

博士論文

論文題目 大腸腫瘍における幹細胞ニッチ因子要求性の多角的検討

氏 名 藤井 正幸

目次

要旨	3
序文	4
第一章 ヒト大腸腫瘍オルガノイドライブラリの確立および統合的解析	
1.1 目的	12
1.2 方法	13
1.3 結果	23
1.4 考察	48
1.5 結論	52
第二章 大腸腫瘍オルガノイドの細胞学的特性と幹細胞ニッチ要求性の連関	
2.1 目的	53
2.2 方法	54
2.3 結果	58
2.4 考察	80
2.5 結論	83
結語	84
謝辞	86

引用文献	87
------	----

要旨

患者大腸腫瘍の細胞学的解析は従来困難とされてきた．このボトルネックを解消し様々な機能的解析に応用可能な生物学的リソースを構築するため，大腸腫瘍の多様性を網羅するオルガノイドライブラリを確立した．大腸腫瘍オルガノイドは培養中，異種移植下において患者腫瘍の組織学的特徴を再現した．培養に必要な幹細胞ニッチ因子の要求性は腺腫から癌に至る過程で有意な減少が認められた．肝転移巣由来オルガノイドは対となる原発巣オルガノイドと同等の分子生物学的プロファイルを有していたが，肝転移モデルにおいてより効率的に肝転移巣を形成した．本研究結果はオルガノイドを用いた患者腫瘍細胞の機能的解析の有用性を示唆するものであった．

序文

腸管上皮は哺乳類において最も活発なターンオーバーを有する組織であり，3-5 日という極めて短いサイクルで再生を繰り返す[1, 2]. 水分や栄養の吸収をはじめとした腸管上皮の機能は個体の生命維持に必須であり[3], その恒常性は腸陰窩底部に存在する腸管上皮幹細胞を頂点とした分化ヒエラルキーによって保たれている．具体的には，腸管上皮幹細胞は生涯にわたって自己複製を繰り返す一方で，その娘細胞は活発に分裂する transit amplifying cells (TA 細胞) を経由して 4 種類の機能的細胞，すなわち吸収上皮細胞（水分や栄養の吸収），内分泌細胞（ホルモン分泌），杯細胞（粘液産生），パネート細胞（抗菌作用）へと終末分化する[4-6]. 終末分化細胞は底部より絶えず供給される新規分化細胞によってベルトコンベヤーのごとく陰窩長軸方向に沿って押し出されていき，最終的には管腔内に脱落しその役割を終える[7].

腸管上皮幹細胞の自己複製能はこのダイナミックな腸管上皮再生機構を駆動する動力源である一方で，幹細胞の無秩序な増殖や分化異常は腫瘍化をきたす[8]. そのため，腸管上皮幹細胞の自己複製・分化は隣接細胞および間質組織から供給される増殖因子やホルモンによって厳密に保持・制御されている．このように，幹細胞の機能を維持するべく周囲組織が形成する微小環境を幹細胞ニッチと呼ぶ[9, 10].

腸管上皮における幹細胞ニッチの詳細は長らく不明とされてきた。しかし，2007年に膜7回貫通型タンパクである Lgr5 (Leucine-rich repeat-containing G-protein coupled receptor 5) の遺伝学的系譜解析を用いた研究によって腸陰窩底部に存在する crypt base columnar cells (CBC 細胞) が腸管上皮幹細胞であると同定され[11]，腸管上皮幹細胞の機能およびそのニッチに関する理解は急速に深まることとなる[12-15] (図 1)。

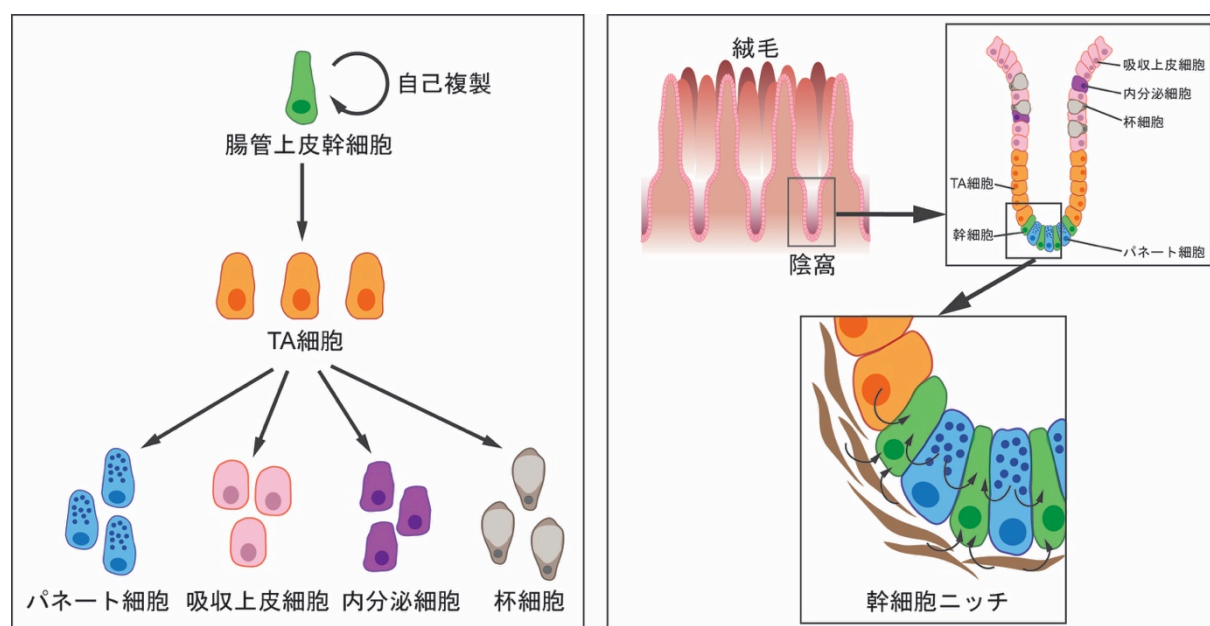


図 1 腸管上皮における幹細胞ヒエラルキーおよび陰窩構造

小腸上皮を例に，左に幹細胞ヒエラルキー，右に陰窩構造および幹細胞ニッチの模式図を示す。腸管上皮細胞は自己複製を繰り返すとともに，その娘細胞は TA 細胞を経て機能的な終末分化細胞となる。幹細胞は陰窩底部にパネート細胞に挟まれるように存在し，隣接細胞や間質細胞との相互作用によって幹細胞ニッチが形成される。

腸管上皮幹細胞制御機構の理解に立脚し、2009 年に Lgr5⁺腸管上皮幹細胞を体外にて永続的に培養する手法が開発された[16]。本手法では腸管上皮幹細胞ニッチに類似した環境を培養プレート上で再現するため、腸管上皮幹細胞腸あるいは陰窩をラミニン豊富な基底膜マトリックス（マトリゲル）に包埋し、幹細胞の自己複製に必要な規定の増殖因子を培地に添加する。至適な培養条件下におかれた腸管上皮幹細胞は活発に自己複製および分化を経て、約 7-10 日間で生体組織の陰窩絨毛構造に類似した三次元構造（オルガノイド）を自律的に構築する（図 2）。成熟したオルガノイドは機械的細断あるいは酵素処理によって継代された後も同様の構造を再構築し、継代を繰り返すことで 1 年以上にわたる継続的な培養が可能である。このオルガノイド培養には間質細胞や血球細胞などの非上皮性細胞は含まれておらず、幹細胞の自己複製能維持は培地に添加された増殖因子のみに依存している。つまり、継続的なオルガノイド培養を可能にする増殖因子群こそが腸管上皮幹細胞のニッチ因子であるといえる。当初マウス小腸上皮オルガノイド培養に必要な幹細胞ニッチ因子条件として EGF（上皮増殖因子）、Noggin（BMP4 阻害作用）、R-Spondin1（Wnt 活性作用）が同定され[16]、この条件に Wnt-3a、TGF- β 受容体阻害剤（A83-01）、p38 MAPK 阻害剤（SB202190）を加えることで、ヒト大腸上皮オルガノイドの永続培養が初めて可能となった[17, 18]。この発見により、ヒト大腸上皮における幹細胞機能を維持する生物学的作用として

