

Title	遺伝子改変オルガノイドを用いたヒト大腸がん遺伝子の機能的解析基盤の構築
Sub Title	Establishment of gene engineered organoids for functional analysis of human colorectal driver gene mutations
Author	佐藤, 俊朗(Sato, Toshiro)
Publisher	
Publication year	2017
Jtitle	科学研究費補助金研究成果報告書 (2016.)
JaLC DOI	
Abstract	<p>近年の次世代シーケンス技術の進歩と大規模なシーケンス解析プロジェクトにより、大腸がんの網羅的ながん遺伝子変異同定が可能になった。我々は、大腸上皮組織の体外培養技術であるオルガノイド培養とCRISPR-Cas9ゲノム編集技術を組み合わせ、ヒト大腸上皮遺伝子変異導入オルガノイドによる、がん遺伝子変異の解析に成功した。作製された遺伝子変異オルガノイドは超免疫不全マウスを用いた異種移植系により、病理組織学的な評価と浸潤・転移能などの機能形質の解析が可能である。構築されるドライバー遺伝子機能解析基盤は汎用性が高く、様々な創薬スクリーニング応用が期待でき、高い社会的波及効果を併せ持つ。</p> <p>Recent advance in sequence technology has enabled comprehensive analyses of genetic mutations in human colorectal cancer. In this study, we combined organoid culture technology and CRISPR-Cas9 technology to establish gene engineered organoids for analysis of genetic mutations in human colorectal cancers. The engineered organoids were xenotransplanted into immune-deficient mice and pathologically examined for their invasive and metastatic capacity. The functional analysis platform for driver genetic mutations are instrumental and holds a promise for applying to drug screening.</p>
Notes	研究種目：基盤研究(B)(一般) 研究期間：2014～2016 課題番号：26293177 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_26293177seika

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.

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 5 月 29 日現在

機関番号：32612

研究種目：基盤研究(B) (一般)

研究期間：2014～2016

課題番号：26293177

研究課題名(和文) 遺伝子改変オルガノイドを用いたヒト大腸がん遺伝子の機能的解析基盤の構築

研究課題名(英文) Establishment of Gene Engineered Organoids for Functional Analysis of Human Colorectal Driver Gene Mutations

研究代表者

佐藤 俊朗 (Sato, Toshiro)

慶應義塾大学・医学部・准教授

研究者番号：70365245

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 12,700,000円

研究成果の概要(和文)：近年の次世代シーケンス技術の進歩と大規模なシーケンス解析プロジェクトにより、大腸がんの網羅的ながん遺伝子変異同定が可能になった。我々は、大腸上皮組織の体外培養技術であるオルガノイド培養とCRISPR-Cas9ゲノム編集技術を組み合わせ、ヒト大腸上皮遺伝子変異導入オルガノイドによる、がん遺伝子変異の解析に成功した。作製された遺伝子変異オルガノイドは超免疫不全マウスを用いた異種移植系により、病理組織学的な評価と浸潤・転移能などの機能形質の解析が可能である。構築されるドライバー遺伝子機能解析基盤は汎用性が高く、様々な創薬スクリーニング応用が期待でき、高い社会的波及効果を併せ持つ。

研究成果の概要(英文)：Recent advance in sequence technology has enabled comprehensive analyses of genetic mutations in human colorectal cancer. In this study, we combined organoid culture technology and CRISPR-Cas9 technology to establish gene engineered organoids for analysis of genetic mutations in human colorectal cancers. The engineered organoids were xenotransplanted into immune-deficient mice and pathologically examined for their invasive and metastatic capacity. The functional analysis platform for driver genetic mutations are instrumental and holds a promise for applying to drug screening.

