慶應義塾大学学術情報リポジトリ
Keio Associated Repository of Academic resouces

Title	Deep phenotyping of human colorectal cancer evolution using adult stem cell organoids and CRISPR-Cas9 technology
Sub Title	
Author	藤井, 正幸(Fujii, Masayuki)
Publisher	
Publication year	2023
Jtitle	科学研究費補助金研究成果報告書 (2022.)
JaLC DOI	
Abstract	大腸がんは依然として本邦におけるがん死の主たる原因の一つであり、社会に大きな影を落としている。本研究では、大腸がんの進行、特に難治性や致死性を規定する転移および抗がん剤耐性に焦点をあて、これらを司るメカニズムを追求した。組織幹細胞培養技術であるオルガノイド培養法を用いて患者腫瘍を培養し、遺伝子スクリーニングによって肝転移を促進する遺伝子を同定した。また、異種移植組織のライブイメージング技術を開拓し、休眠がん幹細胞の覚醒が化学療法後の腫瘍再燃に寄与することを明らかにした。本研究を通じて得られた知見は、大腸がんの生物学的理解の深化、および今後の治療応用につながることが期待される。 Colorectal cancer remains the main cause of cancer-related death in Japan, casting a substantive shadow on the society. This project investigated the progression of colorectal cancer with a particular focus on mechanisms of metastasis and drug resistance that define refractory and lethal cancer. Using the organoid culture system which enables expansion of somatic stem cells, we cultured patient-derived tumors and identified genes that facilitate liver metastasis via genetic screening. Using live-imaging of xenograft tumors, we further found that the awakening of dormant cancer stem cells contribute to tumor relapse after chemotherapy. Insights obtained from this research will contribute to deeper understanding of colorectal cancer biology and the future development of novel therapeutic strategies.
Notes	研究種目：基盤研究 (B) (一般) 研究期間：2020～2022 課題番号：20H03757 研究分野：がん生物学
Genre	Research Paper
URL	https://koara.lib.keio.ac.jp/xoonips/modules/xoonips/detail.php?koara_id=KAKEN_20H03757seika

慶應義塾大学学術情報リポジトリ(KOARA)に掲載されているコンテンツの著作権は、それぞれの著作者、学会または出版社/発行者に帰属し、その権利は著作権法によって保護されています。引用にあたっては、著作権法を遵守してご利用ください。

The copyrights of content available on the KeiO Associated Repository of Academic resources (KOARA) belong to the respective authors, academic societies, or publishers/issuers, and these rights are protected by the Japanese Copyright Act. When quoting the content, please follow the Japanese copyright act.

様　式　Ｃ－１９、Ｆ－１９－１、Ｚ－１９　（共通）

科学研究費助成事業　　研究成果報告書

令和　５ 年　 ６ 月　 ３ 日現在

機関番号：３２６１２
研究種目：基盤研究(B)（一般）
研究期間：2020～2022
課題番号：２０Ｈ０３７５７

研究課題名（和文）Deep phenotyping of human colorectal cancer evolution using adult stem cell organoids and CRISPR-Cas9 technology

研究課題名（英文）Deep phenotyping of human colorectal cancer evolution using adult stem cell organoids and CRISPR-Cas9 technology

研究代表者

藤井　正幸（Fujii, Masayuki）

慶應義塾大学・医学部（信濃町）・講師

研究者番号：００８６７５７５

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費）　　13,700,000円

研究成果の概要（和文）：大腸がんは依然として本邦におけるがん死の主たる原因の一つであり、社会に大きな影を落としている。本研究では、大腸がんの進行、特に難治性や致死性を規定する転移および抗がん剤耐性に焦点をあて、これらを司るメカニズムを追求した。組織幹細胞培養技術であるオルガノイド培養法を用いて患者腫瘍を培養し、遺伝子スクリーニングによって肝転移を促進する遺伝子を同定した。また、異種移植組織のライブイメージング技術を開拓し、休眠がん幹細胞の覚醒が化学療法後の腫瘍再燃に寄与することを明らかにした。本研究を通じて得られた知見は、大腸がんの生物学的理解の深化、および今後の治療応用につながることが期待される。