Wnt シグナル, EGF シグナルの活性化および TGF- β シグナル, BMP シグナル, p38

シグナルの阻害が必要かつ十分であることが判明した (図 2)。

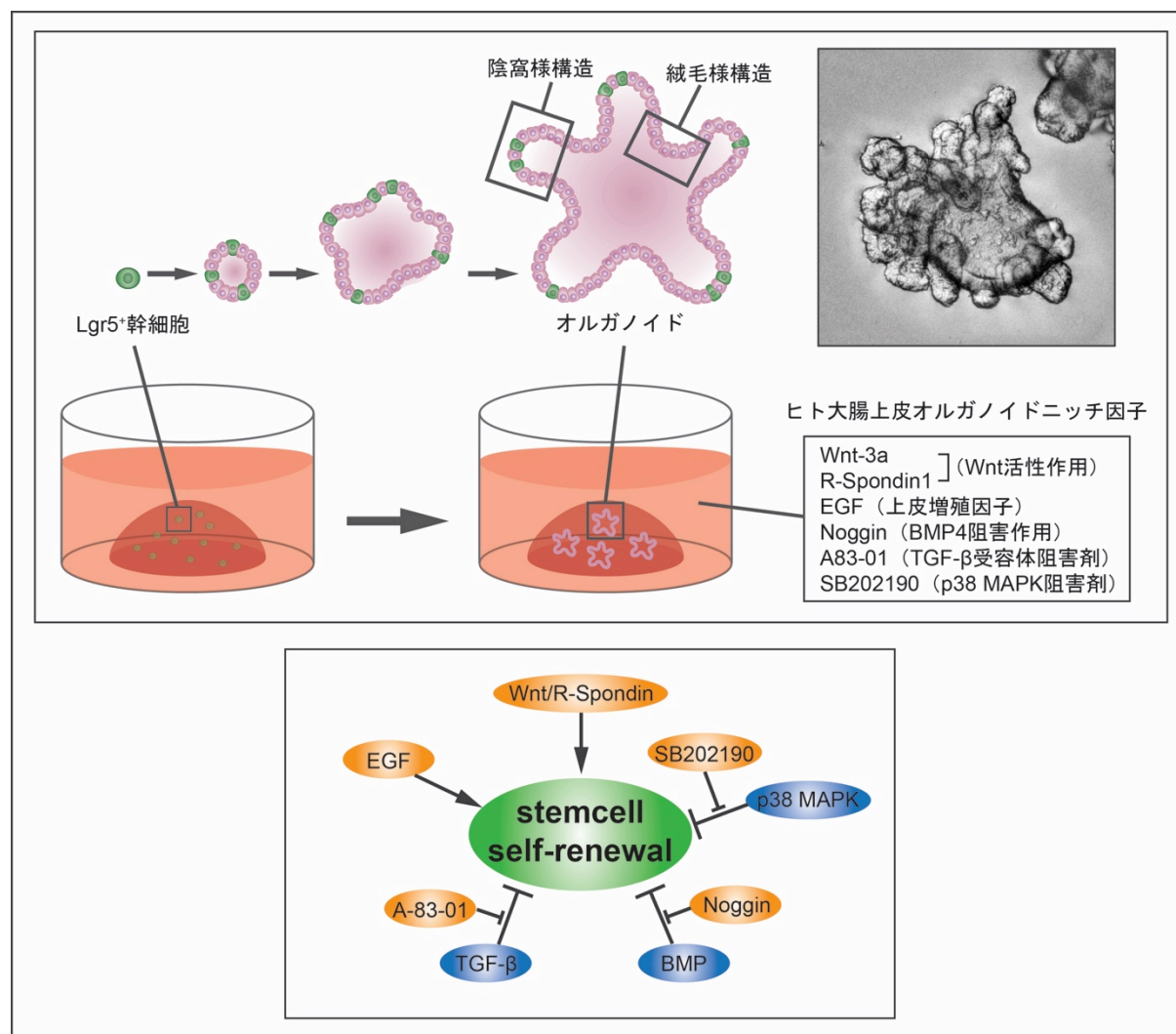


図2 オルガノイド培養法の概要とヒト大腸上皮における幹細胞ニッチ因子

腸管上皮幹細胞あるいは陰窩をマトリゲルに包埋し, 幹細胞ニッチ因子を添加した培地にて培養すると, 上皮組織に類似した三次元構造 (オルガノイド) を形成する. 正常腸管上皮オルガノイドは外側に突出した陰窩様ドメインおよび内腔に面した絨毛様ドメインを有し, 幹細胞は陰窩様ドメインに存在する. 下段にヒト大腸上皮幹細胞の自己複製能を制御するパスウェイおよびニッチ因子の概要を示す.

オルガノイドは既に従来の細胞株や遺伝子改変マウスに変わる実験ツール、さらに海外では既に嚢胞線維症などの臨床診断ツールとして活用されはじめている[19]。また、オルガノイドは大腸癌をはじめとした上皮腫瘍組織からも樹立可能であり[17]、遺伝子変異解析や薬効評価などへの応用が期待されている（図 3）[20]。

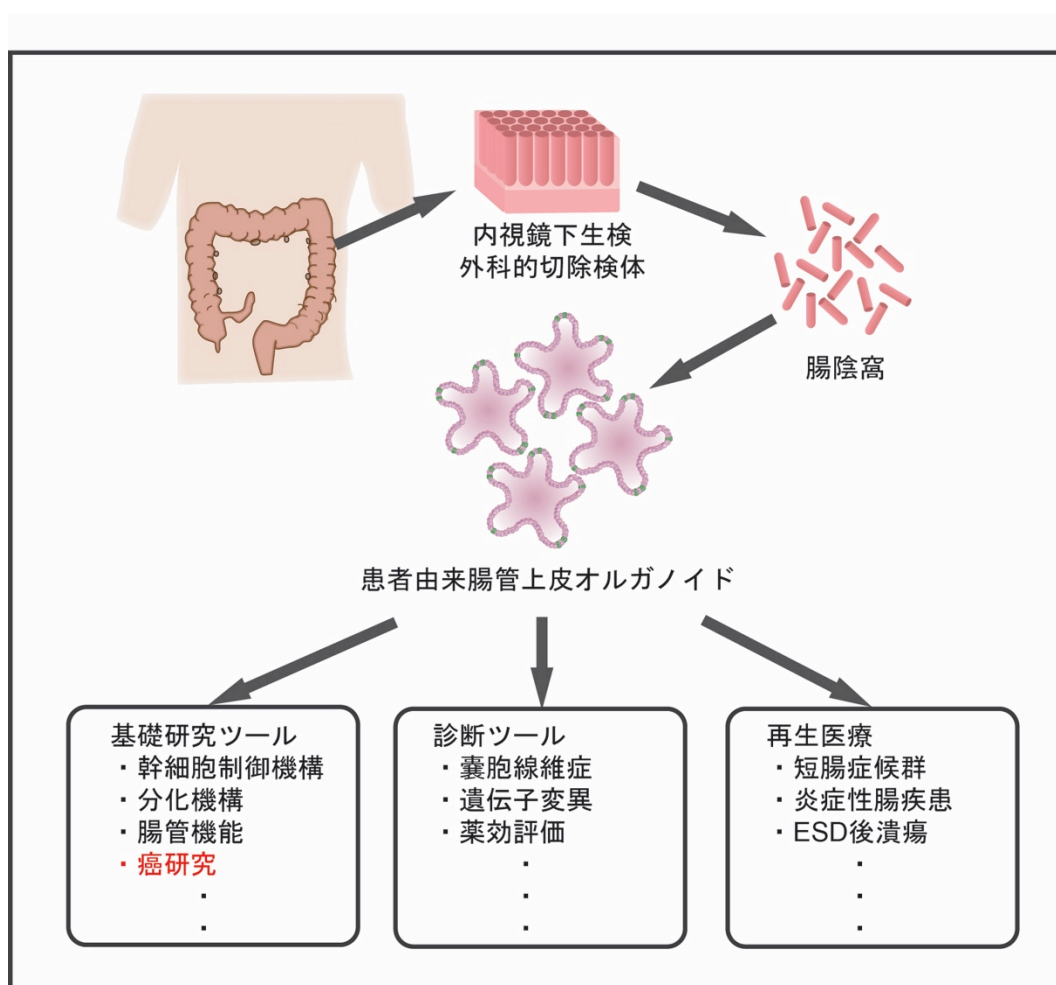


図 3 患者由来腸管上皮オルガノイドの応用例（文献 20 より改変）

患者由来腸管上皮オルガノイドは基礎研究，臨床の様々な分野における応用が期待されている。

大腸癌はマウスやヒト腫瘍組織を用いた研究によって古くより発癌分子モデルが確立している癌腫の一つであり，古典的にはがん遺伝子変異や染色体異常などの様々な遺伝子異常の蓄積に伴い，正常上皮から腺腫等の前癌病変を経て最終的に大腸癌に至る，いわゆる多段階発癌を辿るとされている[21-24]（図 4）.

近年の大腸癌大規模網羅的解析では，それぞれの大腸癌サンプルには多様な遺伝子変異の蓄積が認められた[25, 26]. 高頻度で変異が認められる主要な遺伝子を属するシグナルパスウェイに基づいて分類すると，その多くを 5 つのシグナル経路すなわち Wnt シグナル，Ras-Raf シグナル，PI3K-Akt シグナル，TGF- β シグナルおよび TP53 シグナルのいずれかに帰属させることが可能であった．これら大腸癌変異パスウェイは TP53 シグナルを除いて前述の腸管上皮幹細胞ニッチシグナルとの重複が認められた（図 4）.

