

令和 2 年 6 月 5 日現在

機関番号：13301

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2017～2019

課題番号：17K07161

研究課題名(和文)オルガノイドを用いた胃がん幹細胞の可視化と効果的な治療法の探索

研究課題名(英文) Visualization of cancer-initiating cells and search for an effective treatment using gastric cancer organoids

研究代表者

村上 和弘 (Murakami, Kazuhiro)

金沢大学・がん進展制御研究所・助教

研究者番号：60455368

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,900,000円

研究成果の概要(和文)：本研究では、マウスとヒトの胃がんオルガノイドを用いて、がん幹細胞の同定と悪性化機構の解明を試みた。また、得られた知見よりマウス生体内で胃がんに対する有効な治療法の探索を行った。上皮幹細胞マーカーLGR5遺伝子の発現に着目し解析を進め、LGR5陽性胃がん細胞ががん幹細胞である可能性を示唆する結果を得た。包括的な遺伝子発現解析により、これらの細胞の増殖・維持に関する遺伝子群を明らかにした。胃がんオルガノイドをマウスの胃に同所移植することで、いくつかの遺伝子が実際に胃がん幹細胞の浸潤・転移を制御していることが明らかになった。さらに、胃がん幹細胞を選択的に除去できる薬剤候補を見つけた。

研究成果の学術的意義や社会的意義

胃がんは肺がんと並びがんによる死因の多くを占める。がんの再発と転移の背景には治療抵抗性を持つがん幹細胞の存在が示唆されており、がんの根絶に向けてがん幹細胞の増殖能・分化能を抑制しつつ、がん全体を標的とする治療法の確立が急務となっている。しかし、胃におけるがん幹細胞の正体は明らかになっておらず、そのため悪性度の高い胃がんに対する真に効果的な治療法の確立には至っていない。本研究では、胃がん幹細胞の同定と増殖性・可塑性・分化能を制御する機構の解明を通して、胃がんを根絶する真に効果的な治療法の確立へ貢献する。

研究成果の概要(英文)：Our goal is to establish an effective treatment for gastric cancer. By using newly established mouse and human gastric cancer organoids, we tried to identify cancer-initiating cells and clarify the mechanism which induce their malignancy. Furthermore, based on knowledges, we searched for an effective treatment for gastric cancer in vivo. We proceeded our research with focusing on an epithelial stem cell marker, LGR5 and found that LGR5 positive gastric cancer cells could be the cancer-initiating cell. By a comprehensive gene expression analysis, we found a group of genes which could regulate proliferation and maintenance of cancer-initiating cells. We orthotopically transplanted genetically modified organoids into mouse stomach and found that some genes can regulate the metastatic ability of cancer-initiating cells. Furthermore, we found drug candidates which can selectively eliminate cancer-initiating cells.

研究分野：幹細胞生物学

キーワード：がん幹細胞 胃がん オルガノイド LGR5

1. 研究開始当初の背景

現在、我が国においてがんは死亡率トップの病気であり、中でも胃がんは肺がんと並び、がんによる死因の多くを占めている。この胃がんの治療は、多くの場合胃の切除を伴うため、治療後は食生活を変えざるを得ないなど、その後の生活に与える影響は大きい。さらに、治療後の再発および他臓器への転移が、胃がんを根絶する上で最も大きな問題となっている。これらの背景のもと、胃がんに対する真に効果的な治療法が待ち望まれているが、未だ完全な方策は存在しない。

その原因の一つとして、近年、がんの再発・転移の背景には、がんの親玉ともいえるがん幹細胞が存在することが指摘されている。がん幹細胞は、がん組織中に数%以下という極めて低い割合で存在し、薬剤耐性・放射線耐性を持ちつつ、自ら分裂して周囲のがん細胞を生み出す。このことから、がん根絶に向けてがん幹細胞の増殖能・分化能を抑制しつつ、がん全体を標的とする治療法の確立が急務となっている。しかし、胃におけるがん幹細胞の正体は未だ明らかになっておらず、そのため胃がんに対する真に効果的な治療法の確立には至っていない。

