

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 6 月 2 日現在

機関番号：32612

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2013～2014

課題番号：25860560

研究課題名(和文) 消化器がん幹細胞を標的としたHigh throughput スクリーニング創薬

研究課題名(英文) High-throughput screening for drug discovery targeting gastrointestinal cancer stem cell.

研究代表者

高野 愛 (Takano, Ai)

慶應義塾大学・医学部・研究員

研究者番号：50647584

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)：我々は、患者由来のヒト消化器がんのオルガノイドを樹立した。その結果、大腸がん細胞培養同様、胃、膵臓、胆管、胆嚢がんの計5種類の消化器がん細胞の分離に新たに成功した。各分離されたオルガノイドは基本培養法(Sato T et al. Nat 2009)に基づいて培養条件の最適化を行い、継続的かつ長期的な培養が可能となった。各wellにCell Sorterにより一定数撒いたオルガノイドに対し、Protein Kinase Inhibitor libraryを用いたHigh Throughput スクリーニングシステム(HTS)を確立した。

研究成果の概要(英文)：We obtained cancer tissues from patients with gastrointestinal cancer. Using previously published protocol for colorectal cancer organoids (Sato T. Nature 2009), we have established various kinds of tumor organoids including gastric cancer, pancreatic cancer, bile duct cancer and gallbladder cancer. The established gastrointestinal cancer organoids can be cultured in a 384-well microplate format for High-throughput drug screen system. Image analysis was performed with 364 drugs on tumor organoids using High Contents Analyzer, which is the automated acquisition and analysis of images by object recognition and feature quantitation algorithms. Exploiting gene editing system, we knocked-in LGR5 reporter in colorectal cancer organoids for High-Throughput Screen (HTS). Our results suggest that HTS for tumor organoids will be applicable for genetic mutation based drug discovery and personalized medicine.

研究分野：下部消化管学

キーワード：消化器がん HTS

1. 研究開始当初の背景

切除不能消化器がんは化学療法の進歩により治療成績が向上しているが、依然として本邦のがんの死亡原因の大部分を占め、社会的な問題になっている。近年の研究から、患者腫瘍間の多様性を考慮した個別化治療法の応用が期待されている。

2. 研究の目的

既に関与されている大腸がん3次元組織構造体(オルガノイド)培養(Sato T et al. Nature 2009, Sato T et al. Nature 2011, Jung P, Sato T et al. Nature Medicine 2011, Sato T et al. Gastroenterology 2011)を応用し、患者由来の消化器がん(胃、肝臓、膵臓、胆管、胆嚢がん)のオルガノイド培養確立とそのがん幹細胞可視化、High Throughput 化、Synthetic Lethality に基づく創薬スクリーニングを開発することを目的とし、テーラーメイド治療の基盤研究とすることを目指している。

3. 研究の方法

ヒト消化器がん(食道・胃・大腸・肝臓・胆管・膵臓・胆嚢がん)手術検体または内視鏡生検検体から、正常腸管上皮および大腸癌組織を採取し、オルガノイドを樹立する。樹立した消化器がんオルガノイドは至適培養条件で大量培養を行い 384 well プレートの各 well に均等にオルガノイドを Cell Sorter にて播種し、Protein Kinase Inhibitor (PKI) library を用い、High Throughput スクリーニングを行う。その後、High Contents Analyzer (In Cell analyser 6000) を用い解析を行う。

樹立したオルガノイドに対し、ゲノム編集技術を用いた遺伝子ノックアウト・ノックイン技術の導入を行う。がん幹細胞の可視化お

よび細胞系譜解析のため、がん幹細胞のマーカー遺伝子である LGR5 遺伝子領域に蛍光蛋白ノックインを行う。作製したがん幹細胞可視化消化器癌を用いてがん幹細胞を標的とした治療薬の効果を検討する。