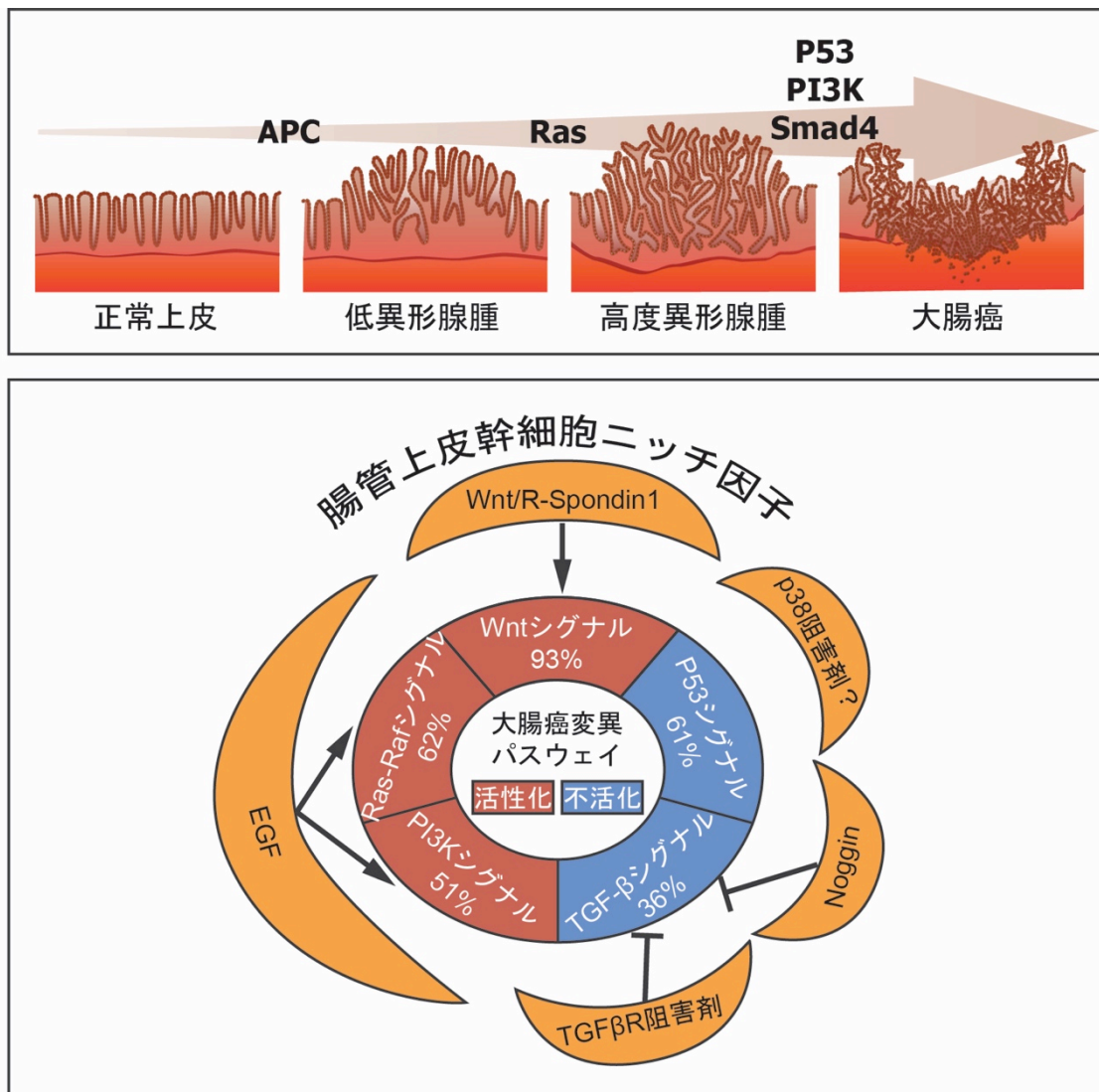


図4 大腸発癌分子モデルの模式図および大腸癌変異パスウェイシグナルと腸管上皮幹細胞ニッチシグナルとの相関

上段：大腸発癌モデルの例として，腺腫を経て大腸癌に至る多段階発癌いわゆる adenoma-carcinoma sequence の模式図を提示する．正常上皮に様々な遺伝子異常が蓄積し大腸癌に至る．代表的な分子異常については文献 21–24 より抜粋した．

下段：内側に大腸癌における主要シグナルパスウェイおよびそのパスウェイ変異の頻度を示す．遺伝子変異の頻度は TCGA データベース（文献 24）の数値を引用した．外側に変異パスウェイに相当する腸管上皮幹細胞ニッチシグナルを示す．

大腸癌変異パスウェイと腸管上皮幹細胞ニッチシグナルの重複は、浸潤先端や転移先などのニッチ因子が乏しい環境において選択的に増殖する上で、パスウェイ変異によるニッチ非依存的な増殖能獲得が肝要であることを示唆している。大腸癌から樹立したオルガノイドは一部のニッチ因子を省略した培養条件（EGF, Noggin, A83-01のみ）でも継続的に培養可能であることが実際に示されている[17]。しかしながら、発癌に伴う遺伝子変異や染色体異常、遺伝子発現変化が幹細胞のニッチ因子要求性にいかなる変化をもたらすかについては、患者腫瘍細胞の機能的解析を可能にする研究プラットフォームの欠如からこれまで明らかとなっていない。

そこで、第一章では大腸腫瘍の多様性を網羅し、様々な細胞生物学的解析に応用可能な機能的基盤を構築するため、良性病変や稀な組織型を含む多様な大腸腫瘍からオルガノイド樹立を試みた。さらに、樹立したオルガノイドに対して次世代シーケンス等による詳細な分子生物学的解析を行った。第二章では各大腸腫瘍オルガノイドの幹細胞ニッチ因子の要求性に着目し、第一章で得られた分子生物学的情報を基に、発癌過程における幹細胞ニッチ因子要求性の変容と分子生物学的プロファイルの関連について検討を行った。

第一章

ヒト大腸腫瘍オルガノイドライブラリの確立および統合的解析

1.1 目的

ヒト大腸上皮性腫瘍の多様性を網羅するべく種々の大腸腫瘍性病変からオルガノイド樹立を行った。樹立したオルガノイドによる患者腫瘍の組織学的再現性を検討するため、代表的な組織型を有する大腸癌オルガノイドの *in vitro*, *in vivo* における組織学的な検討を行った。また、各オルガノイドの分子生物学的解析として、次世代シーケンス（ターゲットリシーケンスあるいはエキソームシーケンス）による遺伝子変異解析，DNA コピー数解析，マイクロアレイによる網羅的遺伝子発現解析を行った。

1.2 方法

1.2.1 組織検体

東京大学腫瘍外科および慶應義塾大学医学部消化器内科において、書面による同意が得られた患者から、外科的切除検体あるいは内視鏡的生検によって正常粘膜組織および腫瘍組織サンプルの提供を受けた。一部の患者からはレファレンスゲノム DNA 解析のため、採血により血液サンプルを取得した。本研究は東京大学医学部倫理委員会（審査番号 G3553）および慶應義塾大学医学部倫理委員会（承認番号 20120057）の承認の上、施行された。

1.2.2 臨床検体からのオルガノイド樹立および維持培養

取得したサンプルを 4 °C の PBS に保存し、速やかにオルガノイド樹立を行った。正常粘膜検体については、鋭利な剪刀を用いて実体顕微鏡観察下に粘膜下組織を除去した後に 1 mm 片に細断した。粘膜片を PBS にて数回洗浄後、2.5 mM EDTA を添加した PBS 内にて 4 °C , 1 時間振盪し、上皮組織を基底膜より遊離させた。200 g にて遠心し、陰窩を含む上皮組織を回収した。ペレットをマトリゲル (BD) に懸濁し、48 well plate (Corning) の各ウェル中央に 25 μ l ずつドーム状にアプライした。

培養に使用する基礎培地には 10 mM HEPES (Life Technologies), 2 mM

L-alanyl-L-glutamine (GlutaMAX, Life Technologies), 1 × B27 サプリメント (Life Technologies), penicillin-streptomycin (Life Technologies), 10 nM Gastrin I (Sigma), 1 mM N-acetylcysteine (Wako) を添加した Advance DMEM/F12 (Life Technologies) を使用した. また, ニッチ因子として 50 ng ml⁻¹ mouse recombinant EGF (Life Technologies), 100 ng ml⁻¹ mouse recombinant Noggin (Peprotech), 10% R-Spondin1 conditioned medium [27], 50% Wnt-3A conditioned medium [16], 500 nM A83-01 (Tochris), 10 mM SB202190 (Sigma) を使用した. マトリゲルの重合後, Wnt-3A, R-Spondin1, EGF, Noggin, A83-01, SB202190 (WRENAS) を添加した基礎培地を各ウェルにつき 250 μl ずつアプラインした.

腫瘍組織については鋭利な剪刀を用いて細断し, PBS にて数回洗浄後, コラゲナーゼ/プロテアーゼカクテル (リベラーゼ TH リサーチグレード, Roche Life Science) を用いて 37 °C, 1 時間, 適宜ピペッティングを行いながら脱細胞処理を行った. 上清を回収した後, 遺残組織片を (TrypLe Express, Invitrogen) を用いて 37 °C, 20 分間酵素処理し, 再度上清を回収した. 遠心 (200 g) にて遊離組織細胞を回収し, 正常上皮細胞と同様にマトリゲルに懸濁後, 2 枚の 48 well プレートに接種した. 腫瘍オルガノイドの至適ニッチ因子条件を樹立前に予測することは困難であるため, 樹立時には WRENA ± S, ENA ± S, さらに大気濃度酸素 (20%) および低濃度酸素 (0.5%) を加

えた計 8 培養条件に細胞を分配した. 最も培養効率の優れた条件をその腫瘍オルガノイドにおける初期培養条件とし, 以降の解析に応じた必要量までそれぞれの腫瘍オルガノイドを増幅した.

1.2.3 オルガノイドおよびパラフィン切片の免疫染色

オルガノイド包埋パラフィンプロック作製は次の手順にて行った. オルガノイドを Cell Recovery Solution (BD) にてマトリゲルから回収し, PBS にて洗浄後, iPGell (Genostaff) に包埋し, 直ちに 4% パラホルムアルデヒドにて一晩固定を行った. 70% エタノールにて置換し, 以降一般的なパラフィンプロック, 切片作製および haematoxylin and eosin (H&E), Periodic acid-Schiff (PAS) 染色プロトコールに準じて染色を行った. 免疫染色の一次抗体にはマウス抗ヒト synaptophysin 抗体 (M7315, DAKO, 100 倍希釈), マウス抗ヒト cytokeratin-20 抗体 (NCL-L-CK20, Leica, 50 倍希釈), マウス抗ヒト CD44 抗体 (NCL-CD44-2, Leica, 100 倍希釈) を使用し, horseradish peroxidase (HRP) 標識抗マウス IgG 抗体 (414131F, Nichirei Biosciences) にて標識後, ジアミノベンジジン (DAKO) にて発色を行った.

オルガノイドのホールマウント染色は既報に準じて行った[16]. 一次抗体はラット抗 Integrin- α 6 抗体 (313601, Biolegend, 100 倍希釈), ヤギ抗 Chromogranin A 抗体 (sc-1488,

Santa Cruz, 100 倍希釈), ウサギ抗 MUC2 抗体 (sc-15334, Santa Cruz, 100 倍希釈) を使用し, Alexa Fluor 488 あるいは 568 標識抗ラット, ヤギ, ウサギ IgG 抗体 (Life Technologies) にて標識した. F アクチンの可視化には Alexa Fluor 647-Phalloidin (A22287, Life Technologies) を利用した. 染色したオルガノイドは共焦点レーザー顕微鏡 (SP8, Leica) にて観察, 撮影を行った.

