Title	エピゲノム解析による胃がん発生機序の解明と新規治療開発
Sub Title	Elucidation of mechanisms underlying gastric cancer development by epigenetic analysis.
Author	股野, 麻未(Matano, Mami) 南木, 康作(Nanki, Kosaku) 佐藤, 俊朗(Sato, Toshiro)
Publisher	
Publication year	2023
Jtitle	科学研究費補助金研究成果報告書 (2022.)
JaLC DOI	
Abstract	胃がんにおいて，エピジェネティックな発がん機序が注目されているが，詳細な分子基盤の解明は十分ではない．本研究ではオルガノイドを用いて悪性化に寄与するエピゲノム変化の解明と標的治療開発を目指した． 胃がんオルガノイドライブラリーの網羅的エピゲノム解析の結果，腸管に特徴的な転写因子の活性喪失と，異なる転写因子の活性が特徴的なサブタイプが存在することがわかった．このサブタイプは特に予後不良であった．これらの標的治療を探るため，エピゲノム制御タンパクを標的としたノックアウトスクリーニングを施行した．今後はこのサブタイプに特異的に治療標的となりうるタンパクを絞り込み，治療開発を目指す． Recently, epigenetic mechanisms underlying gastric cancer development are highlighted. However, detailed molecular basis has not been fully elucidated. In this study, we aimed to reveal epigenetic mechanisms that contribute to malignant transformation and develop targeted therapies using organoid technology. Comprehensive epigenetic analysis of a gastric cancer organoid library revealed that there is a subtype characterized by loss of activity of transcription factors characteristic of intestinal tracts and gain of activity of different types of transcription factors. This subtype had a particularly poor prognosis. To explore targeted therapies for this subtype, we conducted CRISPR-based knockout screening targeting epigenetic regulatory proteins. We are currently trying to identify proteins that can be targeted specifically to this subtype for therapeutic development.
Notes	研究種目 : 基盤研究 (C) (一般) 研究期間 : 2020～2022 課題番号 : 20K08340 研究分野 : 消化器内科学
Genre	Research Paper
URL	https://koara.lib.keio.ac.jp/xoonips/modules/xoonips/detail.php?koara_id=KAKEN_20K08340seika

1版

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

科研費
KAKENHI

令和　５年　５月２２日現在

機関番号：３２６１２

研究種目：基盤研究(C)（一般）

研究期間：2020～2022

課題番号：２０Ｋ０８３４０

研究課題名（和文）エピゲノム解析による胃がん発生機序の解明と新規治療開発

研究課題名（英文）Elucidation of mechanisms underlying gastric cancer development by epigenetic analysis.

研究代表者

股野　麻未（Matano, Mami）

慶應義塾大学・医学部（信濃町）・特任助教

研究者番号：２０４３９８８９

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費）　　3,300,000円

研究成果の概要（和文）：胃がんにおいて，エピジェネティックな発がん機序が注目されているが，詳細な分子基盤の解明は十分ではない．本研究ではオルガノイドを用いて悪性化に寄与するエピゲノム変化の解明と標的治療開発を目指した．
胃がんオルガノイドライブラリーの網羅的エピゲノム解析の結果，腸管に特徴的な転写因子の活性喪失と，異なる転写因子の活性が特徴的なサブタイプが存在することがわかった．このサブタイプは特に予後不良であった．
これらの標的治療を探るため，エピゲノム制御タンパクを標的としたノックアウトスクリーニングを施行した．
今後はこのサブタイプに特異的に治療標的となりうるタンパクを絞り込み，治療開発を目指す．

研究成果の学術的意義や社会的意義
本研究は，胃がんのエピゲノム異常という観点から新たな治療標的の可能性を探る研究である．胃がん発症・悪性化に関与する環境因子や分子遺伝学的変化を理解し，前がん病変を防ぐ予防医学や，がんの悪性化機構を阻害する新しい治療戦略の開発が期待される．
また本研究は，ヒト細胞を用いたエピゲノム異常による腫瘍進行の機序解明を図る技術基盤となりうるとともに，臨床疾患サンプルの純度，精度の高いエピジェネティクスデータとして，貴重なリソースとなり，臨床・研究・産業に与える影響は大きいと考えられる．

研究成果の概要（英文）：Recently, epigenetic mechanisms underlying gastric cancer development are highlighted. However, detailed molecular basis has not been fully elucidated. In this study, we aimed to reveal epigenetic mechanisms that contribute to malignant transformation and develop targeted therapies using organoid technology.
Comprehensive epigenetic analysis of a gastric cancer organoid library revealed that there is a subtype characterized by loss of activity of transcription factors characteristic of intestinal tracts and gain of activity of different types of transcription factors. This subtype had a particularly poor prognosis. To explore targeted therapies for this subtype, we conducted CRISPR-based knockout screening targeting epigenetic regulatory proteins. We are currently trying to identify proteins that can be targeted specifically to this subtype for therapeutic development.