4. 研究成果

我々は、患者由来のヒト消化器がんのオルガノイドを樹立した。その結果、大腸がん細胞培養(Sato T et al. Gastroenterology 2011)同様、胃、膵臓、胆管、胆嚢がんの計5種類の消化器がん細胞の分離に新たに成功した。各分離されたオルガノイドは基本培養プロトコール(Sato T et al. Nature 2009)に基づいて培養条件の最適化を行い、継続的かつ長期的な培養が可能となった。各樹立したヒト消化器がんオルガノイドの 384 well plate 上での培養が可能となった。各 well に Cell Sorter により一定数撒いたオルガノイドに対し、Protein Kinase Inhibitor (PKI) library を用いた High Throughput スクリーニングシステムを確立した。High Contents Analyzer (In Cell Analyzer 6000)を用いて細胞の撮影を行い、生存細胞のエリアおよび細胞の輝度をカウントし、がんオルガノイドに対する薬剤の効果を統計的に処理した。

ヒト消化器がんオルガノイドの幹細胞可視化に関しては、蛍光蛋白レポーターLgr5 遺伝子座位へのノックインに成功し、今後がん幹細胞に特化した High Throughput スクリーニングに発展させることを目標としている。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計3件)

(1) 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. Nat Med. 2015 Mar;21(3):256-62. doi: 10.1038/nm.3802. Epub 2015 Feb 23. 【査読有】

(2) Uto-Konomi A, McKibben B, Wirtz J, Sato Y, Takano A, Nanki T, Suzuki S. CXCR7 agonists inhibit the function of CXCL12 by down-regulation of CXCR4. Biochem Biophys Res Commun. 2013 Feb.22;431(4):772-6. doi: 10.1016/j.bbrc.2013.01.032. Epub 2013 Jan 16. 【査読有】

(3) 伊達昌一, 佐藤俊朗, 下川真理子, 高野愛, 藤井正幸, 股野麻未, 日比紀文 S1-6 ヒト消化管上皮オルガノイドの培養と解析 栄養 - 評価と治療 2013.30(1): 80 -81 URL : <http://mol.medicalonline.jp/library/journal/download?GoodsID=ai1eiyok/2013/s03001/009&name=0080-0081j&Use rID=131.113.183.153> 【査読無】

〔学会発表〕(計4件)

(1) Toshiro Sato, Yuki Ohta, Ai Takano, Shoichi Date, Mamiko Matano, Mariko Shimokawa. The Self-renewing Mechanism of Intestinal Stem Cell: Niche and Cancer, Symposium 2. 47th Annual Meeting of the Japanese Society of Developmental Biologists and Asia Pacific Developmental Biology Network, WINK AICHI, Nagoya, Aichi, 2014. 5.28.

(2) 佐藤俊朗, 南木康作, 藤井正幸, 武下達矢, 中里圭宏, 清野隆史, 高野愛, 股野

麻未, 下川真理子, 伊達昌一, 太田悠木, 金井隆典. ゲノム編集技術による体外における人工的な大腸がんの再構築. 第21回浜名湖シンポジウム. アクトシティ浜松(静岡県浜松市). 2013年12月21日

(3) 22) Toshiro Sato, Ai Takano, Shoichi Date, Mami Matano, Mariko Shimokawa, Takanori Kanai. Molecular mechanism of intestinal carcinogenesis; Stem cells and their niche signals. Symposia 12, Aberrant signal transduction and therapeutic strategy for molecular target. 第72回日本癌学会学術総会. パシフィコ横浜(神奈川県横浜市). 2013年10月3日

(4) 23) Toshiro Sato, Mami Matano, Shoichi Date, Ai Takano, Mariko Shimokawa. Molecular mechanism of intestinal stem cell self-renewal: Stem cells and their niche signals. International Symposium 3. Molecular mechanisms for the growth and differentiation of tissue-specific stem cells in mammals. 第86回日本生化学会大会. パシフィコ横浜(神奈川県横浜市). 2013年9月11日

〔図書〕(計0件)

〔産業財産権〕

出願状況(計0件)

取得状況(計0件)

〔その他〕

なし

6．研究組織

(1)研究代表者

高野 愛 (Ai Takano)

慶應義塾大学・医学部・研究員

研究者番号：50647584