1.2.4 大腸癌オルガノイドの異種移植

超免疫不全マウス (NOD/Shi-scid, IL-2R^{gnull} : NOG マウス, 7-12 週齢, 雄) を公益財団法人実験動物中央研究所より入手した[28]. オルガノイドの *in vivo* における患者腫瘍の組織学的再現性を検討するため, 高分化腺癌オルガノイド, 中分化腺癌オルガノイド, 低分化腺癌オルガノイド, 神経内分泌癌オルガノイド, 粘液癌オルガノイドを各 1 ラインずつ選択し, 必要量まで増幅した. Cell Recovery Solution を用いてマトリゲルを溶解しオルガノイドを回収後, マトリゲル 1 μ l あたり 1×10^4 個の細胞密度となるようにマトリゲルに懸濁した.

移植に用いるマウスにイソフフランによる全身麻酔をかけた後, 左側腹部の剃毛を行い, 鋭利な剪刀を用いて左腎直上に約 10 mm の斜切開をおき開腹した. 周囲を圧迫し左腎を体外に露出させ, 0.5 ml インスリン皮下注射用シリンジ (テルモ) を用い

て腎下極外側の被膜下に 10 μ l (1×10^5 細胞相当) のオルガノイド浮遊マトリゲルを注入した。腎臓を腹腔内に還納し、4-0 シルクにて層々に閉創、手技を終了した。

移植後 2 ヶ月目に解剖し、左腎を摘出した。摘出した臓器は直ちに 4% パラホルムアルデヒドにて固定し、以降の組織学的解析に使用した。本動物実験は慶應義塾大学医学部動物実験センターの承認（承認番号 12012）を得た上で施行された。

1.2.5 マイクロサテライト不安定性解析

樹立した大腸癌オルガノイドより QiaAmp Blood mini kit (Qiagen) を用いてゲノム DNA を抽出した。解析に用いたマイクロサテライト領域およびプライマーは既報[29]に準じ、ExTaq (Takara) を用いて PCR 増幅を行った。PCR 産物長は PRISM310 ジェネティックアナライザ (ABI) にて取得し、Peak Scanner Software (ABI) を用いて解析した。正常レファレンスとの比較において 5 つのマイクロサテライト領域のうち 2 つ以上に PCR 産物長の不等を認めた場合にマイクロサテライト不安定 (Microsatellite Instability : MSI) とし、それ以外をマイクロサテライト安定 (Microsatellite Stable : MSS) とした[30]。

1.2.6 オルガノイドの網羅的遺伝子発現解析

培養安定期（樹立後 4–6 週）のオルガノイドより RNA plus mini kit（Qiagen）を用いて RNA を抽出した。RNA の品質は RNA6000 Nano Assay (Agilent) にて RNA Integrity Number (RIN) として数値化され、RIN が 7.0 以上のサンプルを解析に利用した。大腸腫瘍オルガノイド 52 サンプルおよび正常大腸上皮オルガノイド 7 サンプルの遺伝子発現をマイクロアレイ（Prime View Human Gene Expression Array, Affymetrix）を用いて取得した。得られたデータは R の `affy` パッケージに内蔵されている Robust Multi-array Analysis (RMA) 法を用いて正規化した。本解析過程の途中でハイブリダイゼーションバッファーの変更に伴うデータ変動 (batch effect) を認めたため、R の `sva` パッケージに内蔵されている ComBat algorithm を用いて batch effect の除去を行った[31]。

1.2.7 遺伝子発現に基づいた大腸癌オルガノイドサブタイプ解析

既報の解析手法[32, 33]および R Bioconductor を用いて、遺伝子発現に基づいた大腸癌オルガノイドのサブタイプ分類法を構築した。原発巣・転移巣オルガノイドのセットについては転移巣オルガノイドのデータを採用し、大腸腫瘍オルガノイド 45 例の遺伝子発現データを解析に使用した。遺伝子発現データはプローブレベル（データ間で標準偏差 > 0.5 の変動）および遺伝子発現レベルでのフィルタリングを行った。コ

ンセンサスクラスタリングには Bioconductor の ConsensuClusteringPlus パッケージ (Ward.d linkage and Pearson correlation efficient distance algorithm) を使用し[34], 反復試行 1000 回および再抽出比 0.98 の条件下にクラスタリングを行った. クラスター数 $k=5$ の条件下で最も明瞭にクラスタリングされ, 45 サンプルのうち 36 サンプルにおいてシルエット値 > 0 となった. この 36 サンプルについて R の Significance Analysis of Microarrays (SAM) パッケージを用いて 4742 個の変動遺伝子群 ($FDR \leq 0.01$) を抽出した. 各クラスターの重心座標は R の Prediction Analysis for Microarrays (PAM) パッケージを用いて求め, 798 遺伝子 (centroid value ≥ 3) あるいは 210 遺伝子 (centroid value ≥ 4) を各クラスターにおける特徴的遺伝子とした. 後者の遺伝子群による遺伝子発現ヒートマップを R の hclust 関数 (Ward. d linkage, Euclidian distance) を用いて作成した. 得られたデータの妥当性検証として, クラスター1 (MSS 大腸癌サブタイプ), クラスター3 (MSI 大腸癌サブタイプ), クラスター4 (腺腫サブタイプ) に特徴的な遺伝子群を遺伝子データセットとし, 既存の臨床サンプル遺伝子発現データ (GSE37364, GSE4554, GSE30540) を用いて Gene Set Enrichment Analysis (version 2.0, Broad Institute) を行った[35-37]. 大腸癌コンセンサス分類に基づいたサブタイピングは R の CMSclassifier パッケージ[38]を用いて行った.

1.2.8 オルガノイドの遺伝子変異解析

オルガノイドを必要量まで増幅後、QiaAmp Blood mini kit (Qiagen) を用いてゲノム DNA を抽出した。RNase Cocktail (Ambion) を用いて RNA の除去を行い、DNA サンプルの品質をアガロースゲル電気泳動にて確認した。計 3 μ g の DNA を断片化し、ターゲットリシーケンスあるいは全エキソームシーケンス解析を行った。ターゲットリシーケンス解析については Sure Select Target Enrichment kit (Agilent) を用いてシングルエンドライブラリを作製し、次世代シーケンサー (GAIIx, Illumina) にて配列を取得した。ニッチシグナルに關与する遺伝子群および既存データベースにて大腸癌において高頻度で認められる変異遺伝子群をピックアップし、解析を行った (表 1)。

エキソームシーケンスについては SureSelect Human All Exon V5 kit (Agilent) を用いてペアエンド用のライブラリを作製し、HiSeq2500 (Illumina) にてシーケンス解析を行った。得られた fastq ファイルは Burrows-Wheeler Aligner (version 0.6.1) を用いてヒトレファレンスゲノム配列上 (GRCh37, hg19) にマッピングした。Genome Analysis Toolkit (GATK, version 1.6.13) を用いてリードの再アライメント、補正を行った。体細胞変異すなわち単塩基置換、塩基欠損および挿入は GATK UnifiedGenotyper にて検出した。単塩基置換については一塩基多様性データベースに登録されている多型、具体的には dbSNP build における build 131 以下および 1000 人ゲノムプロジェクトに