一方、正常な消化管には組織幹細胞が存在し、Wnt シグナルに依存して盛んに増殖・分化を繰り返している。近年、本申請課題の連携研究者 Nick Barker 博士は、Wnt シグナルの標的遺伝子である *Leucine-rich repeat-containing G-protein coupled receptor 5 (LGR5)* 遺伝子が、胃の正常幹細胞に特異的に発現していることを報告した(Barker N *et al.*, *Cell Stem Cell*, 2010)。

LGR5 遺伝子の発現様式は、マウスとヒトの間で種を超えてよく保存されており、ヒトにおいても胃正常幹細胞の指標となることが示唆されている。重要なことに、大腸において *LGR5* 遺伝子は、正常幹細胞のみならず、がん幹細胞でも高発現することが知られているが、同じ消化管がんである胃がんについてはがん幹細胞の存在自体に不明な点が多く、*LGR5* 遺伝子の発現と胃がん幹細胞との関連については未だ詳細な報告はない。

2. 研究の目的

本研究課題においては、*LGR5* 遺伝子の発現に着目し胃がん幹細胞の同定を試みる。さらに生体内の組織構造を模倣できるオルガノイド培養技術を用いて胃がん幹細胞の増殖性・可塑性・分化能を制御する機構を迅速かつ詳細に解析し、それらの知見を元に生体内で胃がんを根絶する真に効果的な治療法を確立することを目的とする。具体的には、以下の点について検証する。

(1) *Lgr5DTR-EGFP* マウスを用いた胃がん幹細胞の可視化と特性の理解

胃特異的にがんを発症する胃がんマウスモデルと、*Lgr5* 遺伝子の発現を可視化できる *Lgr5DTR-EGFP* マウスを交配し、得られたマウスの胃において *LGR5* 陽性がん細胞を可視化する。また、これらの胃がんよりオルガノイドを樹立する。一方で、ヒト胃がん組織よりオルガノイドを樹立し、CRISPR/Cas9 遺伝子編集技術を用いてヒト *LGR5* 遺伝子座に *EGFP* 遺伝子を挿入することで、ヒト胃がんオルガノイドにおいて *LGR5* 陽性胃がん細胞の可視化を試みる。*LGR5* 陽性/陰性の胃がん細胞を単離し、細胞生物学的解析を通して胃がん幹細胞の存在を明らかにする。

(2) 遺伝子編集技術を用いた胃がん幹細胞制御機構の解明

ヒト悪性化胃がんにおいて高発現・高頻度で変異が見られる遺伝子を、*LGR5* 遺伝子の発現を可視化できるマウス/ヒトオルガノイドで発現誘導もしくはノックアウトする。生体外・生体内における機能的な検証を通して、胃がんの再発・転移を司る胃がん幹細胞を制御するメカニズムを明らかにする。

(3) マウス生体を用いた胃がんの効果的な治療法および抗がん剤の探索

生体外実験は、迅速に結果が得られる反面、かならずしも生体内の状況を反映しているとはいえない。そのため、*LGR5* 遺伝子の発現を可視化した胃がんオルガノイドをマウスの生体内に移植し、(1)、(2)で明らかとなる知見をもとに、悪性化を導く機構を標的としてがんの再発・転移を防ぐ新規治療法の探索を行う。さらに、これらの治療法と既存の抗がん剤を組み合わせることで、胃がん全体を撲滅できる効果的な治療法の確立を目指す。