研究分野：消化器内科学

キーワード：大腸癌 浸潤 転移 オルガノイド 幹細胞

1. 研究開始当初の背景

近年の次世代シーケンス技術により、大腸がんの遺伝子変異の網羅的な解析が可能になった。その結果、通常型の大腸がんは50-70程度の遺伝子変異を有していることが報告されている (Wood LD et al. Science 2007, The Cancer Genome Atlas Network Nature 2012)。遺伝子変異はがん細胞の増殖優位性に寄与するドライバー遺伝子変異と中立なパッセンジャー変異に分けられ、1つの大腸がん当たり、10個程度のドライバー遺伝子が存在すると考えられている。ドライバー遺伝子の抽出は腫瘍間で高頻度のアミノ酸コドンに変化を与える変異が認められることを基に、バイオインフォマティクスの観点から数学的に決定される。従って、多くのドライバー遺伝子はその細胞生物学的な機能が不明であり、その発がんへの寄与は確定していない。つまり、大腸がんにおいてその細胞生物学的機能が精力的に研究された APC, KRAS, SMAD2/3/4, TP53, PIK3CA などのドライバー遺伝子を除く、30程度のドライバー遺伝子の大部分は機能的な解析が待たれる (Vogelstein B et al. Science 2013)。

2. 研究の目的

次世代シーケンス技術の進歩により、網羅的ながん遺伝子変異同定が可能になった。しかしながら、発がんに寄与するドライバー遺伝子変異の同定はバイオインフォマティクスによる *in silico* 解析に依存してきた。我々は、大腸上皮組織を体外でミニ組織化し、複数の遺伝子を同時に破壊する、ヒト大腸上皮ノックアウト技術を確立した。本技術を用い、大腸がんの3%程度以上に認める25個の遺伝子を様々な組み合わせでノックアウトまたは変異ノックインし、人工大腸がんの作製およびその細胞生物学的特性の解析を行う。構築されるドライバー遺伝子機能

解析基盤は汎用性が高く、様々な創薬スクリーニング応用が期待でき、高い社会的波及効果を併せ持つ。

3. 研究の方法

ヒト正常大腸および大腸がんオルガノイドを作製し、正常・疾患上皮細胞の分子遺伝学的解析を行う。また、CRISPR-Cas9を用いたゲノム編集技術を用い、正常大腸上皮からの人工的な大腸がんの作成を試みる。

4. 研究成果

正常大腸上皮オルガノイドに対し、APC, KRAS, SMAD4, TP53, PIK3CAの5種類の遺伝子変異をCRISPR-Cas9ゲノム編集によって導入し、人工大腸癌モデルを作成した。人工的な遺伝子導入はSurveyor assayおよびシーケンス解析により確認を行った。遺伝子改変オルガノイドは異種移植により腫瘍形成を認め論文報告を行った (Matano et al. Nature Medicine 2015)。さらに、20個の遺伝子に対するCRISPR-Cas9ベクターの作製を完了し、ヒト大腸オルガノイドへエレクトロポレーション、Surveyor assayによる遺伝子ノックアウトを確認し、異種移植実験による浸潤・転移能の変化を検証している。

さらに、55ラインのヒト大腸腫瘍オルガノイドを樹立し、その遺伝子変異・発現変化と細胞生物学的な形質の変化への相関性を追求し、これまで困難であったGenotype-Phenotype 連関を研究するプラットフォームを構築した。

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 10件)

1. Shimokawa M, Ohta Y, Nishikori S, Matano M, Takano A, Fujii M, Date S, Sugimoto S, Kanai T, Sato T. Visualization and Targeting of LGR5+ Human Colon Cancer Stem Cells. **Nature** 2017 in press. 査読有.
DOI: 10.1038/nature22081

2. Kon S, Ishibashi K, Katoh H, Kitamoto S, Shirai T, Tanaka S, Kajita M, Ishikawa S, Yamauchi H, Yako Y, Kamasaki T, Nishikawa A, Kameda I, Maruyama T, Narumi R, Morita T, Sasaki Y, Enoki R, Honma S, Imamura H, Oshima M, Soga T, Miyazaki J, Duchon MR, Nam J, Onodera Y, Yoshioka S, Kikuta J, Ishii M, Imajo M, Nishida E, Fujioka Y, Ohba Y, Sato T, Fujita Y. Cell competition with normal epithelial cells promotes apical extrusion of transformed cells through metabolic changes. **Nature Cell Biology**. 2017;19:530-541. 査読有.
DOI: 10.1038/ncb3509

3. Jinnohara T, Kanaya T, Hase K, Sakakibara S, Kato T, Tachibana N, Sasaki T, Hashimoto Y, Sato T, Watarai H, Kunisawa J, Shibata N, Williams I, Kiyono H, and Ohno H. IL-22BP dictates characteristics of Peyer's patch follicle-associated epithelium for antigen uptake. **J Exp Med**. 2017 in press. 査読有.

4. Loomans CJM, Giuliani NW, Balak J, Ringnalda F, van Gurp L, Huch M, Boj SF, Sato T, Kester L, de Sousa Lopes SMC, Roost MS, Bonner-Weir S, Engelse MA, Rabelink TJ, Heimberg H, Vries RGJ, van Oudenaarden A, Carlotti F, Clevers H, de Koning EJP. Expansion of adult human pancreatic tissue yields organoids harbouring progenitor cells with endocrine differentiation potential. **Science Translational Medicine**. 2017 in press. 査読有.

5. Takeshita K, Mizuno S, Mikami Y, Sujino T, Saigusa K, Matsuoka K, Naganuma M, Sato T, Takada T, Tsuji H, Kushihiro A, Nomoto K, Kanai T. A Single Species of Clostridium Subcluster XIVa Decreased in Ulcerative Colitis Patients. **Inflamm Bowel Dis**. 2016;22:2802-2810. 査読有.
DOI: 10.1097/MIB.0000000000000972

6. Blokzijl F, de Ligt J, Jager M, Sasselli V, Roerink S, Sasaki N, Huch M, Boymans S, Kuijk E, Prins P, Nijman I, Martincorena I, Mokry M, Wiegerinck CL, Middendorp S, Sato T, Schwank G, Nieuwenhuis EES, Verstegen MMA, van der Laan LJW, de Jonge J, IJzermans JNM, Vries RG, van de Wetering M, Stratton MR, Clevers H, Cuppen E, van Boxtel R. Tissue-specific mutation accumulation in human adult stem cells during life. **Nature** 2016.;238:260-264. 査読有. DOI: 10.1038/nature19768

7. Ohashi W, Kimura S, Iwanaga T, Furusawa Y, Irie T, Izumi H, Watanabe T, Hijikata A, Hara T, Ohara O, Koseki H, Sato T, Robine S, Mori H, Hattori Y, Watarai H, Mishima K, Ohno H, Hase K, Fukada T. Zinc transporter SLC39A7/ZIP7 promotes intestinal epithelial self-renewal by resolving

- ER stress. **PLoS Genet.** 2016;12:e1006349. 査読有.
DOI: 10.1371/journal.pgen.1006349
8. Dominguez-Brauer C, Hao Z, Elia AJ, Fortin JM, Nechanitzky R, Brauer PM, Sheng Y, Mana MD, Chio II, Haight J, Pollett A, Cairns R, Tworzyanski L, Inoue S, Reardon C, Marques A, Silvester J, Cox MA, Wakeham A, Yilmaz OH, Sabatini DM, van Es JH, Clevers H, **Sato T**, Mak TW. Mule Regulates the Intestinal Stem Cell Niche via the Wnt Pathway and Targets EphB3 for Proteasomal and Lysosomal Degradation. **Cell Stem Cell.** 2016;19:205-16. 査読有. DOI: 10.1016/j.stem.2016.04.002
 9. Fujii M, Shimokawa M, Date S, Takano A, Matano M, Ohta Y, Nanki K, Kawasaki K, Nakazato Y, Uraoka T, Watanabe T, Kanai T, **Sato T**. A colorectal tumor organoid library demonstrates progressive loss of niche factor requirements. **Cell Stem Cell** 2016;18:827-38. 査読有.
DOI: 10.1016/j.stem.2016.04.003
 10. Oudhoff MJ, Braam MJS, Freeman SA, Wong D, Rattray DG, Want J, Antignano F, Snyder K, Refaeli I, Hughes MR, McNagny KM, Gold MR, Arrowsmith CH, **Sato T**, Rossi FMV, Tatlock JT, Owen D, Brown PJ, Zaph C. SETD7 controls intestinal regeneration and tumorigenesis by regulating Wnt/beta-catenin and Hippo/YAP signaling. **Developmental Cell.** 2016;37:47-57. 査読有.
DOI: 10.1016/j.devcel.2016.03.002
- [学会発表](計 15件)
1. **佐藤俊朗**, 南木康作, 下川真理子. 加齢・炎症ストレスの及ぼす腸管上皮幹細胞の分子遺伝学的変化. 1PS18 ステムセルエイジング: 老化の謎は解明できるか? 第39回日本分子生物学会年会. 2016年11月30日 パシフィコ横浜(神奈川県横浜市)
 2. **Toshiro Sato**. Visualization of Human Colon Cancer Stem Cells Using Organoid Technology. Princess Takamatsu Cancer Research Fund. Current Status and Perspective of Cancer Stem Cell Research. Tokyo Palace Hotel(東京都千代田区). 2016.11.8.
 3. **Toshiro Sato**. Easy manipulation of the genome: CRISPR technology. Translational Basic Science Novel models for GI disease. UEGW 2016. Vienna(Austria). 2016.10.17.
 4. **Toshiro Sato**. Disease modeling of human colorectal cancer. EMBO | EMBL Symposium. Heidelberg (Germany). 2016.10.15
 5. **Toshiro Sato**, Shinya Sugimoto, Mami Matano. Gut environments and human colorectal carcinogenesis. Symposium 17. The intestinal microflora and cancer. The 75th Annual Meeting of the Japanese Cancer Association. PACIFICO Yokohama (Yokohama, Kanagawa). 2016.10.8
 6. **佐藤俊朗**. ヒト大腸発がん・がん幹細胞のゲノム編集を用いた機能解析. 創薬薬理フォーラム 第24回シンポジウム. 日本薬学会. 長井記念館(東京都渋谷区). 2016年9月29日
 7. **佐藤俊朗**. 太田悠木, 股野麻未, 藤井正

幸, 下川真理子. ヒト大腸がん発がん・がん幹細胞のゲノム編集を用いた機能解析. 第 89 回日本生化学会大会. 仙台国際センター (宮城県仙台市). 2016 年 9 月 25 日

8. **Toshiro Sato.** Disease Modeling of Colorectal Cancer Using Organoids. Concurrent IV Disease modeling II. ISSCR 2016. San Francisco(America). 2016.7.25
9. **Toshiro Sato.** Disease modeling of colorectal cancer using organoids. The 41st Naito Conference. CHATERAISE Gateaux Kingdom SAPPORO (Sapporo-shi, Hokkaido). 2016.7.7.
10. **佐藤俊朗.** オルガノイドを用いた消化器がん研究. シンポジウム 7 3次元構築の中のがん細胞. 第 68 回日本細胞生物学会大会・京都テルサ(京都市南区). 2016 年 6 月 16 日
11. **佐藤俊朗.** 腸管上皮オルガノイド培養の確立とその応用. 特別企画 2 日本から世界に向けて発信されたトップ研究 第 102 回日本消化器病学会大会. 京王プラザホテル(東京都新宿区). 2016 年 4 月 22 日
12. **Toshiro Sato.** Intestinal Stem Cell Niche Signaling in Homeostatic and Diseased Epithelium. Session2. Gut homeostasis and IBD. The 5th International Forum of the 102nd General Meeting of the Japanese Society of Gastroenterology. 京王プラザホテル(東京都新宿区). 2016.4.21
13. **Toshiro Sato.** Dynamics of stem cell system in intestinal epithelium. Biochemistry and Molecular Biology 2015. Symposium 3S4 Cell and Time, 神戸ポートピアホテル(兵庫県神戸市), 2015. 12.3

14. **Toshiro Sato.** Modeling Colorectal Cancer with Organoid Culture System. Till&McCulloch Meeting 2015. Toronto(Canada). 2015.10.27

15. **Toshiro Sato.** Modeling of Colorectal Cancer in a dish using an organoid culture system. 112th International Titisee conference. Schwarzwaldhotel Titisee(Germany). 2015.10.22

〔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
佐藤 俊朗 (SATO, Toshiro)
慶應義塾大学・医学部・准教授
研究者番号: 70365245

(2) 研究分担者
なし

(3) 連携研究者
なし

(4) 研究協力者
なし