において 5%以上の頻度で認められるバリエントを除外した。正常粘膜オルガノイドあ

るいは血液検体と比較可能なサンプルについては、対象正常ゲノムにおけるアレル頻

度 > 0.08 のバリエントをさらに除外した。

ABCA1	ASPM	CAMSAP1	CUTL1	FAT4	GSK3B	KIAA2022	MGAT4C	NRXN3	PIK4CB	RUNX1T1	TCF1	ZNF442
ABCA12	ASTN2	CASP14	CX40.1	FBN2	GUCY1A2	KIF16B	MGC20470	NSD1	PKHD1	RYR2	TCF3	ZNF521
ABCB11	ATF2	CASP8	CYLD	FBXW7	HAPIP	KIT	MIER3	NTNG1	PKNOX1	SACS	TCF7L2	ZNF568
ABL1	ATM	CD109	DAXX	FERD3L	HAPLN1	KRAS	MKRN3	NTRK3	PLB1	SCN3B	TECTA	ZNHIT6
ABLIM2	ATP11A	CDC27	DCLK1	FES	HIF1A	LAF4	MLH1	NUMA1	PLCG2	SDK1	TEX14	ZNRF3
ACOT12	ATP13A1	CDC7	DLC1	FEV	HIST1H1B	LAMA1	MLL	NUP210	PML	SEC8L1	TGFBF1	
ACSL5	ATP13A5	CDH1	DMD	FGA	HMCN1	LAMA2	MLL2	OBSCN	PMS2L3	SEMA3D	TGFBF2	
ACVR1	ATP6V0D2	CDH10	DMXL1	FGFR1	HNF1A	LATS2	MLL3	ODZ1	POLE	SEMA3E	TGM3	
ACVR1B	ATR	CDH11	DNAH5	FGFR1OP	HRAS	LCN9	MLLT4	OR51E1	PPP2R1A	SFRS6	TIAM1	
ACVR1C	AURKA	CDH12	DNAH7	FGFR2	HRPT2	LCX	MMP2	OTOL1	PRDM9	SH3TC1	TIF1	
ACVR2A	AURKC	CDH2	DNMT3A	FGFR3	HUWE1	LEPREL1	MPL	P2RX7	PRKD1	SHANK1	TLR9	
ACVR2B	AXIN1	CDH22	DPP10	FGFR4	IDH1	LGR6	MRC2	PALB2	PRKDC	SHC4	TNN	
ACVRL1	BAI3	CDH9	DSCAML1	FIP1L1	IDH2	LIFR	MSH2	PAX3	PTCH	SIL	TP53	
ADAM10	BCL10	CDK12	DTNB	FLJ10404	IGF1R	LMO7	MSH3	PAX7	PTEN	SLC22A15	TPO	
ADAM11	BCL11A	CDK4	EDD1	FLJ13305	IGF2R	LRP1B	MSH6	PCDH11X	PTN	SLC29A1	TPR	
ADAM17	BCL2	CDK8	EDNRB	FLNC	IGFBP3	LRP2	MSI2	PCDH15	PTPN11	SLC9A9	TPTE	
ADAM19	Bcl2l1	CDKN2A	EGFR	FLT1	IGSF22	LRRK2	MYH11	PCDH9	PTPN12	SLITRK6	TRIM27	
ADAM21	BCL3	CDKN2C	ELF3A	FLT3	IKBKB	MAP1B	MYO16	PCDHA13	PTPRD	SMAD2	TRIM33	
ADAM29	BCL6	CDX2	EP300	FLT4	IRF2	MAP2	MYO18B	PCDHA9	PTPRS	SMAD3	TRIO	
ADAMTS12	BCL7A	CHL1	EPB41L3	FMN2	IRF4	MAP2K1	MYO1B	PCDHB5	PTPRU	SMAD4	TRPM6	
ADAMTS15	BCL9	CHR415SY	EPHA3	FN1	IRS4	MAP2K3	MYO3A	PCDHGB1	QRICH2	SMARCA4	TRRAP	
ADAMTS16	BCR	CIITA	EPHB6	FRAP1	ISGF10	MAP2K4	MYO5C	PCDHGB2	RAD51L1	SMARCB1	TSHR	
ADAMTS18	BMP7	CLSTN2	ERBB2	FREM2	ITGAE	MAP2K7	MYOHD1	PCDHGB6	RAF1	SMG1	TTK	
ADAMTS20	BMPR1A	CNTN4	ERBB3	FSCB	ITK	MAP3K1	MYST4	PDGFB	RARB	SMO	TTN	
ADAMTS5	BMPR1B	CNTNAP2	ERBB4	FSTL3	ITPR2	MAP3K11	NAP1L3	PDGFRA	RASGRF2	SMTN	UHRF2	
ADAMTS9	BMPR2	COL11A1	ERCC6	FYN	JAK1	MAP3K14	NAV2	PDGFRB	RB1	SORCS1	UQCRC2	
ADAMTSL3	BRAF	COL12A1	ERRF1	GALNS	JAK2	MAP3K4	NAV3	PDIK1L	RBM10	SORL1	VCAM1	
ADARB2	BRCA1	COL12A1	ETS1	GLI3	JAK3	MAP3K6	NELL1	PDK1	REG1A	SOX2	VHL	
AGC1	BRCA2	COL14A1	ETV5	GNA11	JUN	MAP7	NF1	PDZRN4	REL	SOX9	VPS13B	
AKAP12	BTB	COL1A1	EVH1	GNAQ	K6IRS3	MAPK10	NF2	PIK3C2A	RELN	SPAG17	WBSR17	
AKAP6	C10orf137	COL1A2	EYA4	GNAS	KCNJ5	MAPK14	NFASC	PIK3C2B	RET	SPANXN2	WDFY3	
AKT1	C13orf7	COL3A1	EZH2	GPC5	KCNQ5	MAPK8	NFE2L2	PIK3C2G	RICTOR	SPEG	WHSC1	
ALK	C14orf115	COL6A3	F8	GPC6	KDM5C	MAPK8IP2	NIN	PIK3C3	RNF17	SPRR2B	WNK1	
ANK1	C15orf2	CPAMD8	FACL6	GPHN	KDM6A	MCHR1	NLRP1	PIK3CA	RNF43	SRC	WT1	
ANK2	C1QR1	CREBBP	FAM123B	GPR112	KDR	MCM3AP	NOS3	PIK3CB	ROBO1	STAB1	WTX	
APC	C20orf71	CSF1R	FAM135B	GPR158	KIAA0182	MDM2	NOTCH1	PIK3CD	ROBO2	STK11	WWP1	
APOB	C8B	CSMD1	FAM22A	GRAF	KIAA0367	MDS1	NOTCH2	PIK3CG	ROS1	TAF2	YES1	
ARHGEF10	CACNA2D3	CSMD3	FAM22B	GRID1	KIAA0556	MEN1	NOTCH3	PIK3R1	RPL22	TBX22	ZEB2	
ARID1A	CACNG7	CTNNA1	FAT2	GRIK3	KIAA1409	MET	NPM1	PIK3R4	RPS6KA3	TCERG1	ZNF19	
ARID2	CADPS	CTNNA1	FAT3	GRM1	KIAA1804	METTL3	NRAS	PIK4CA	RUNX1	TCERG1L	ZNF262	

表1 ターゲットリシーケンスに用いた遺伝子リスト

ターゲットリシーケンスに使用した遺伝子を一覧にした。後述する主要なパスウェイ
遺伝子変異をハイライトした (Wnt 経路 : 赤, EGFR 経路 : 橙, TGF- β /BMP 経路 : 緑,
その他 : 青)

1.2.9 DNA コピー数解析

Comparative Genomic Hybridization (CGH) /Single Nucleotide Polymorphism (SNP)

アレイ (CytoScan HD, Affymetrix) を用いてオルガノイドゲノム DNA のコピー数解析を行った。解析には 1 μ g のゲノム DNA を利用した。得られたデータはコピー数解析ソフト (Nexus7, BioDiscovery) を用いて可視化した。

1.3 結果

1.3.1 ヒト大腸腫瘍オルガノイドライブラリの確立

従来ヒト大腸腫瘍組織からのオルガノイド樹立に際し、コラゲナーゼ／プロテアーゼにて処理した検体組織を単一のニッチ因子条件 (EGF, Noggin, A83-01, SB202190) にて培養を開始していたが[17], 特に高度進行癌や稀な組織型からの樹立効率の低さが難点であった. 多様な大腸腫瘍からのオルガノイド樹立を行うためにはこのボトルネックを解消する必要があるため, 第一にオルガノイド樹立効率向上のためのプロトコール改変を行った. まず検体からの脱細胞化の段階で, コラゲナーゼ／プロテアーゼ処理後の組織片に腫瘍細胞が少なからず残存していることが判明し, 遺残組織をトリプシンで追加処理することで間質内に浸潤している腫瘍細胞を効率的に回収可能であることを見出した. さらに, 一部の腫瘍オルガノイドにおいて Wnt-3a/R-Spondin1 への依存性や SB202109 添加による増殖阻害, 低酸素下での選択的増殖が認められたため, これら因子の有無に相当する計 8 条件に組織細胞を分配することで, 至適ニッチ条件を網羅することが可能となった. 以上の改良点によってサンプリングエラーや壊死傾向が強い検体などの例外を除き, 大腸腫瘍組織からの確実なオルガノイド樹立が可能となった (図 5).