3. 研究の方法

(1) マウス・ヒト胃がん組織よりオルガノイドを樹立し、*LGR5* 遺伝子を可視化することで胃がん幹細胞の存在を明らかにしつつ、その特性を理解する。

胃がん幹細胞の可視化を目的として、胃特異的に *COX-2/PGE2* 遺伝子および *Wnt-1* 遺伝子が発現し、炎症と Wnt パスウェイの亢進を引き起こす結果、胃がんを発症する Gan マウスと *Lgr5* 遺伝子座に *EGFP* 遺伝子が挿入された結果、*Lgr5* 遺伝子の発現を可視化できる *Lgr5DTR-EGFP* マウスを交配し、得られたマウスより胃がんオルガノイドを樹立する。一方、患者から摘出された胃がん組織よりヒト胃がんオルガノイドを樹立し、CRISPR/Cas9 遺伝子編集技術を用いて *LGR5* 遺伝子座の下流に *EGFP* 遺伝子を挿入し、胃がんオルガノイドにおいて *LGR5* 陽性がん細胞を可視化する。オルガノイド中に存在する胃がん幹細胞は、細胞表面に特異的な抗原(CD44/CD133)を発現することが予想されるため、Fluorescence Activated Cell Sorting(FACS)を用いて、CD44/CD133 陽性細胞を単離することで、混入した正常幹細胞を排除しつつがん細胞由来のオルガノイドのみを単離培養する。

コロニー形成アッセイ、浸潤・遊走アッセイ、Real-time PCR や免疫染色などの細胞生物学的解析を通して、*Lgr5* 陽性細胞が胃がん幹細胞である可能性を検証する。FACS を用いて *LGR5* 陽性/陰性がん細胞を回収し、マイクロアレイによる網羅的遺伝子発現解析を行い、*Lgr5* 陽性胃がん

細胞のみで特異的に発現変化する遺伝子群を抽出し、胃がん幹細胞の増殖・維持・分化に関わる候補因子を明らかにする。一方、生体外培養を行ったオルガノイドの遺伝子発現プロファイルが生体内と一致するかどうかを確認するため、胃がんマウスの生体内から直接回収した Lgr5 陽性/陰性細胞の遺伝子発現パターンと比較解析を行う。

(2) 胃がんオルガノイド中で遺伝子改変を行い、細胞生物学的検証を通して胃がん幹細胞の増殖性・可塑性・分化能を制御する機構を解明する。

(1)で得られた Lgr5 陽性/陰性の胃がん細胞の遺伝子発現プロファイルと The Cancer Genome Atlas (TCGA) データベースより抽出したヒト胃がんで高発現する遺伝子群および高頻度に変異が見られる遺伝子群を比較し、胃がん幹細胞の増殖・維持に重要な候補因遺伝子を抽出する。

次に、トランスポゾン由来の配列を持ち転移因子の仲介によって効率良くゲノムに挿入される PiggyBac 発現ベクターおよび CRISPR/Cas9 遺伝子編集技術を用いて、マウス・ヒト胃がんオルガノイドで候補因子の時期特異的強制発現およびノックアウトを行い、オルガノイドにコロニー形成能・増殖能・形態の変化を引き起こす因子を選定する。

続いて、これらの遺伝子改変オルガノイドを用いて、細胞浸潤アッセイやコロニー形成アッセイを行うことでさらに候補因子を絞り込み、最終的にはそれらのオルガノイドを免疫不全マウスの生体内に移植し、胃がんの増殖能・浸潤能・転移能を確認することで、候補因子が胃がん幹細胞の悪性度を制御することを確認する。分子生物学的手法を用いて候補因子の下流調節機構を詳細に解析することで、胃がん幹細胞の増殖・維持・分化を制御する分子機構を明らかにする。

(3) 胃がんオルガノイドをマウスに移植し、生体内において胃がん幹細胞に効果のある治療法の探索を行う。

(2)で明らかになった胃がん幹細胞の増殖能・転移能を制御する機構を標的として、悪性化がんに対する効果的な治療法をマウス生体内において検証する。CRISPR/Cas9 技術を用いて、LGR5 陽性胃がん幹細胞を可視化したヒト胃がんオルガノイドで候補遺伝子に欠損変異を導入し、免疫不全マウスの脾臓もしくは尾静脈に接種する。がん組織の増殖と他臓器への転移頻度を指標に、候補因子の条件的発現および欠損がマウス生体内においてがん幹細胞の増殖能・転移能を制御することを確認する。併せて、既存の抗がん剤との効果的な組み合わせを探索する。これらの実験を通して、がんの増殖・浸潤・転移を抑制しつつ、がん全体を攻撃する新規治療法の確立を目指す。

