

平成 28 年度 委託研究開発成果報告書

I. 基本情報

- 事業名 : (日本語) 次世代がん医療創生研究事業  
(英語) Project for Cancer Research and Therapeutic Evolution
- 研究開発課題名 : (日本語) がん多階層フェノタイプの理解に基づいた先端的創薬システムの開発  
(英語) Development of advanced drug discovery system based on understanding of cancer phenotypes
- 研究開発担当者 (日本語) 学校法人慶應義塾 慶應義塾大学 医学部 内科学 (消化器)  
准教授 佐藤 俊朗
- 所属 役職 氏名 : (英語) Department of Gastroenterology, School of Medicine,  
Associate Professor Toshiro Sato
- 実施期間 : 平成 28 年 5 月 25 日 ~ 平成 29 年 3 月 31 日

## II. 成果の概要（総括研究報告）

### 和文

#### 【研究開発項目 1】

オルガノイド-間質共培養システムとニッチ標的治療法の開発

##### (a) がんオルガノイド - 非上皮細胞の共培養系の確立

生体内のがん組織は、がん細胞と微小環境ニッチにより構成され、非上皮細胞からのニッチ因子の供給により幹細胞性が維持され、永続的な増殖をする。従来のオルガノイドは上皮細胞のみから構成され、ニッチ因子は組換えタンパクにより置き換えていた。臨床のがん組織を高度に擬似化したがん幹細胞-ニッチ相互作用の再構築を目的とし、膵がんオルガノイドと間質細胞の共培養系を確立した。さらに安定的な共培養系となるよう最適化を行っている。

##### (b) ニッチ相互作用を標的とした治療法開発

(a)で開発した共培養系を用いて、ニッチを構成する細胞またはニッチ因子を標的とした治療薬のスクリーニングを行っている。がんオルガノイドの共培養効率の高い線維芽細胞または血管内皮細胞などの間質細胞を同定し、遺伝子発現プロファイルを取得した。がんオルガノイドの受容体発現プロファイルとの比較検討を行い、線維芽細胞由来のニッチ因子から治療標的となりうる分子の探索を行なっている。

#### 【研究開発項目 2】

がんオルガノイドの *in vivo* 幹細胞可視化モデルの確立

##### (a) がん幹細胞の可視化技術の開発

ゲノム編集技術を用いた遺伝子ノックインにより、ヒトがんオルガノイドのがん幹細胞マーカーである LGR5 の蛍光可視化に成功した。この可視化技術により、異種移植下での LGR5 がん幹細胞およびその子孫細胞の動態を生体内で追跡できるようになった。

#### 【研究開発項目 3】

消化器がんオルガノイドを用いた HTS の POC 取得

##### (a) がんオルガノイド HTS のデータ取得

大腸がん、胃がん、胆のうがん、膵がんから構成されるがんオルガノイドライブラリーを構築し、60-200 化合物の既存薬スクリーニングを行っている。

##### (b) 非臨床異種移植モデルでの POC 取得

がんオルガノイド異種移植モデルを用い、*in vitro* HTS データとマウス異種移植モデルにおける薬剤感受性の相関について検証した。また、異種移植モデルの移植効率および生体内の薬剤送達の改善のため、ヌードマウス皮下移植モデルが有用であることを見出した。

##### (c) 臨床研究による非介入観察研究

(b)の *in vitro* HTS で得られた知見を実証するために、臨床研究のためのプロトコールを作成し、承認された。このプロトコールを用いて、がんオルガノイドから得られた薬剤感受性の結果と臨床における治療効果との相関を検証している。

**【Research and Development Subject 1】**

Development of organoid-stroma co-culture system and niche-targeting therapy

(a) Establishment of co-culture system of cancer organoid and non-epithelial cells

Tumor tissues consist of cancer cells and stromal cells that provides niche factors to support stemness. Conventional organoid culture system employs pure epithelial cells, and their growth hinges on purified recombinant proteins in place of stromal cells. To reconstitute highly complicated tumor tissue structures, we developed co-culture system using pancreas cancer organoids and stromal cells. We are currently further optimizing the co-culture system.

(b) Development of niche interaction targeting therapy

Using above co-culture system, we conduct drug screening tests to search reagents targeting niche cells or niche factors. We identified stromal cells, such as fibroblasts, that enable highly efficient coculture of cancer organoids, and performed gene expression profiling. We are screening a feasible therapeutic target molecules from fibroblast-derived niche factors by use of corresponding receptor expression in our gene expression profile of cancer organoids.

**【Research and Development Subject 2】**

Establishment of in vivo imaging system for cancer stem cells.