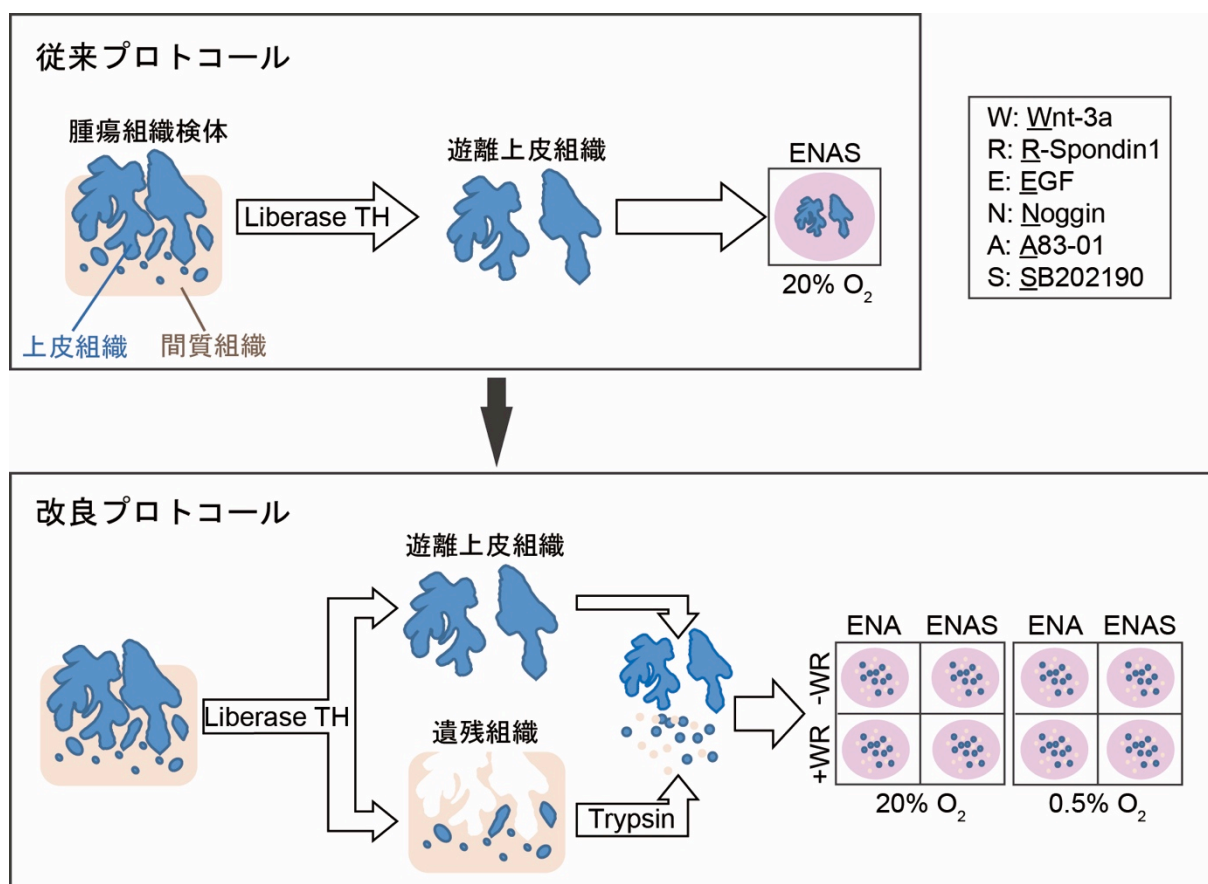


図5 腫瘍組織からのオルガノイド樹立プロトコールの改変

検体処理時にトリプシン処理を追加し、培養条件を8条件に増やすことで、従来法では培養困難であった大腸腫瘍症例からのオルガノイド樹立が可能となった。

改良樹立プロトコールを用い、内視鏡下生検あるいは外科的切除検体より系統的に大腸腫瘍オルガノイド株を樹立した。ヒト大腸腫瘍の多様性を網羅するため、腺腫や鋸歯状病変等の良性腫瘍検体、および粘液癌等の稀な組織型や転移性腫瘍を含む大腸癌検体から、幅広くサンプルを取得した。一部のサンプルについては同一腫瘍の異なる区画より個別にオルガノイド樹立を行った。最終的に 44 患者、52 腫瘍より計 55 オルガノイド株の樹立に成功し、ヒト大腸腫瘍オルガノイドのライブラリへと統合した。検体採取部と近接した部位の病理診断に基づいてオルガノイドの組織型を決定し、原発性腫瘍より樹立したオルガノイド 49 例の組織型内訳は管状腺腫 11 例、管状絨毛腺腫 1 例、過形成性ポリープ 1 例、sessile serrated polyp/adenoma (SSA/P) 2 例、高分化腺癌 8 例、中分化腺癌 17 例、低分化腺癌 2 例、粘液癌 2 例、神経内分泌癌 2 例、不明 3 例であった。転移性腫瘍からは 6 例のオルガノイドを樹立した (図 6)。ほぼ全てのオルガノイドについて患者臨床情報が入手可能であり、病期や病変部位等の臨床データとの紐付けを行った。組織型に応じた略称 (腺腫 : Ad, 鋸歯状病変 : SL, 大腸癌 : CRC) に患者番号を付記しものを各オルガノイドの呼称とし、全オルガノイドの組織学的情報および臨床データをリスト化した (表 2)。

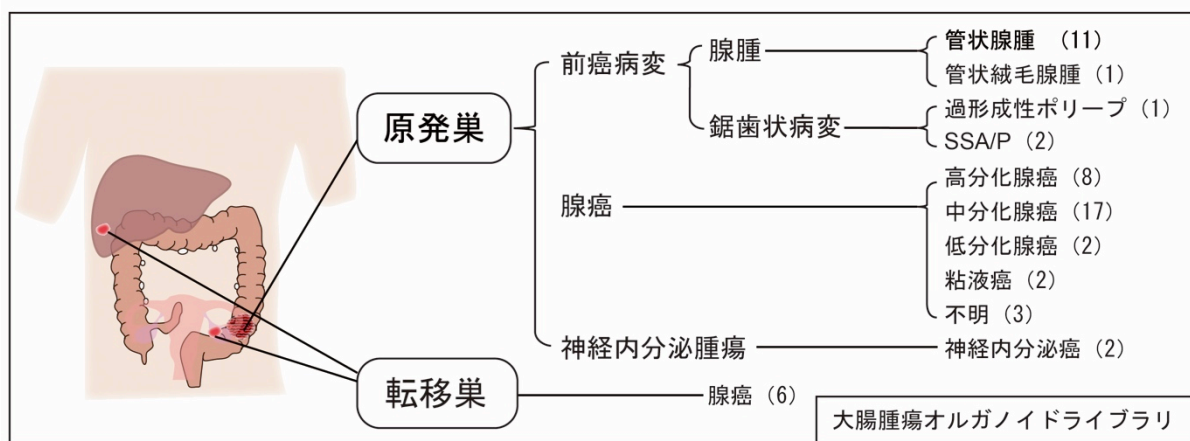


図 6 大腸腫瘍オルガノイドライブラリの組織学的内訳

計 55 ラインから成る大腸腫瘍オルガノイドライブラリを確立した。組織型は検体採取近接部の組織診断より判断し、各組織型のオルガノイドライン数を括弧内に示す。

		検体種	組織型	部位	性別	前治療	年齢	ステージ	注釈
腺腫	Ad1	E	TA	A	F		37		
	Ad2	E	TA	A	F		40		
	Ad3a	E	TA	R	M		49		Ad3a、3bは同一のFAP患者より樹立した
	Ad3b	E	TA	R	M		49		
	Ad4a	E	TA	A	F		20		Ad4a、4bは同一のFAP患者より樹立した
	Ad4b	E	TA with SD	S	F		20		
	Ad5	E	TA with SD	S	F		28		
	Ad6	E	TA with SD	T	F		26		
	Ad7	E	TA with SD	T	M		47		
	Ad8	E	TA with SD	S	M		82		Ad8とCRC9は同一患者より樹立した
	Ad9	E	TA with SD	C	M		69		
	Ad10	E	TVA	R	M		50		
鋸歯状病変	SL1a	E	SSA/P	A	F		68		SL1a、1bはHPとSSA/Pを含む単一病変より樹立した
	SL1b	E	HP						
	SL2	E	SSA/P	T	M		65		
大腸癌	CRC1a	E	well	A	M		84	I	CRC1a、1bは同一患者の異なる大腸癌病変より樹立した
	CRC1b	E	well	D				I	
	CRC2	E	well	T	M		69	I	
	CRC3	E	well	S	F		80	I	
	CRC4	E	well	R	M		79	I	
	CRC5	E	well	D	M		58	I	
	CRC6	E	mod	R	M		68	II	
	CRC7	E	mod	S	M		85	II	
	CRC8	E	mod	C	F		81	II	
	CRC9	E	mod	R	M		82	II	Ad8とCRC9は同一患者より樹立した
	CRC10	E	mod	R	M		76	II	
	CRC11	S	mod	C	M		75	II	
	CRC12	S	mod	A	M		45	II	
	CRC13	S	muc	T	F	+	70	II	前治療：modified FOLFOX6 + Cetuximab
	CRC14	S	NEC	C	F		56	II	
	CRC15	S	por	T	F		84	II	
	CRC16	S	mod	S	M		77	III	
	CRC17a	S	por, mod	A	M		82	III	CRC17は異なる組織像が混在しており、樹立後の形態に基づいて17a（中分化腺癌）、17b（低分化腺癌）にサブクローニングした
	CRC17b	S	por, mod						
	CRC18	S	muc	C	F		70	III	
	CRC19	E	NEC	R	M		85	IV	
	CRC20	E	mod	R	F		67	IV	
	CRC21	E	mod	S	M		68	IV	
	CRC22	E	mod	D	F		59	IV	
	CRC23a	S	mod	R					CRC23aは原発巣の肛門側部分、23bは口側部分より樹立した 23cは同時性肝転移より樹立した
	CRC23b	S	mod	R	M		72	IV	
	CRC23c	S	mod	LM					
	CRC24a	S	mod	R					CRC24aは原発巣の表在部、24bは深部より樹立した 25cは同時性肝転移より樹立した
	CRC24b	S	mod	R	F		48	IV	
	CRC24c	S	mod	OM					
	CRC25a	S	mod	T	M	+	50	IV	前治療：modified FOLFOX6 + Cetuximab CRC25aは原発巣、CRC25bおよび25cはそれぞれ異なる同時性肝転移より樹立した
	CRC25b	S	mod	LM					
	CRC25c	S	mod	LM					
	CRC26a	S	well	R	F		66	IV	CRC25aは原発巣、25bは同時性肝転移より樹立した
	CRC26b	S	well	LM					
	CRC27	E	well	D	M		80	IV	
	CRC28	S	mod	LM	M	+	63	IV	前治療：FOLFIRI + Bevacizumab
	CRC29	S	NA	NA	M		NA	II	
	CRC30	S	NA	NA	F		NA	II	
	CRC31	S	NA	NA	M		NA	II	

表 2. 大腸腫瘍オルガノイドライブラリの臨床情報

樹立を行った全オルガノイドおよび付随する臨床情報を一覧にした。同一患者より複数のオルガノイドを行った場合や術前治療の内容等の注釈を右端列に記す。各項目の略については次の通り。

検体種：E（内視鏡下生検），S（外科的切除検体）

組織型：TA（管状腺腫），TA with SD（高度異型管状腺腫），TVA（絨毛管状腺腫），SSA/P（sessile serrated adenoma/polyp），HP（過形成性ポリープ），well（高分化腺癌），mod（中分化腺癌），por（低分化腺癌）

部位：A（上行結腸），T（横行結腸），D（下行結腸），S（S状結腸），R（直腸），LM（肝転移），OM（卵巣転移）

性別：M（男性），F（女性）

N/A：不明

1.3.2 大腸癌オルガノイドの *in vitro*, *in vivo* 組織学的検討

樹立した大腸腫瘍オルガノイドを患者腫瘍の代替として活用する上で、由来する患者腫瘍の組織構造を忠実に再現することは極めて重要である。本項目では、まず高分化腺癌オルガノイド (CRC1a)、中分化腺癌オルガノイド (CRC7)、低分化腺癌オルガノイド (CRC15)、神経内分泌癌オルガノイド (CRC14) および粘液癌オルガノイド (CRC13) を用いて、オルガノイドによる患者腫瘍組織再構築能の評価を行った。

in vitro におけるオルガノイドの形態学的検討として、細胞骨格 (F-actin)、基底膜側細胞膜 (Integrin- α 6) の蛍光染色を行ったところ、いずれの大腸癌オルガノイドも各組織型の病理学的特徴を *in vitro* において再現することが可能であった。具体的には、高分化腺癌オルガノイドは単層からなる単一管腔構造を形成し、中分化腺癌オルガノイドには細胞の重層化、篩状構造が認められた一方で、低分化腺癌オルガノイドは管腔を伴わない充実構造を形成した。また、神経内分泌癌由来オルガノイドには ChromograninA で標識される神経内分泌細胞が認められ、粘液癌由来オルガノイドには管腔内に Mucin2 で標識される豊富な粘液産生が認められた (図 7)。

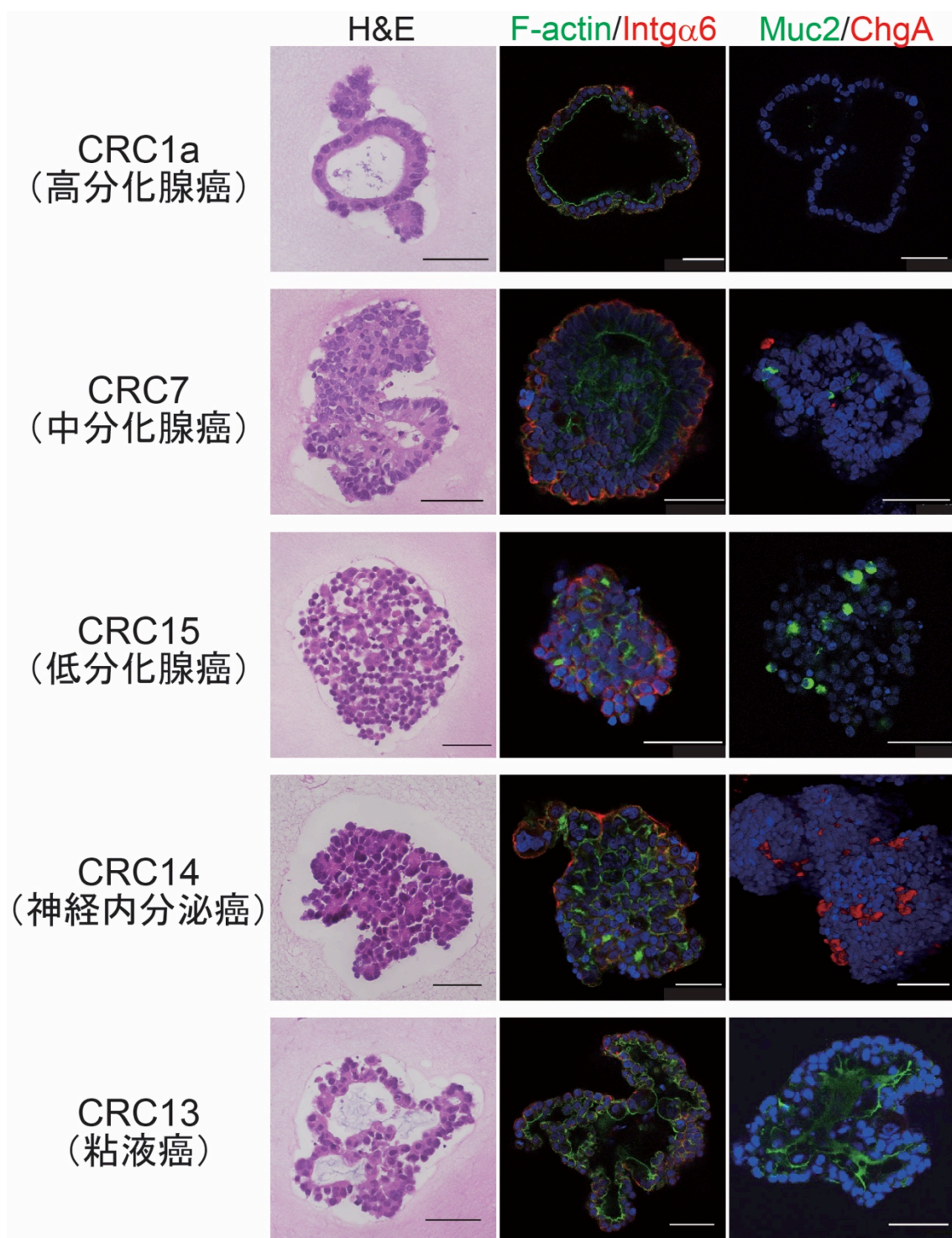


図7 組織型に基づいた *in vitro* におけるオルガノイド表現型

上段より高分化腺癌，中分化腺癌，低分化腺癌，神経内分泌癌，粘液癌オルガノイドの染色像を提示した．左列：H&E 染色，中列：F-actin および Integrin- α 6 染色によるオルガノイド形態像，右列：Mucin2，ChromograninA 免疫染色．各オルガノイドは由来する腫瘍の組織学的特徴を *in vitro* で再現することが可能であった．スケールバー：50 μ m.

続いて、同一のオルガノイドを用いて NOG マウスの腎皮膜下への異種移植を行い、生着腫瘍組織の組織学的検討を行った。その結果、いずれの大腸癌オルガノイドも患者腫瘍と構造的に極めて類似した腫瘍を *in vivo* において再構築することが可能であった。また、神経内分泌癌由来オルガノイドの移植組織は患者組織と同様に Synaptophysin のびまん性発現が認められ、粘液癌由来オルガノイドの移植組織には PAS 染色陽性の粘液が多量に認められた (図 8)。

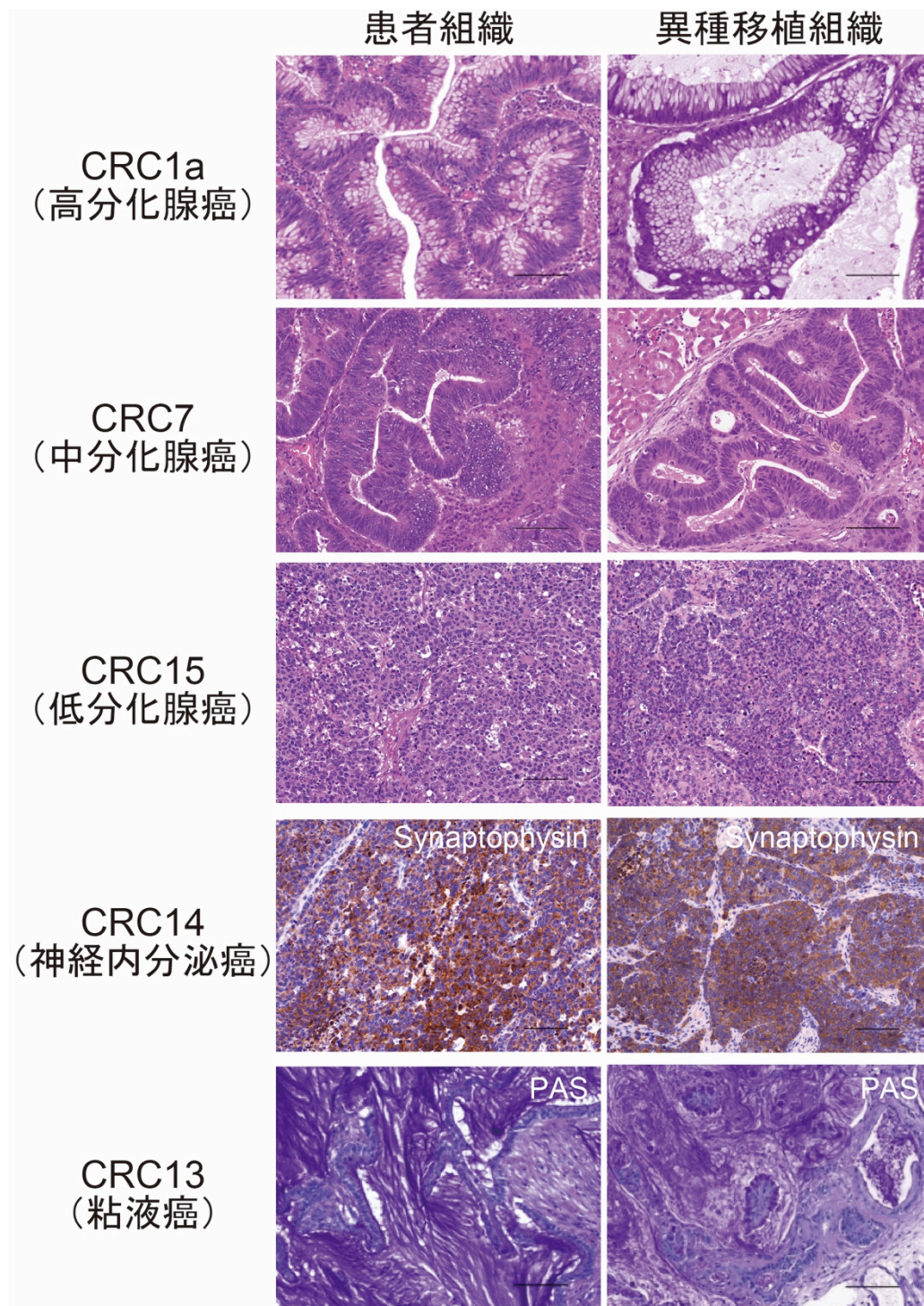


図 8 患者組織像およびオルガノイド異種移植組織像の比較

左段に患者組織，右段にオルガノイド異種移植組織の染色像を提示する．高分化腺癌，中分化腺癌，低分化腺癌オルガノイドについては H&E 染色像，神経内分泌癌オルガノイドについては Synaptophysin 免疫染色像，粘液癌については PAS 染色像を示す．いずれのオルガノイドも由来する患者組織と極めて類似した腫瘍組織を異種移植下に再構築可能であった．スケールバー：100 μm ．

患者腫瘍で認められる分化階層構造が培養中および移植腫瘍においても保持されているか検討するため、3例の中分化腺癌（CRC7, CRC20, CRC28）を対象とし、患者腫瘍組織、オルガノイドおよび移植腫瘍組織の CD44（未分化マーカー）と CK20（分化マーカー）の発現を免疫染色により検討した。その結果、CD44 の染色に乏しい 1 切片（CRC7 の移植腫瘍）を除き、患者腫瘍で認められた CD44 と CK20 の相互排他的な発現パターンはオルガノイドおよび移植腫瘍でも同様に確認され、分化階層構造は培養中、移植下においても保存されていることが示された（図 9）。

