至る。このジレンマを解消するための培養条件検討をまず行った。その結果、単細胞化処理の2日前より培地に ROCK 阻害剤および GSK3 阻害剤を添加することで anoikis が回避され、コロニー形成能が大幅に向上することを見出した。



図：ROCK 阻害剤，GSK3 阻害剤により大幅にコロニー形成能が向上する

哺乳動物細胞に対する効率的な遺伝子導入法としてエレクトロポレーション法が確立されているため、オルガノイドに対して本手法を応用するための条件検討を引き続いて行った。種々のエレクトロポレーション機器やバッファーを用いた比較検証を行い、遺伝子導入効率の向上を積み重ねた結果、従来法の6倍の効率でオルガノイドに対する遺伝子導入を可能にする至適条件を導出した。



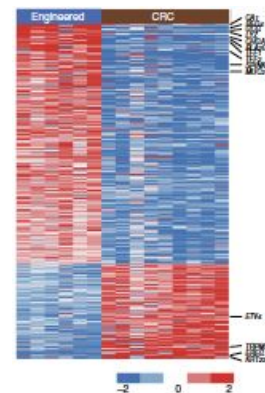
図：オルガノイドに対する効率的な遺伝子導入法の検討

最終的には上記によって確立されたエレクトロポレーション法による遺伝子導入法を、最新の遺伝子編集技術である CRISPR/Cas9 システムと癒合せせることで、ヒト大腸オルガノイドに対する任意の遺伝子のノックアウトあるいは変異ノックインが可能となり、オルガノイドをベースとした遺伝子機能解析の基盤を構築した。

(2)大腸癌発癌過程の体外再構築

項目(1)にて確立した遺伝子導入法を用い、正常大腸上皮オルガノイドに対する代表的な大腸癌パスイ遺伝子変異の導入を行った。具体的には CRISPR/Cas9 システムを用いて APC 遺伝子、TP53 遺伝子、SMAD4 遺伝子のノックアウト、および変異ドナーベクターを用いて KRAS 遺伝子変異ノックインを連続的に導入した。正常大腸上皮オルガノイドはそれぞれのニッチシグナルに相当する増殖因子を必要とする一方で、パスイ変異獲得に伴いその増殖因子が不要となる。この特性を利用し、変異導入オルガノイドの効率的なセクションが可能であった。

得られた遺伝子改変オルガノイドは EGF 阻害剤や TGF 存在下でも頑強に発育することが可能であったが、遺伝子発現パターンは腺腫と類似している一方で大腸癌からは大きな乖離があり、遺伝子変異の獲得のみでは大腸癌には至らないことが示唆された。



図：遺伝子改変オルガノイドと大腸癌の遺伝子発現パターンは大きく異なる

今回の検討では RAS-MAPK 経路におけるパスイ遺伝子変異として KRAS 遺伝子変異を採用したが、MSI 大腸癌は BRAF 遺伝子変異を主体とする。そのため、現在 BRAF 遺伝子変異ノックインを用いて同様の検討を試行中である。

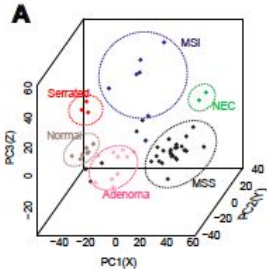
(3) 大腸鋸歯状病変を含む大腸腫瘍オルガノイドライブラリの確立

大腸 serrated pathway を網羅するアーカイブをオルガノイドとして確立するため、過形成ポリープ、SSA/P、MSI 大腸癌からのオルガノイド樹立を行った。過形成ポリープ、SSA/P からのオルガノイド樹立は正常上皮のコンタミネーションや発育不良等の理由により困難であったが、計 3 株の樹立に成功した。MSI 大腸癌オルガノイドはサブクローンを含めて 7 株を樹立した。

MSI の有無は検体入手時には不明であり、サンプル拡充の段階で多数の MSS 大腸癌が樹立された。これら MSS 大腸癌および既存のオルガノイド株を包括し、計 55 株のライブラリとして統合的に分子生物学的な解析およびニッチ因子要求性の検討を行った。