研究分野：消化器内科学

キーワード：胃がん　オルガノイド　エピゲノム　CRISPR-Cas9

１．研究開始当初の背景

胃がんは臨床医学的に多様で不均一性の高いがん腫であるが，その病態理解および治療開発のため，分子遺伝学的解析が進められてきた．2014 年には The Cancer Genome Atlas（TCGA） のプロジェクトとして胃がんの包括的な解析により，ゲノム異常の観点から分子生物学的な分類が提唱され，その理解が深まっている (TCGA. Nature 2014)．一方で，ゲノム変化によらないエピジェネティックな発がん機序が注目されている．胃粘膜はヘリコバクター・ピロリ感染による慢性的な炎症状態の持続によって，胃の形質を失い小腸や大腸に近い病理組織像，分子遺伝学的性質を獲得する"腸上皮化生"を示す．腸上皮化生にドライバー遺伝子変異が加わると，これを母地として胃がんが発生すると考えられている (Correa et al. Cancer Res 1992)．このような"化生"は，組織固有の細胞系列特性を規定する転写因子ネットワークの変動によって生じると考えられている．しかしヒトのサンプルを用いた適切な実験系の欠如のため，その発生機序の詳細な分子基盤の解明は十分ではない．

オルガノイド培養法は，消化器上皮細胞を体外で永続的に維持することを可能とした培養技術である．消化器組織幹細胞は，間質細胞から分泌される増殖因子など周囲に構成される幹細胞ニッチによって維持され，自己複製能および多分化能という幹細胞としての機能を果たしている．この幹細胞ニッチを in vitro で再現することにより，消化器上皮細胞を体外で永続的に培養する，オルガノイド培養法が確立された(Sato et al. Nature 2009, Gastroenterology 2011)．オルガノイドは正常上皮細胞のみならず，腫瘍組織からも構築可能であり，腫瘍由来オルガノイドの包括的なオミックス解析から，患者体内での分子遺伝学的性質は，オルガノイド培養細胞でも保持されることが示された （Fujii et al. Cell Stem Cell 2016, Seino et al. Cell Stem Cell 2018, Nanki et al. Cell 2018）．

我々は 37 検体の多様な胃がんオルガノイドライブラリーを構築し，分子遺伝学的データの取得，細胞増殖に必要なニッチ依存性の評価，ゲノム編集技術と組み合わせた機能的解析を行った (Nanki et al. Cell 2018)．そして胃がんが Wnt / R-spondin ニッチシグナルへの非依存性を，APC 遺伝子変異，CDH1/TP53 二重変異，RNF43/ZNRF3 二重変異などの多彩な機構により獲得し，悪性化を辿ることを突き止めた．しかし，その他のニッチ非依存性の獲得や，CDH1/TP53 といったドライバー変異以外の発がん機序について，ゲノム異常で説明できない不明な点が多いこともわかった．

そこで本研究では胃がんにおいて，従来のゲノム異常による疾患形成理解に加えて，エピゲノム変化をベースとした細胞系列特性の変容・喪失という疾患修飾の重要性に着目した．

２．研究の目的

本研究では胃正常，腸上皮化生，悪性度の異なる多数のがんオルガノイドを作製し，エピゲノムプロファイルを取得することで，発がんおよび悪性化に寄与するエピゲノム変化の解明を目指す．