(a) Development of technology to visualize cancer stem cells

We implemented reporter knock-in technology in human cancer organoids, and succeeded in visualization of LGR5 using fluorescent reporter. We developed an in vivo experimental platform to track the dynamics of LGR5+ cancer stem cells and their descendants.

**【Research and Development Subject 3】**

Proof of Concept (POC) for High Throughput Screening (HTS) using gastrointestinal cancer organoids

(a) Establishment of cancer organoid HTS

We developed cancer organoid library consisting of colorectal cancer, stomach cancer, gallbladder cancer and pancreas cancer. We also performed 60-200 compounds screening.

(b) POC in non-clinical xenograft transplantation model

We determine the correlation between in vitro HTS data and drug response in xenograft mouse model. We improved the xenograft model by modifying the transplantation recipient and delivery methods. We found that subcutaneous transplantation using nude mice was handy and useful for this experimental purpose.

(c) Non-interventional observational study by clinical study

To substantiate the in vitro HTS POC, we designed experimental protocol for POC of HTS data. The protocol was approved. With this protocol, we determine the correlation between drug sensitivity data from cancer organoids and the drug response in patients.

### III. 成果の外部への発表

(1) 学会誌・雑誌等における論文一覧 (国内誌 4件、国際誌 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.
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 in press.
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*
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.
5. Takeshita K, Mizuno S, Mikami Y, Sujino T, Saigusa K, Matsuoka K, Naganuma M, **Sato T**, Takada T, Tsuji H, Kushiro A, Nomoto K, Kanai T. A Single Species of Clostridium Subcluster XIVa Decreased in Ulcerative Colitis Patients. **Inflamm Bowel Dis**. 2016;22:2802-2810.
6. 佐々木 伸雄, **佐藤 俊朗**. 腸管上皮オルガノイド—幹細胞制御機構の理解と腸管上皮オルガノイド培養法. 実験医学. 2016, Vol. 34 No.17 号.
7. 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
8. 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.

9. 利光孝太, 佐藤俊朗. オルガノイド培養における大腸発がん過程の再構成. 実験医学 2016 年 9 月号 Vol.34 No.14
10. 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.
11. 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.
12. 藤井正幸, 佐藤俊朗. 腸管上皮オルガノイド作成から遺伝子導入まで. 実験医学 2016 年 5 月号 Vol.34 No.8
13. 伊達昌一, 佐藤俊朗. CRISPR-Cas9 システムを用いた人工的なヒト大腸がんの再構築. 最新医学. 2016, Vol.71 No.4.
14. 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.

(2) 学会・シンポジウム等における口頭・ポスター発表

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. 2016/11/30, 国内.
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. 2016/11/8, 国内.
3. Toshiro Sato. Easy manipulation of the genome: CRISPR technology. Translational Basic Science Novel models for GI disease. UEGW 2016. Vienna. 2016/10/17, 国外.
4. Toshiro Sato. Disease modeling of human colorectal cancer. EMBO | EMBL Symposium. Heidelberg. 2016.10.15
5. 佐藤俊朗. オルガノイドを用いた消化器がん研究. ランチョンセミナー. 第 75 回日本癌学会学術総会. 横浜. 2016/10/8, 国内.
6. Toshiro Sato, Shinya Sugimoto, Mami Matano. Gut environments and human colorectal carcinogenesis.

Symposium 17. The intestinal microflora and cancer. The 75<sup>th</sup> Annual Meeting of the Japanese Cancer Association. Yokohama. 2016/10/8, 国内.

7. **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. 2016/9/29, 国内.
8. **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. 2016/9/25, 国内.
9. **Toshiro Sato**. Disease modeling of colorectal cancer using organoids. The 41<sup>st</sup> Naito Conference. Sapporo. 2016/7/7, 国内.
10. **Toshiro Sato**. Disease Modeling of Colorectal Cancer Using Orgnaoids. Concurrent IV Disease modeling II. ISSCR 2016. San Francisco, 2016/7/25, 国外.
11. **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, 2016/6/16, 国内.
12. **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, 2016/4/22, 国内.
13. **Toshiro Sato**. Intestinal Stem Cell Niche Signaling in Homeostatic and Diseased Epithelium. Session2. Gut homeostasis and IBD. The 5<sup>th</sup> International Forum of the 102<sup>nd</sup> General Meeting of the Japanese Society of Gastroenterology, 2016/4/21, 国内.

(3) 「国民との科学・技術対話社会」に対する取り組み  
該当なし

(4) 特許出願  
該当なし