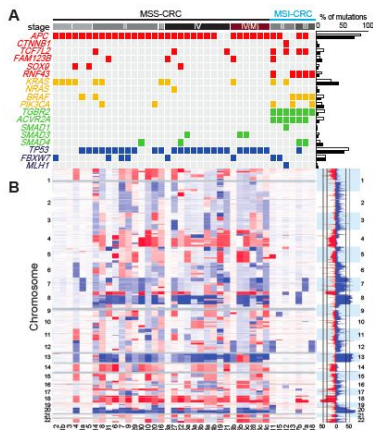
マイクロアレイを用いた網羅的遺伝子発現

解析では、良性鋸歯状病変（過形成ポリープ/SSAP）、MSI 大腸癌、腺腫、MSS 大腸癌はいずれも明確に区分され、それぞれのオルガノイドに特徴的な遺伝子発現パターンを有することが裏付けられた。



図：それぞれの大腸腫瘍オルガノイドは組織学的特徴を反映した遺伝子発現パターンを有する

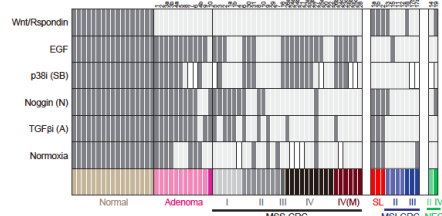
遺伝子変異解析では多様な変異スペクトラムが認められたが、それぞれの遺伝子の変異頻度は TCGA データベースにおける頻度と類似しており、オルガノイド樹立は特定の遺伝子変異に依存しないことが示された。BRAF 遺伝子変異は鋸歯状病変オルガノイドの全て、および MSI 大腸癌の 57% に認められた。また、MSI 大腸癌はそのマイクロサテライトにおける変異を反映し、高頻度で TGFBR2, ACVR2A 変異が認められた。コピーナンバー解析では、MSI 大腸癌の染色体は安定である一方で MSS 大腸癌は不安定性を伴っており、これら大腸癌の全くことなる分子生物学的特性を反映していた。



図：MSI 大腸癌オルガノイドは固有の遺伝子変異プロファイル、染色体安定性を有する

正常大腸上皮オルガノイドの永続的な培養には Wnt3A/Rspondin1, EGF, Noggin, TGF 阻害剤, P38MAPK 阻害剤のニッチ因子が必要である一方で、大腸腫瘍オルガノイドは遺伝子変異等を通じてニッチ因子への要求性が

低下する。樹立したオルガノイド全てについて、最低限必要なニッチ条件をそれぞれ検討したところ、ニッチ因子要求性は良性病変から癌への移行過程において大きく低下することが分かった。さらに、MSI 大腸癌はいずれも極めて低いニッチ要求性を示しており、多岐のパスウェイにわたる遺伝子変異の獲得を反映していると考えられた。

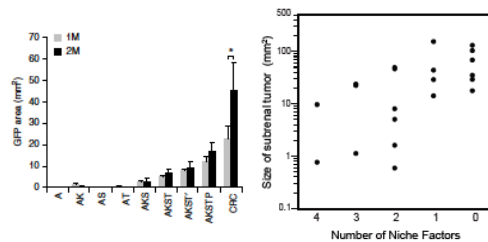


図：それぞれの大腸腫瘍オルガノイドにおけるニッチ因子への要求性

(4) 異種移植による非臨床モデルの作成

これまでに樹立を行った大腸癌オルガノイド、および項目(2)で作製した遺伝子改変オルガノイドの in vivo における形質を評価するため、蛍光タンパク (GFP) にて標識後、超免疫不全マウス (NOG マウス) への異種移植を行った。局所増殖能の評価として腎被膜下カプセルにおける腫瘍形成能、転移能の評価として脾臓移植後の肝転移形成能を用いた。遺伝子改変オルガノイドは導入された遺伝子変異の個数に応じて局所増殖能が向上した一方で、目視可能な肝転移は形成しなかった。この結果より、局所増殖能はニッチ因子要求性により規定されるが、転移能獲得にはさらなる生物学的な変化が必要であることが示唆された。

大腸癌オルガノイドにおいても同様の傾向が認められ、生着面積とニッチ因子の個数は有意に相関していた。MSI 大腸癌はそのニッチ因子の低さを反映し、特に粗大な腫瘍を形成した。



図：オルガノイドの腫瘍形成能はニッチ因子要求性と相関する

肝転移形成能は肝転移由来オルガノイド、および MSI 大腸癌オルガノイドで有意に優れており、ニッチ因子要求性に加えて転移能を促進する何らかの生物学的メカニズムが内在することが示唆された。

この動物モデルは大多数の大腸癌オルガノイドの生着を許容する頑強なモデルであるが、深部臓器への移植を用いているため経時的な腫瘍量の観察には不向きである。そのため、現在ヌードマウスへの皮下移植モデルを