３．研究の方法

本研究は、下記の要領で遂行した（図１）。

(1) 胃正常上皮・化生・がんオルガノイドライブラリーの構築

我々が 2018 年に報告した，正常胃上皮，腸上皮化生および胃がん 37 検体のオルガノイドライブラリーについて検体数の拡張を行う．

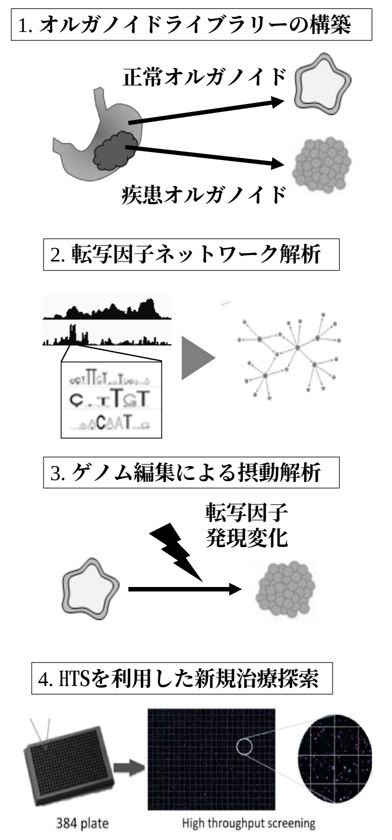
(2) 転写因子ネットワーク解析

構築したオルガノイドライブラリーを用いてエピゲノム解析を行い，転写因子ネットワークを解明する．エピゲノム解析の手法としては，クロマチン免疫沈降シークエンス（ChIP-seq）を用いて，ヒストン修飾や転写因子が結合する DNA 領域の同定を行う．また，transposome を使用した網羅的オープンクロマチン領域解析（ATAC-seq）(Buenrostro et al. Nature Methods 2013) を用いて，DNA 上で転写因子がアクセス可能となっているオープンクロマチン領域を検索する．ATAC-seq によって得られたオープンクロマチン領域の DNA 配列を，既知の転写因子のモチーフと比較解析することによって，細胞系列特性を規定する転写因子を予測する．また，細胞系列特性を規定する転写因子はゲノム上の一部の領域に高濃度に集積して，super enhancer と呼ばれる一連のクラスターを形成することが知られている．このクラスターは細胞の種類や機能に関係する重要な遺伝子の近傍に見出され，ヒストン修飾の ChIP-seq によって同定可能である．このようなエピゲノム解析と，トランスクリプトームのデータを統合解析することで，細胞系列特性を規定し，発がん・悪性化に寄与する転写因子を高い精度で予測する．

(3) ゲノム編集を用いた転写因子ネットワークの摂動解析

オルガノイド培養中で，組織幹細胞は決められた系列特性を維持することがわかっている．一方，基軸となる転写因子のノックアウトによって，細胞系列特性をコントロールすることがわかっている（Seino et al. Cell Stem Cell 2018）．この知見を根拠に，オルガノイドでの CRISPR-Cas9 によるゲノム編集技術（Matano et al. Nature Medicine 2015）を用いて，転写因子の摂動解析研究を行う．本研究では転写因子ネットワーク解析で得られた結果をもとに，推測される転写因子を正常上皮や化生・がんオルガノイドにノックアウト，もしくは過剰発現させることによって，細胞系列特性の変容を in vitro の実験系で再現する．このような手法で，ゲノム編集技術を利用した遺伝学的変化の再構築と，その形質変化の検証を行う．また，これまでの iPS 技術やダイレクトリプログラミング技術の成果より，細胞系列特性の変容には複数の転写因子群の摂動が必要と想定され，上記戦略でのゲノム編集で形質変化が認められない場合も考えられる．当研究室では多種類の転写因子を標的した CRISPR sgRNA ライブラリーを作成しており，これを利用して，細胞系列特性変容の因果性を担う転写因子群を一挙に同定可能である．ノックアウトの対象転写因子は，胃がんオルガノイドライブラリーのトランスクリプトームやエピゲノム解析結果を参照して候補を選択する．こうした CRISPR スクリーニングの結果を基に抽出した転写因子を組み合わせ，より効率的な細胞系列特性操作を行う．

図１　本研究の概要



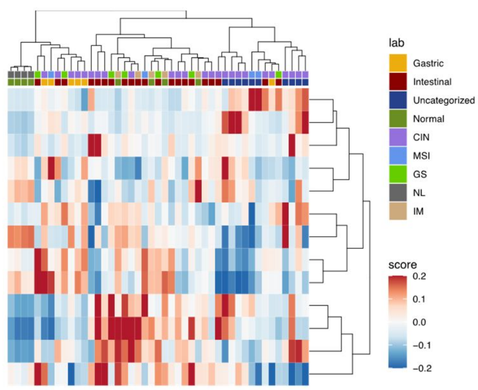
(4) HTS を利用した新規治療探索

細胞系列特性を制御する転写因子自体は薬剤のターゲットとなりにくいものの，近年，DNA メチル化やヒストン修飾といったエピゲジェネティクスを制御するタンパク質をターゲットとした薬剤の開発が進められている(Valencia et al. Nat Cell Biol 2019)．発がんや悪性化にエピゲノム異常が大きく寄与すると考えられる胃がんにも，この様なエピジェネティック薬の有効性が期待される．本研究では，リスト化したエピジェネティック薬から High throughput screening の手法で，胃がんの特定の集団に有効な薬剤を同定する．有効性が示された薬剤はさらに，異種移植システムを用いて in vivo での有効性を検証する．また，上述のようなエピゲノム解析を用いて，有効性の機序や，有効性を示す胃がん集団の特徴について明らかにし，新規標的治療開発に結びつけることを目指す．