研究成果の学術的意義や社会的意義
がんは進行や治療に伴い、転移や治療抵抗性をはじめとした様々な能力を獲得し、最終的には致死的な病に至る。これらのメカニズムを理解することはがんの予後改善につながることが期待される一方で、その多くは未だ明らかになっていない。本研究では大腸がんをモデルとし、転移および抗がん剤耐性のメカニズムの一端を明らかにした。本研究で得られた知見は大腸がんの悪性化メカニズムの深い理解につながるとともに、今後の新規治療法の開拓の一助となることが期待される。

研究成果の概要（英文）：Colorectal cancer remains the main cause of cancer-related death in Japan, casting a substantive shadow on the society. This project investigated the progression of colorectal cancer with a particular focus on mechanisms of metastasis and drug resistance that define refractory and lethal cancer. Using the organoid culture system which enables expansion of somatic stem cells, we cultured patient-derived tumors and identified genes that facilitate liver metastasis via genetic screening. Using live-imaging of xenograft tumors, we further found that the awakening of dormant cancer stem cells contribute to tumor relapse after chemotherapy. Insights obtained from this research will contribute to deeper understanding of colorectal cancer biology and the future development of novel therapeutic strategies.

研究分野：がん生物学

キーワード：がん　オルガノイド　浸潤　転移　遺伝子スクリーニング

※科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属します。

様　式　Ｃ－１９、Ｆ－１９－１、Ｚ－１９（共通）

１．研究開始当初の背景

大腸がんは本邦におけるがん死の主たる原因の一つであり、その生物学や病態のより深い理解および新規治療法の開発は喫緊の課題となっている。昨今の核酸シーケンス技術の開拓に代表される解析技術や大規模データ処理手法の発展に伴い、大腸がんをはじめとしたヒト腫瘍に蓄積する遺伝子異常の大部分は明らかになりつつある。しかし、がんの難治性や致死性を司る浸潤、転移、治療抵抗性などのメカニズムの深層は依然として不明な点が多い。その原因として、生体内におけるこれらの形質の再構築、操作、観察を可能にするモデル系の欠如が挙げられる。近年、ヒト組織幹細胞におけるニッチ構築の理解に基づき、ヒト組織幹細胞の三次元培養技術であるオルガノイド培養が実現した。オルガノイドは由来組織の形質や構造を忠実に再構築し、CRISPR-Cas9 を用いた遺伝子編集等の摂動も受容する。オルガノイド技術を患者由来腫瘍に応用し、CRISPR スクリーニング等の摂動系技術を援用することで前方視的な機能探索が可能となり、浸潤や転移等のダイナミックな解析に基づいた大腸がん生物学のより深い理解につながると考えられた。

２．研究の目的

大腸がんが臨床的および腫瘍学的な進行に伴い獲得する浸潤、転移や化学療法耐性等の悪性形質を制御する分子メカニズムの多くは明らかになっていない。本研究では、特にがんの難治性、致死性を規定する転移能および化学療法耐性に焦点をあて、これらの表現系を駆動する分子生物学的異常を同定を目指した。生体組織との類似性や臨床還元性を担保するため、臨床がん組織の形質を再構築する患者由来オルガノイドをがんモデルとして選択した。患者由来オルガノイドおよび CRISPR ノックアウトやライブイメージング等の先進技術を駆使し、転移および化学療法耐性の分子基盤を理解することで、がん生物学のより深い理解および転移プロセスや耐性メカニズムを標的とした新規治療戦略の創出に貢献する。

３．研究の方法

(1) 患者由来大腸オルガノイドを用いた CRISPR ノックアウトスクリーニング技術の開発

転移等のがん表現系に関わる遺伝子群を抽出する実験系として、患者由来大腸オルガノイドを対象とした CRISPR ノックアウトスクリーニング基盤を構築した。実験系として、Cas9 発現ウイルスおよび sgRNA 発現レンチウイルスのオルガノイドへの共感染を用いた。パイロット実験として、少数の IL-17A シグナル遺伝子を標的としたノックアウトスクリーニング系を立ち上げ、ヒト正常大腸オルガノイドを用いてその有用性を実証した（Nanki, Fujii, et al. Nature 2020）。本システムのスケールを拡大し、大腸がん研究に応用するため、まず大腸がんで有意に変異が蓄積するドライバー遺伝子群から生物学的意義が確立してしない遺伝子を選出し、それらを標的としたノックアウトライブラリ（10 遺伝子、非標的コントロール配列含め 48 sgRNA）を作成した。単一遺伝子のノックアウトとなるように、感染多重性（multiplicity of infection）は 0.3 に設定した。遺伝子ノックアウトのオルガノイド増殖に対する正あるいは負の影響は、多クローンからなるオルガノイド集団のゲノム DNA より導入 sgRNA 配列を PCR によって増幅し、ディープシーケンスにおけるターゲット配列のリード数の多寡より判定した。(2)に記載するように、ライブラリを感染させたオルガノイドは培養を通してライブラリの多様性を維持しており、以降の異種移植を用いた転移アッセイにおいても活用できることが示された。

(2) CRISPR ライブラリを用いた大腸がん転移ドライバーの探索

大腸がん肝転移ドライバーを探索するため、非転移性オルガノイドを対象としたノックアウトスクリーニングを実施した。具体的には、ヒト正常大腸上皮に APC, KRAS, TP53, SMAD4 遺伝子変異を導入し作成した遺伝子編集オルガノイド（AKTS オルガノイド）および大腸腺腫オルガノイドに TP53, SMAD4 遺伝子を導入した腺腫オルガノイド（Matano et al. Nature Medicine 2015）はいずれも脾臓への移植を用いた肝転移モデルにおいて顕在性転移を示さず、これら非転移性オルガノイドを対象として、大腸がんドライバーノックアウトライブラリを感染させた。培養中は sgRNA の多様性が担保されていることを確認した上で、脾臓への移植を実施した。2ヶ月後に肝臓を観察したところ、顕在性肝転移巣の有意な増加が確認された。転移巣のクローン解析のため、それぞれの肝転移巣を核出した上でオルガノイド再培養を行い、ゲノム DNA 中の sgRNA 配列の解析を行った。AKTS および腺腫オルガノイドにおいて複数の遺伝子が転移巣において選択されていたが、双方に重複するものは 2 遺伝子のみであった。単一遺伝子のノックアウト検証を行い、そのうち一つの遺伝子のみ有意に転移能を向上させることを見出した。この遺伝子変異の大腸がんにおける生物学的意義は確立しておらず、現在機能解析を進めており、論文投稿準備中である。

(3)大腸がんの化学療法後再燃メカニズムの理解

大腸がんをはじめとした固形がんは、化学療法後に一旦の奏功をみても再増大あるいは再燃するのが必定である。この原因は化学療法耐性を有するがん幹細胞が治療後も残存し、腫瘍形成を駆動するためと考えられているが、このプロセスを実際に観察した研究はない。本研究項目では、

がんを難治に至らしめる化学療法耐性および治療後再燃のメカニズムについて、大腸がん幹細胞、特に休眠がん幹細胞に着目し、多光子顕微鏡によるライブイメージングおよび遺伝子編集による可視化を通じたがん幹細胞のダイナミクス解析を行った。大腸がん幹細胞の可視化には LGR5 レポーター（Shimokawa et al. Nature 2017）、休眠細胞の可視化には p27 レポーターを用いた。これらレポーターを用いた仮想的な単一クローントレーシングを実施し、定常状態では休眠がん幹細胞はほとんど増殖を示さないものの、化学療法への曝露を契機として増殖を開始し、腫瘍再増殖に貢献することを観察した。がん幹細胞の休眠性を制御する分子メカニズムを追求するため、レポーター蛍光を用いたソーティングおよび RNA シーケンスによるトランスクリプトーム解析を実施した。その結果、休眠大腸がん幹細胞には COL17A1 をはじめとしたヘミデスモソーム関連遺伝子の発現上昇を認め、COL17A1 ノックアウトにより p27 陽性休眠細胞が消失することから、COL17A1 を介在した基底膜への細胞接着が休眠性を制御していると考えられた。一方で化学療法はマトリクスメタロプロテアーゼを上昇させ、COL17A1 消失を介し休眠からの覚醒を促した。化学療法前後のトランスクリプトームの比較検討から、その下流メカニズムとして、YAP シグナルの活性化を同定した。COL17A1 ノックアウトは YAP の活性化を通じて休眠がん幹細胞の分裂を駆動する一方、薬剤あるいは遺伝子ノックダウンによる YAP 不活化は化学療法後の腫瘍再増殖を有意に抑制した。これらの結果から、細胞外マトリクスとの界面が大腸がん幹細胞の休眠性を制御しており、化学療法によるその破綻は休眠がん幹細胞の覚醒を通じて腫瘍再増殖に寄与することが示された。

４．研究成果

大規模シーケンス解析によって遺伝子変異解析が実施された悪性腫瘍の症例数はゆうに 10 万を超える。また、原発巣と転移巣の比較において、転移巣に有意に高頻度で蓄積する遺伝子変異が同定された。しかしながら、機能解析において単一の遺伝子変異で転移能の向上を確認した報告はない。本研究で同定された遺伝子は実際の臨床腫瘍で変異が認められることから、腫瘍の転移可能性や予後を予測するバイオマーカーとなることが期待される。また、生物学的観点からもがん細胞の血中への散布、遠隔臓器でのトラッピング、生着および以降の腫瘍増殖から構成される転移プロセスを制御する分子メカニズムの深い理解へとつながり、ひいてはこれらプロセスや分子を標的とした新規治療戦略の創出が期待される。

また、基底膜シグナルを起点としたがん幹細胞の休眠性制御の発見により、がん幹細胞は休眠性（ドーマンシー）および化学療法耐性を呈し、腫瘍再発や再燃に寄与するという従来のドグマが明示的に実証された。がんの化学療法耐性や再燃は他のがん腫にも備わる普遍的なメカニズムであり、今回大腸がんで得られた知見の幅広い応用が期待される。また、従来の化学療法は DNA 合成や紡錘体等、細胞周期や分裂機構を主に標的としており、休眠がん幹細胞は本質的に抵抗性を示す。本研究で見出した休眠制御シグナルの下流シグナルである YAP パスウェイをターゲットとすることで、休眠がん幹細胞の覚醒を阻害することで腫瘍再増殖を抑制するという、従来の化学療法とは全く異なるコンセプトのがん治療が開拓される。本研究成果は Ohta, Fujii, et al. Nature 2022 に掲載された。

本研究で得られた以上の知見を応用、発展させることで、従来の細胞毒性化学療法、分子標的治療に加えて転移プロセスや化学療法後の休眠がん幹細胞覚醒を標的とした新しいがん治療の地平が開かれることが期待される。

５．主な発表論文等

〔雑誌論文〕　計12件（うち査読付論文　11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 Ebisudani Toshiki、Sugimoto Shinya、Haga Kei、Mitsuishi Akifumi、Takai-Todaka Reiko、Fujii Masayuki、Toshimitsu Kohta、Hamamoto Junko、Sugihara Kai、Hishida Tomoyuki、Asamura Hisao、Fukunaga Koichi、Yasuda Hiroyuki、Katayama Kazuhiko、Sato Toshiro	４．巻 35
２．論文標題 Direct derivation of human alveolospheres for SARS-CoV-2 infection modeling and drug screening	５．発行年 2021年
３．雑誌名 Cell Reports	６．最初と最後の頁 109218～109218
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.celrep.2021.109218	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 Toshimitsu Kohta、Takano Ai、Fujii Masayuki、Togasaki Kazuhiro、Matano Mami、Takahashi Sirirat、Kanai Takanori、Sato Toshiro	４．巻 -
２．論文標題 Organoid screening reveals epigenetic vulnerabilities in human colorectal cancer	５．発行年 2022年
３．雑誌名 Nature Chemical Biology	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） 10.1038/s41589-022-00984-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 －

１．著者名 Sugimoto Shinya、Kobayashi Eiji、Fujii Masayuki、Ohta Yuki、Arai Kazuya、Matano Mami、Ishikawa Keiko、Miyamoto Kentaro、Toshimitsu Kohta、Takahashi Sirirat、Nanki Kosaku、Hakamata Yoji、Kanai Takanori、Sato Toshiro	４．巻 592
２．論文標題 An organoid-based organ-repurposing approach to treat short bowel syndrome	５．発行年 2021年
３．雑誌名 Nature	６．最初と最後の頁 99-104
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1038/s41586-021-03247-2	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 Togasaki Kazuhiro、Sugimoto Shinya、Ohta Yuki、Nanki Kosaku、Matano Mami、Takahashi Sirirat、Fujii Masayuki、Kanai Takanori、Sato Toshiro	４．巻 160
２．論文標題 Wnt Signaling Shapes the Histologic Variation in Diffuse Gastric Cancer	５．発行年 2021年
３．雑誌名 Gastroenterology	６．最初と最後の頁 823～830
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1053/j.gastro.2020.10.047	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 Kawasaki Kenta、Toshimitsu Kohta、Matano Mami、Fujita Masashi、Fujii Masayuki、Togasaki Kazuhiro、Ebisudani Toshiki、Shimokawa Mariko、Takano Ai、Takahashi Sirirat、Ohta Yuki、Nanki Kosaku、et al.	4．巻 183
2．論文標題 An Organoid Biobank of Neuroendocrine Neoplasms Enables Genotype-Phenotype Mapping	5．発行年 2020年
3．雑誌名 Cell	6．最初と最後の頁 1420～1435.e21
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.cell.2020.10.023	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 Fujii Masayuki、Sugimoto Shinya、Sato Toshiro	4．巻 26
2．論文標題 Linking human intestinal scaffolds and organoids to combat intestinal failure	5．発行年 2020年
3．雑誌名 Nature Medicine	6．最初と最後の頁 1517～1518
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1038/s41591-020-1096-9	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 Fujii Masayuki、Sato Toshiro	4．巻 20
2．論文標題 Somatic cell-derived organoids as prototypes of human epithelial tissues and diseases	5．発行年 2020年
3．雑誌名 Nature Materials	6．最初と最後の頁 156～169
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1038/s41563-020-0754-0	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 Sugimoto Shinya、Fujii Masayuki、Sato Toshiro	4．巻 2171
2．論文標題 Organoid Derivation and Orthotopic Xenotransplantation for Studying Human Intestinal Stem Cell Dynamics	5．発行年 2020年
3．雑誌名 Methods in Molecular Biology	6．最初と最後の頁 303～320
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1007/978-1-0716-0747-3_21	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 Sato Taku、Ishikawa Shun、Asano Jumpei、Yamamoto Hirona、Fujii Masayuki、Sato Toshiro、Yamamoto Kouhei、Kitagaki Keisuke、Akashi Takumi、Okamoto Ryuichi、Ohteki Toshiaki	4．巻 22
2．論文標題 Regulated IFN signalling preserves the stemness of intestinal stem cells by restricting differentiation into secretory-cell lineages	5．発行年 2020年
3．雑誌名 Nature Cell Biology	6．最初と最後の頁 919～926
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1038/s41556-020-0545-5	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 Ebisudani Toshiki、Hamamoto Junko、et al.	4．巻 42
2．論文標題 Genotype-phenotype mapping of a patient-derived lung cancer organoid biobank identifies NKX2-1-defined Wnt dependency in lung adenocarcinoma	5．発行年 2023年
3．雑誌名 Cell Reports	6．最初と最後の頁 112212～112212
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.celrep.2023.112212	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 Ishikawa Keiko、Sugimoto Shinya、Oda Mayumi、Fujii Masayuki、Takahashi Sirirat、Ohta Yuki、Takano Ai、Ishimaru Kazuhiro、Matano Mami、Yoshida Kosuke、Hanyu Hikaru、Toshimitsu Kohta、Sawada Kazuaki、Shimokawa Mariko、Saito Megumu、Kawasaki Kenta、Ishii Ryota、Taniguchi Koji、Imamura Takeshi、Kanai Takanori、Sato Toshiro	4．巻 163
2．論文標題 Identification of Quiescent LGR5+ Stem Cells in the Human Colon	5．発行年 2022年
3．雑誌名 Gastroenterology	6．最初と最後の頁 1391～1406.e24
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1053/j.gastro.2022.07.081	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 Ohta Yuki、Fujii Masayuki、Takahashi Sirirat、Takano Ai、Nanki Kosaku、Matano Mami、Hanyu Hikaru、Saito Megumu、Shimokawa Mariko、Nishikori Shingo、Hatano Yoshiko、Ishii Ryota、Sawada Kazuaki、Machinaga Akihito、Ikeda Wataru、Imamura Takeshi、Sato Toshiro	4．巻 608
2．論文標題 Cell?matrix interface regulates dormancy in human colon cancer stem cells	5．発行年 2022年
3．雑誌名 Nature	6．最初と最後の頁 784～794
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1038/s41586-022-05043-y	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2件（うち招待講演　2件／うち国際学会　2件）

1．発表者名 藤井正幸，佐藤俊朗
2．発表標題 Microenvironmental regulation of somatic evolution and tumorigenesis
3．学会等名 第79回日本癌学会学術総会（招待講演）（国際学会）
4．発表年 2020年

1．発表者名 藤井正幸
2．発表標題 Tumor environment drives epigenetic reprogramming of human pancreatic cancer
3．学会等名 第81回日本癌学会学術総会（招待講演）（国際学会）
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