4. 研究成果

(1) オルガノイドを用いた胃がん幹細胞の可視化と特性の理解

Gan マウスと Lgr5DTR-EGFP マウスを交配し、新規胃がんマウスモデルを作製した。また、得られたマウスより胃がんオルガノイドを樹立した。一方で、患者から摘出された胃がん組織よりヒト胃がんオルガノイドを樹立し、CRISPR/Cas9 遺伝子編集技術を用いて *LGR5* 遺伝子座の下流に *EGFP* 遺伝子を挿入し、*LGR5* 遺伝子の発現を可視化した。胃がん細胞においては、高頻度で Wnt シグナルの活性化が起きていることから、培地に添加する増殖因子を増減させることで正常細胞の混入を避けつつ、胃がんオルガノイドのみを培養することができた (図1)。

次に EGFP の発現状態を指標にして各オルガノイドより LGR5 陽性および陰性の細胞を回収し、細胞生物学的解析を通して、LGR5 陽性細胞が胃がん幹細胞である可能性を示唆する結果を得た。また、RNA シーケンスを用いた網羅的遺伝子発現解析により LGR5 陽性胃がん幹細胞で特異的に発現する遺伝子群を抽出し、胃がん幹細胞の増殖・維持・分化に関わる可能性のあるシグナルパスウェイを明らかにすることができた。これらの遺伝子群は、生体内の胃がん細胞でも同様の発現パターンを示していたことから、オルガノイドが生体内の環境をよく模倣していることを裏付けるデータも得られた。

(2) 遺伝子編集技術を用いた胃がん幹細胞制御機構の解明

胃がん幹細胞の増殖・維持に重要な候補因子を選定するため、TCGA データベースからヒト胃がんで高頻度に欠失・過剰発現が見られる遺伝子を抽出した。悪性化がんは未分化な細胞特性を獲得することが示されているため、特に細胞の未分化性維持に寄与する遺伝子に着目して検証を進めた。ヒト悪性化胃がんで高頻度に発現上昇が見られる因子に関しては cDNA プールよりクローニングし、マウス・ヒト胃がんオルガノイドで強制発現させた。ヒト悪性化胃がんで高頻度に変異や発現量の低下が見られる遺伝子群に関しては、CRISPR/Cas9 遺伝子編集技術を用いたノックアウトもしくは shRNA を用いたノックダウンを行った。続いて、これらの遺伝子改変オルガノ

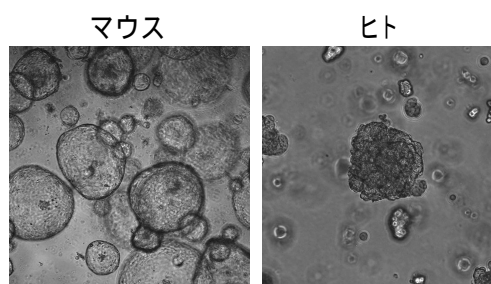


図1 胃がんオルガノイド

イドを用いて、細胞浸潤アッセイやコロニー形成アッセイを行うことで候補因子を絞り込んだ。さらに、それらのオルガノイドを免疫不全マウスの胃に同所移植することで、いくつかの候補因子が生体内で胃癌幹細胞の増殖能や転移能を制御していることを確認した(図2)。今後は、分子生物学的手法を用いて候補因子の下流機構を詳細に解析する。