作製し、抗がん剤等の投与による薬効評価体系を構築中である。

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

〔雑誌論文〕(計 19 件)

Fujii M, Shimokawa M, Date S, Takano M, Matano M, Nanki K, Ohta Y, Toshimitsu K, Nakazato Y, Kawasaki K, Uraoka T, Watanabe T, Kanai T, Sato T, A Colorectal Tumor Library Demonstrates Progressive Loss of Niche Factor Requirements during Tumorigenesis, *Cell Stem Cell*, 18, 2016, 査読有

Doi: 10.1016/j.stem.2016.04.003

Ota Y, Ishihara S, Otani K, Yasuda K, Nishikawa T, Tanaka T, Tanaka J, Kiyomatsu T, Kawai K, Hata K, Nozawa H, Kazama S, Yamaguchi H, Sunami E, Kitayama J, Watanabe T, Effect of nutrient starvation on proliferation and cytokine secretion of peripheral blood lymphocytes, *Molecular and Clinical Oncology*, 4, 607-610, 2016, 査読有

Kishikawa J, Kazama S, Oba K, Hasegawa K, Anzai H, Harada Y, Abe H, Matsusaka K, Hongo K, Oba M, Yasuda K, Otani K, Nishikawa T, Tanaka T, Tanaka J, Kiyomatsu T, Hata K, Kawai K, Nozawa H, Yamaguchi H, Ishihara S, Sunami E, Ushiku T, Kitayama J, Fukayama M, Kokudo N, Watanabe T, CD133 Expression at the Metastatic Site Predicts Patients' Outcome in Colorectal Cancer with Synchronous Liver Metastasis, *Annals of Surgical Oncology*, 23, 1916-23, 2016, 査読有

Doi: 10.1245/s10434-016-5099-1.

Date S, Sato T, Mini-gut organoids: reconstitution of the stem cell niche, *Annual Review of Cell and Developmental Biology*, 31, 269-89, 2015, 査読有

Doi:10.1146/annurev-cellbio-100814-125218

Kuipers EJ, Grady WM, Lieberman D, Seufferlein T, Sung JJ, Boelens PG, van de Velde CJ, Watanabe T, Colorectal cancer, *Nature Reviews Disease Primers*, 1, 15065, 2015, 査読有

Doi: 10.1038/nrdp.2015.65

Fujii M, Matano M, Nanki K, Sato T, Efficient genetic engineering of human intestinal organoids using

electroporation, *Nature Protocols*, 10, 1474-85, 2015, 査読有

Doi: 10.1038/nprot.2015.088

Nozawa H, Tanaka J, Nishikawa T, Tanaka T, Kiyomatsu T, Kawai K, Hata K, Kazama S, Yamaguchi H, Ishihara S, Sunami E, Kitayama J, Nakajima J, Kokudo N, Watanabe T, Predictors and outcome of complete removal of colorectal cancer with synchronous lung metastases, *Molecular and Clinical Oncology*, 3, 1041-1047, 2015, 査読有

Shibata J, Kawai K, Nishikawa T, Tanaka T, Tanaka J, Kiyomatsu T, Hata K, Nozawa H, Kazama S, Yamaguchi H, Ishihara S, Sunami E, Kitayama J, Sugihara K, Watanabe T, Prognostic Impact of Histologic Type in Curatively Resected Stage IV Colorectal Cancer: A Japanese Multicenter Retrospective Study, *Annals of Surgical Oncology*, 22, S621-9, 2015, 査読有

Doi: 10.1245/s10434-015-4846-z

Nagai Y, Yamamoto Y, Yasuhara T, Hata K, Nishikawa T, Tanaka T, Tanaka J, Kiyomatsu T, Kawai K, Nozawa H, Kazama S, Yamaguchi H, Ishihara S, Sunami E, Yamanaka T, Miyagawa K, Watanabe T, High RAD54B expression: an independent predictor of postoperative distant recurrence in colorectal cancer patients, *Oncotarget*, 28, 21064-73, 2015, 査読有

Matano M, Date S, Shimokawa M, Takano A, Fujii M, Ohta Y, Watanabe T, Kanai T, Sato T, Modeling colorectal cancer using CRISPR-Cas9-mediated engineering of human intestinal organoids, *Nature Medicine*, 21, 256-62, 2015, 査読有

Doi: 10.1038/nm.3802

Ozawa T, Ishihara S, Nishikawa T, Tanaka T, Tanaka J, Kiyomatsu T, Hata K, Kawai K, Nozawa H, Kanazawa T, Kazama S, Yamaguchi H, Sunami E, Kitayama J, Watanabe T, Prognostic significance of the lymph node ratio in stage IV colorectal cancer patients who have undergone curative resection, *Annals of Surgical Oncology*, 22, 1513-9, 2015, 査読有