４．研究成果

まず，既存の胃がんオルガノイドライブラリーの拡張を行った．樹立した胃オルガノイドは 100 ライン以上となり，AFP 産生胃がん，神経内分泌細胞腫瘍といった，希少だが予後の不良ながんも多数樹立に成功した．構築したオルガノイドライブラリーに対して，active な promoter，enhancer のマーカーである H3K27ac の ChIP-seq および ATAC-seq を用いて網羅的なエピゲノム解析を行った．エピゲノム解析から，胃がんオルガノイドを，胃に特徴的な転写因子活性を保持している胃型，腸に特徴的な転写因子活性を保持している腸型，どちらにも属さない未分類型の３つのサブタイプに分類した．TCGA のゲノム異常に基づいた分類において，genomically stable (GS)と呼ばれるサブタイプのがんは，CDH1 以外のドライバー遺伝子変異が同定されておらず，悪性度が高いことが特徴であるが，GS がんは再現性を持って腸型に分類された．また，AFP 産生がんを含めて，Wnt/R-spondin に非依存的な増殖を示すがんは未分類型に分類された（図２）．さらに，未分類型のがんに特徴的に発現している遺伝子は，予後不良因子であることがわかった．

図２：胃がんのATAC-seq解析結果



上記の転写因子ネットワークのデータを元に，転写因子の摂動実験を行った．まず未分類型のがんが培養に Wnt/R-spondin が不要となることが多いというデータから，我々は特定の転写因子の発現によって，胃がんが Wnt/R-spondin への非依存性を獲得し，進展するのではないかと考えた．エピゲノム解析及び，RNA-seq の発現解析の結果から，未分類型がんに特徴的に発現する転写因子群を多数候補とし，がんオルガノイドに強制発現させることで検証した．すると，選定した 8 つの候補転写因子を強制発現したオルガノイドは Wnt/R-spongin に非依存性となった．

このことから，転写因子発現変化，エピゲノム異常が胃がん悪性化を促進していると考えられたため，続いてエピゲノム修飾タンパクの制御による抗腫瘍効果について探索した．約 2000 種類のエピゲノム修飾タンパクをコードする遺伝子を標的した CRISPR sgRNA ライブラリーを作成し，これを未分類型の胃がんオルガノイドに感染させることでネガティブスクリーニングの手法によって，因果性を担うエピゲノム修飾タンパクの同定を試みた．現在，この実験の結果が待たれるところである．今後はこの解析で候補タンパクを見出し，遺伝子ノックアウトや阻害薬の投与によって治療標的としての検証を行う予定である．

本研究は，胃がんのエピゲノム異常という観点から新たな治療標的の可能性を探る研究である．ヒト細胞を用いたエピゲノム異常による腫瘍進行の機序解明を図る技術基盤となりうるとともに，臨床疾患サンプルの純度，精度の高いエピジェネティクスデータとして，貴重なリソースとなると考えられる．

５．主な発表論文等

〔雑誌論文〕　計6件（うち査読付論文　6件／うち国際共著　0件／うちオープンアクセス　0件）

１．著者名 Togasaki K, Sugimoto S, Ohta Y, Nanki K, Matano M, Takahashi S, Fujii M, Kanai T, Sato T.	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 K, Toshimitsu K, Matano M, Fujita M, Fujii M, Togasaki K, Ebisudani T, Shimokawa M, Takano A, Takahashi S, Ohta Y, Nanki K, Igarashi R, Ishimaru K, Ishida H, Sukawa Y, Sugimoto S, Saito Y, Maekawa A, Tanabe M, Ishihara S,Hamamoto Y, Yasuda H, Sekine S, Kudo A, Kitagawa Y, Kanai T, Nakagawa H, Sato T.	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
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 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 Toshimitsu Kohta、Takano Ai、Fujii Masayuki、Togasaki Kazuhiro、Matano Mami、Takahashi Sirirat、Kanai Takanori、Sato Toshiro	４．巻 18
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 605-614
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 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 -

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 -

〔学会発表〕　計0件

〔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
研究分担者	南木　康作 (Nanki Kosaku) (30571137)	慶應義塾大学・医学部（信濃町）・講師 (32612)	
研究分担者	佐藤　俊朗 (Sato Toshiro) (70365245)	慶應義塾大学・医学部（信濃町）・教授 (32612)	

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