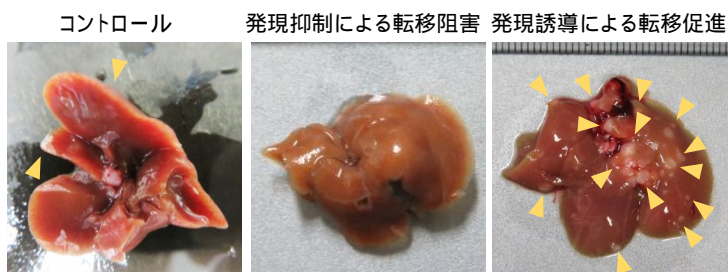


図2 候補因子による肝転移の制御

(3) マウス生体を用いた効果的な治療法および抗がん剤の探索

いくつかの候補因子に関しては、LGR5 遺伝子の発現を可視化したマウス・ヒト胃癌オルガノイドで欠損株が取得できなかった、このことから、これらの候補因子が胃癌幹細胞の維持に必須である可能性が考えられた。ノックアウト株が取得できなかったため、候補因子をノックダウンした胃癌オルガノイドを免疫不全マウスの胃へと同所移植を行った結果、候補因子の発現を抑制することで、胃癌の浸潤・転移が抑制される結果を得た。併せて、これらの移植マウスへ既存の抗がん剤を投与することで、胃癌を劇的に抑制できることも明らかとなった。さらに、得られた候補因子を標的とする薬剤のスクリーニングを行い、LGR5 陽性胃癌幹細胞を選択的に除去できる薬剤候補を見つけることができた。今後は、これらの知見を元に、胃癌の増殖・浸潤・転移を抑制しつつ、がん全体を攻撃できる新規治療法の確立を目指す。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計7件（うち査読付論文 7件/うち国際共著 3件/うちオープンアクセス 4件）

| | |
|---|---------------------------|
| 1. 著者名 Tan Si Hui et al. | 4. 巻 578 |
| 2. 論文標題 AQP5 enriches for stem cells and cancer origins in the distal stomach | 5. 発行年 2020年 |
| 3. 雑誌名 Nature | 6. 最初と最後の頁 437 ~ 443 |
| 掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1038/s41586-020-1973-x | 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 該当する |
| 1. 著者名 Seishima Ryo, Leung Carly, Yada Swathi, Murad Katzrin Bte Ahmed, Tan Liang Thing, Hajamohideen Amin, Tan Si Hui, Itoh Hideki, Murakami Kazuhiro, Ishida Yoshihiro, Nakamizo Satoshi, Yoshikawa Yusuke, Wong Esther, Barker Nick | 4. 巻 10 |
| 2. 論文標題 Neonatal Wnt-dependent Lgr5 positive stem cells are essential for uterine gland development | 5. 発行年 2019年 |
| 3. 雑誌名 Nature Communications | 6. 最初と最後の頁 1 ~ 17 |
| 掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1038/s41467-019-13363-3 | 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 該当する |
| 1. 著者名 Liu, Junker, Murakami, Hu | 4. 巻 8 |
| 2. 論文標題 Automated Counting of Cancer Cells by Ensembling Deep Features | 5. 発行年 2019年 |
| 3. 雑誌名 Cells | 6. 最初と最後の頁 1019 ~ 1019 |
| 掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3390/cells8091019 | 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 Jangphattananont Nawaphat, Sato Hiroki, Imamura Ryu, Sakai Katsuya, Terakado Yumi, Murakami Kazuhiro, Barker Nick, Oshima Hiroko, Oshima Masanobu, Takagi Junichi, Kato Yukinari, Yano Seiji, Matsumoto Kunio | 4. 巻 20 |
| 2. 論文標題 Distinct Localization of Mature HGF from its Precursor Form in Developing and Repairing the Stomach | 5. 発行年 2019年 |
| 3. 雑誌名 International Journal of Molecular Sciences | 6. 最初と最後の頁 2955 ~ 2955 |
| 掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3390/ijms20122955 | 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 Leushacke Marc, Tan Si Hui, Wong Angeline, Swathi Yada, Hajamohideen Amin, Tan Liang Thing, Goh Jasmine, Wong Esther, Denil Simon L. I. J., Murakami Kazuhiro, Barker Nick | 4. 巻 19 |
| 2. 論文標題 Lgr5-expressing chief cells drive epithelial regeneration and cancer in the oxyntic stomach | 5. 発行年 2017年 |
| 3. 雑誌名 Nature Cell Biology | 6. 最初と最後の頁 774 ~ 786 |
| 掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1038/ncb3541 | 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 該当する |