Doi: 10.1245/s10434-014-4184-6

Sakai K, Kazama S, Nagai Y, Muro K, Tanaka T, Ishihara S, Sunami E, Tomida S, Nishio K, Watanabe T,

Chemoradiation provides a physiological selective pressure that increases the expansion of aberrant TP53 tumor variants in residual rectal cancerous regions, *Oncotarget*, 30, 9641-9, 2014, 査読有

Kawai K, Ishihara S, Yamaguchi H, Sunami E, Kitayama J, Miyata H, Watanabe T, Nomogram prediction of metachronous colorectal neoplasms in patients with colorectal cancer, *Annals of Surgery*, 261, 926-32, 2015, 査読有

Doi: 10.1097/SLA.0000000000000881
Kim HJ, Choi GS, Park JS, Park S, Kawai K, Watanabe T, Clinical significance of thrombocytosis before preoperative chemoradiotherapy in rectal cancer: predicting pathologic tumor response and oncologic outcome, *Annals of Surgical Oncology*, 22, 513-9, 2015, 査読有

Doi: 10.1245/s10434-014-3988-8

Murono K, Kazama S, Yamaguchi H, Kawai K, Ishihara S, Sunami E, Kitayama J, Satoh Y, Kurihara M, Yatomi Y, Watanabe T, Detection of carcinoembryonic antigen mRNA in peritoneal lavage by the transcription-reverse transcription concerted method indicates poor prognosis in patients with stage II and III colon cancer, *Surgery*, 157, 322-30, 2015, 査読有

Doi: 10.1016/j.surg.2014.09.015

Murono K, Kawai K, Tsuno NH, Ishihara S, Yamaguchi H, Sunami E, Kitayama J, Watanabe T, Barium enema and CT volumetry for predicting pathologic response to preoperative chemoradiotherapy in rectal cancer patients, *Disease of Colon and Rectum*, 57, 715-24, 2014, 査読有

Doi: 10.1097/DCR.0000000000000070

Ishihara S, Hayama T, Yamada H, Nozawa K, Matsuda K, Miyata H, Yoneyama S, Tanaka T, Tanaka J, Kiyomatsu T, Kawai K, Nozawa H, Kanazawa T, Kazama S, Yamaguchi H, Sunami E, Kitayama J, Hashiguchi Y, Sugihara K, Watanabe T, Prognostic impact of primary tumor resection and lymph node dissection in stage IV colorectal cancer with unresectable metastasis: a propensity score analysis in a multicenter retrospective study, *Annals of Surgical Oncology*, 21, 2949-55, 2014, 査読有

Doi: 10.1245/s10434-014-3719-1

Ozawa T, Kazama S, Akiyoshi T, Murono K, Yoneyama S, Tanaka T, Tanaka J, Kiyomatsu T, Kawai K, Nozawa H, Kanazawa T, Yamaguchi H, Ishihara S, Sunami E, Kitayama J, Morikawa T, Fukayama M, Watanabe T, Nuclear Notch3 expression is associated with tumor recurrence in patients with stage II and III colorectal cancer, *Annals of Surgical Oncology*, 21, 2650-8, 2014, 査読有

Doi: 10.1245/s10434-014-3659-9

Watanabe T, Kobunai T, Akiyoshi T, Matsuda K, Ishihara S, Nozawa K, Prediction of response to preoperative chemoradiotherapy in rectal cancer by using reverse transcriptase polymerase chain reaction analysis of four genes, *Disease of Colon and Rectum*, 57, 23-31, 2014, 査読有

Doi:10.1097/01.dcr.0000437688.33795.9d

〔学会発表〕(計 0 件)

〔図書〕(計 0 件)

〔産業財産権〕

出願状況(計 0 件)

名称:

発明者:

権利者:

種類:

番号:

出願年月日:

国内外の別:

取得状況(計 0 件)

名称:

発明者:

権利者:

種類:

番号:

取得年月日:

国内外の別:

〔その他〕

ホームページ等

6. 研究組織

(1) 研究代表者

渡邊 聡明 (Watanabe Toshiaki)

東京大学・医学部付属病院・教授

研究者番号: 80210920

(2) 研究分担者

佐藤 俊朗 (Sato Toshiro)

慶應義塾大学・医学部・准教授

研究者番号: 70365245

(3) 連携研究者

()

研究者番号: