

Title	大腸癌肝転移の分子機序の解明
Sub Title	Investigation of the molecular mechanism of colorectal cancer metastasis
Author	佐藤, 俊朗(Sato, Toshiro)
Publisher	慶應義塾大学
Publication year	2018
Jtitle	学事振興資金研究成果実績報告書 (2017.)
JaLC DOI	
Abstract	肝転移能の獲得に何が関与しているかを明らかにするための研究材料として、まず患者の肝転移巣から樹立したオルガノイドにGFP遺伝子を導入した。これにより、マウス転移モデルにおいて肝転移を可視化し腫瘍細胞を肝臓から回収することを可能にした。恒常的にGFPを発現させたオルガノイドをマウス脾注肝転移モデルにおいて、肝転移した腫瘍のみをマウス肝臓細胞から精製する条件を検討した。オルガノイドを脾注後、3日後、7日後、14日後、21日後、28日後に解剖し肝臓を観察したところ、肝臓で転移巣を確認し腫瘍が経時的に大きく増大する様子を確認できた。遺伝子発現変化を調べるため、転移した腫瘍を含む肝臓をコラゲナーゼやプロテアーゼでシングルセルに分散し、FACSを用いてGFP蛍光をもつ癌細胞を回収しqPCRにより遺伝子発現を調べた。その結果、幹細胞マーカーとなるLGR5は移植後2週間で発現が最大となりその後減少する一方で、分化細胞マーカーであるKRT20の発現はLgr5とは逆に2週間で発現が最少となりその後増加することが確認された。肝臓に生着する二週間後あたりで、Lgr5陽性細胞の割合が最大となり、肝臓に生着するステップでLGR5の発現が重要である可能性が考えられた。今後は10xgenomics社のChromiumを用いてsingle cell RNA seqを行うことにより、single cellレベルで肝転移過程においてどのような遺伝子発現変化や細胞集団が肝転移に重要なかを明らかにしたい。 In order to investigate what is involved in the acquisition of metastatic potential of colorectal cancer (CRC), we introduced a GFP gene into human CRC organoids derived from metastatic CRC so that the organoids can be visualized on a metastasis animal model and purified by using FACS. First, we tried to purify metastatic CRC from mouse liver on metastatic mouse model. We injected CRC organoids into mouse spleen and found that the CRC organoids were successfully colonized in the mouse liver and tumor size was increased with time (day3, 7, 14, 21, 28). To assess the gene expression on the metastatic process, the mouse livers containing metastatic CRC organoids was dispersed with collagenase and protease into single cells and CRC cells were purified by using FACS. Then, the gene expression of recovered CRC cells was analyzed by qPCR and it was found that the expression of LGR5, which is a stem cell marker, was highest at day14 among the time course whereas the expression of KRT20 (differentiation marker) was conversely the lowest at day14. These results suggest that LGR5-positive cells were concentrated around day 14 after transplantation and the LGR5 expression may play key roles on the engraftment to the liver around day 14. In the future, we will perform single-cell transcriptome analysis using Chromium (10xgenomics) and try to unravel what genes and what populations of CRC were important for the CRC metastasis.
Notes	
Genre	Research Paper
URL	https://koara.lib.keio.ac.jp/xoonips/modules/xoonips/detail.php?koara_id=2017000001-20170008

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.

研究代表者	所属	医学部臨床教室	職名	准教授	補助額	1,000（特A）千円
	氏名	佐藤 俊朗	氏名（英語）	Toshiro Sato		
研究課題（日本語）						
大腸癌肝転移の分子機序の解明						
研究課題（英訳）						
Investigation of the molecular mechanism of colorectal cancer metastasis						
1. 研究成果実績の概要						
肝転移能の獲得に何が関与しているかを明らかにするための研究材料として、まず患者の肝転移巣から樹立したオルガノイドに GFP 遺伝子を導入した。これにより、マウス転移モデルにおいて肝転移を可視化し腫瘍細胞を肝臓から回収することを可能にした。恒常的に GFP を発現させたオルガノイドをマウス脾注肝転移モデルにおいて、肝転移した腫瘍のみをマウス肝臓細胞から精製する条件を検討した。オルガノイドを脾注後、3 日後、7 日後、14 日後、21 日後、28 日後に解剖し肝臓を観察したところ、肝臓で転移巣を確認し腫瘍が経時的に大きく増大する様子を確認できた。遺伝子発現変化を調べるため、転移した腫瘍を含む肝臓をコラゲナーゼやプロテアーゼでシングルセルに分散し、FACS を用いて GFP 蛍光をもつ癌細胞を回収し qPCR により遺伝子発現を調べた。その結果、幹細胞マーカーとなる LGR5 は移植後 2 週間で発現が最大となりその後減少する一方で、分化細胞マーカーである KRT20 の発現は Lgr5 とは逆に 2 週間で発現が最少となりその後増加することが確認された。肝臓に生着する二週間後あたりで、Lgr5 陽性細胞の割合が最大となり、肝臓に生着するステップで LGR5 の発現が重要である可能性が考えられた。 今後は 10xgenomics 社の Chromium を用いて single cell RNA seq を行うことにより、single cell レベルで肝転移過程においてどのような遺伝子発現変化や細胞集団が肝転移に重要かを明らかにしたい。						
2. 研究成果実績の概要（英訳）						
In order to investigate what is involved in the acquisition of metastatic potential of colorectal cancer (CRC), we introduced a GFP gene into human CRC organoids derived from metastatic CRC so that the organoids can be visualized on a metastasis animal model and purified by using FACS. First, we tried to purify metastatic CRC from mouse liver on metastatic mouse model. We injected CRC organoids into mouse spleen and found that the CRC organoids were successfully colonized in the mouse liver and tumor size was increased with time (day3, 7, 14, 21, 28). To assess the gene expression on the metastatic process, the mouse livers containing metastatic CRC organoids was dispersed with collagenase and protease into single cells and CRC cells were purified by using FACS. Then, the gene expression of recovered CRC cells was analyzed by qPCR and it was found that the expression of LGR5, which is a stem cell marker, was highest at day14 among the time course whereas the expression of KRT20 (differentiation marker) was conversely the lowest at day14. These results suggest that LGR5-positive cells were concentrated around day 14 after transplantation and the LGR5 expression may play key roles on the engraftment to the liver around day 14. In the future, we will perform single-cell transcriptome analysis using Chomium (10xgenomics) and try to unravel what genes and what populations of CRC were important for the CRC metastasis.						
3. 本研究課題に関する発表						
発表者氏名 (著者・講演者)	発表課題名 (著書名・演題)	発表学術誌名 (著書発行所・講演学会)	学術誌発行年月 (著書発行年月・講演年月)			