| | |
|--|-------------------------|
| 1. 著者名 Han TS, Voon DC, Oshima H, Nakayama M, Echizen K, Sakai E, Yong ZWE, Murakami K, Yu L, Minamoto T, Ock CY, Jenkins BJ, Kim SJ, Yang HK, Oshima M | 4. 巻 156 |
| 2. 論文標題 Interleukin 1 Up-regulates MicroRNA 135b to Promote Inflammation-Associated Gastric Carcinogenesis in Mice. | 5. 発行年 2018年 |
| 3. 雑誌名 Interleukin 1 Up-regulates MicroRNA 135b to Promote Inflammation-Associated Gastric Carcinogenesis in Mice | 6. 最初と最後の頁 1140-1155 |
| 掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1053/j.gastro.2018.11.059 | 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 Oshima H, Kok SY, Nakayama M, Murakami K, Voon DC, Kimura T, Oshima M | 4. 巻 33 |
| 2. 論文標題 Stat3 is indispensable for damage-induced crypt regeneration but not for Wnt-driven intestinal tumorigenesis. | 5. 発行年 2018年 |
| 3. 雑誌名 FASEB J. | 6. 最初と最後の頁 1873-1886 |
| 掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1096/fj.201801176R | 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5件(うち招待講演 0件/うち国際学会 1件)

| |
|--|
| 1. 発表者名 村上 和弘, 寺門 侑美, Nick Barker |
| 2. 発表標題 Analysis of mechanisms which regulate the tumor malignancy in LGR5 expressing gastric cancer cells. |
| 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 村上 和弘, 寺門 侑美, Nick Barker |
| 2. 発表標題 炎症を伴った胃癌において幹細胞性を導く機構の解析 |
| 3. 学会等名 第77回 日本癌学会学術総会 |
| 4. 発表年 2018年 |

| |
|--|
| 1. 発表者名 寺門 侑美, 村上 和弘, 大島 正伸, 大島 浩子, Nick Barker |
| 2. 発表標題 胃癌幹細胞の検討とその制御機構 |
| 3. 学会等名 第77回 日本癌学会学術総会 |
| 4. 発表年 2018年 |

| |
|--|
| 1. 発表者名 Kazuhiro Murakami, Yumi Terakado, Nick Barker |
| 2. 発表標題 Analysis of the mechanism which defines gastrointestinal stemness and its relation to the tumorigenic process |
| 3. 学会等名 the SGCC 10th annual meeting (国際学会) |
| 4. 発表年 2017年 |

| |
|--|
| 1. 発表者名 Kazuhiro Murakami, Yumi Terakado, Nick Barker |
| 2. 発表標題 Analysis of an origin of gastric cancer cells in inflammation-driven tumor organoid |
| 3. 学会等名 The 76th JCA annual meeting |
| 4. 発表年 2017年 |

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

がんの起源となるヒト胃組織幹細胞の特定に世界で初めて成功!
<https://www.kanazawa-u.ac.jp/rd/75854>

新生児期の子宮に存在するWnt依存性のLgr5陽性幹細胞は子宮腺の発生に必須である
http://ganken.cri.kanazawa-u.ac.jp/wp-content/uploads/2019/11/20191129_Murakami_NatureCommunications-1.pdf

傷の修復と発がんは紙一重?
<http://ganken.cri.kanazawa-u.ac.jp/wp-content/uploads/2017/06/20170605.pdf>

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 |
|-------|--|---|----|
| 連携研究者 | バーカー ニコラス (Barker Nicholas) (30787651) | 金沢大学・がん進展制御研究所・リサーチプロフェッサー (13301) | |
| 連携研究者 | 大島 正伸 (Oshima Masanobu) (40324610) | 金沢大学・がん進展制御研究所・教授 (13301) | |