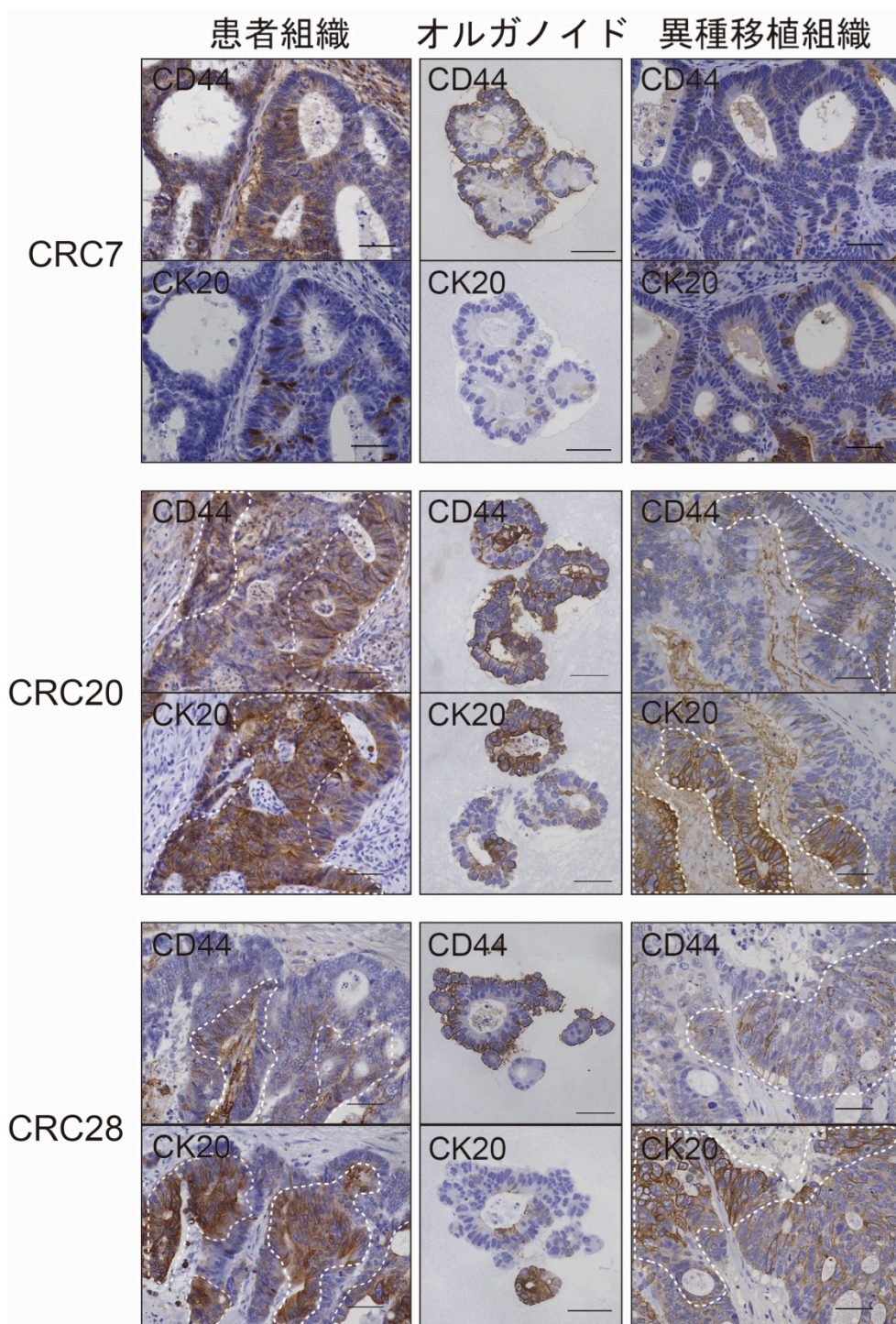


図9 患者組織、オルガノイド、異種移植組織における分化階層構造の検討

中分化腺癌オルガノイド3例における患者組織, オルガノイド, 異種移植組織のCD44、CK20免疫染色像を提示する。各切片において染色部位を白点線で示した。CD44染色に乏しい1切片（CRC7の異種移植組織）を除き、患者組織と同様のCD44とCK20の相互排他的な発現パターンがオルガノイドおよび異種移植組織において保持されている。スケールバー：50 μ m.

1.3.3 大腸腫瘍オルガノイドの遺伝子発現解析

オルガノイド培養では上皮細胞を非上皮性細胞の存在しない均一な条件下で培養するため、大腸腫瘍オルガノイドは腫瘍細胞が本質的に有する遺伝子発現パターンを呈すると考えられる。本項目では、組織型に基づいた大腸腫瘍オルガノイドの遺伝子発現パターン解析、ならびに既存の臨床サンプルデータとの相関を検討した。発現解析に先あたって全大腸癌オルガノイドを対象にマイクロサテライト解析を行い[29, 30], MSS 大腸癌オルガノイドおよび MSI 大腸癌オルガノイドに大別した。MSI は 7 例のオルガノイド (CRC11, CRC12, CRC13, CRC15, CRC17a, CRC17b, CRC18) に認められ、いずれも右側結腸大腸癌より樹立を行った株であった。

大腸腫瘍オルガノイド 52 例および正常大腸上皮オルガノイド 7 例より RNA を抽出し、マイクロアレイによる網羅的遺伝子発現解析を行った。本解析に使用したオルガノイド株および解析手法を表 3 に示す。

		Gene expression	Classification
腺腫	Ad1	×	×
	Ad2	○	○
	Ad3a	○	○
	Ad3a	○	○
	Ad4a	○	○
	Ad4b	○	×
	Ad5	○	○
	Ad6	○	○
	Ad7	○	○
	Ad8	○	○
	Ad9	○	○
	Ad10	○	○
鋸歯状病変	SL1a	○	○
	SL1b	○	○
	SL2	○	○
正常粘膜	NL-Ad7	○	×
	NL-SL1	○	×
	NL-CRC5	○	×
	NL-CRC12	○	×
	NL-CRC24	○	×
	NL-CRC25	○	×
	NL-CRC31	○	×

		Gene expression	Classification
大腸癌	CRC1a	○	○
	CRC1b	○	○
	CRC2	○	○
	CRC3	○	○
	CRC4	○	○
	CRC5	○	○
	CRC6	○	○
	CRC7	○	○
	CRC8	○	○
	CRC9	○	○
	CRC10	○	○
	CRC11	○	○
	CRC12	○	○
	CRC13	○	○
	CRC14	○	○
	CRC15	○	○
	CRC16	○	○
	CRC17a	○	○
	CRC17b	○	○
	CRC18	○	○
	CRC19	○	○
	CRC20	○	○
	CRC21	○	○
	CRC22	○	○
	CRC23a	○	×
	CRC23b	○	×
	CRC23c	○	○
	CRC24a	×	×
	CRC24b	○	×
	CRC24c	○	○
	CRC25a	×	×
	CRC25b	○	○
	CRC25c	○	×
	CRC26a	○	×
	CRC26b	○	○
	CRC27	○	○
	CRC28	○	○
	CRC29	○	○
	CRC30	×	×
	CRC31	○	○

表 3. 遺伝子発現解析に使用したオルガノイドの一覧表

Gene expression の項目において○を記したオルガノイドを対象とし、マイクロアレイによる網羅的遺伝子解析を行った。遺伝子発現に基づいたオルガノイド分類に使用したオルガノイドについては Classification の項目に○を記した。また、解析に使用した7例の正常大腸上皮オルガノイドを左下に記載し、それぞれ NL (normal) の後に対となる腫瘍オルガノイド名を付記した。

主成分分析を用いて各オルガノイドの遺伝子発現データを三次元に集約したところ、正常大腸上皮オルガノイド、腺腫オルガノイド、鋸歯状病変オルガノイド、MSS大腸癌オルガノイド、MSI大腸癌オルガノイドおよび神経内分泌癌オルガノイドの遺伝子発現パターンは、それぞれ明確に区分される領域に分布した（図10）。

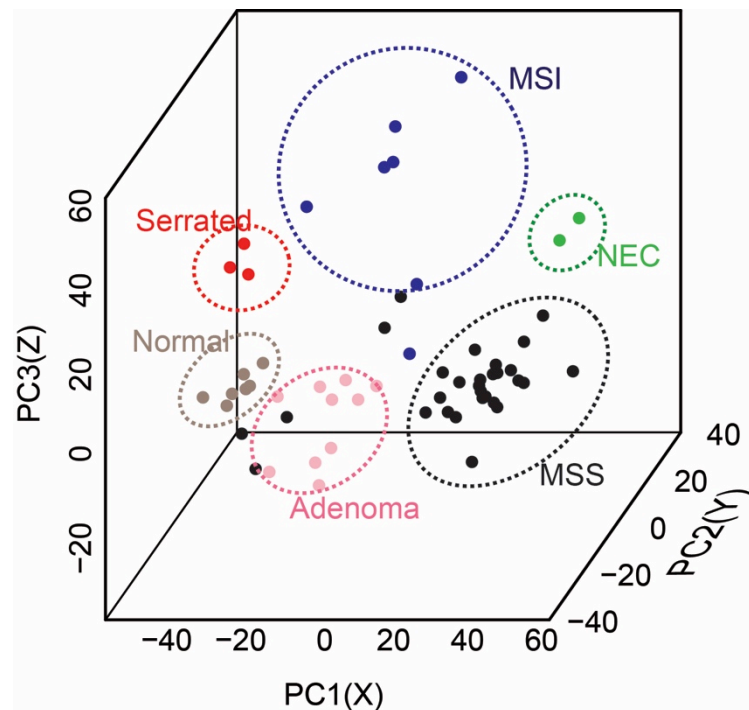


図10 主成分分析によるオルガノイド遺伝子発現の三次元プロット

第3主成分までを用いたプロットでは正常（Normal）、腺腫（Adenoma）、鋸歯状病変（Serrated）、MSS大腸癌（MSS）、MSI大腸癌（MSI）、神経内分泌癌（NEC）オルガノイドの遺伝子発現パターンを明確に区分することが可能であった。

コンセンサスクラスタリング解析[34]では 5 群へのクラスタリングにて最も明瞭に分離され、各クラスターは MSS 大腸癌オルガノイド（クラスター1）、鋸歯状病変オルガノイド（クラスター2）、MSI 大腸癌オルガノイド（クラスター3）、腺腫オルガノイド（クラスター4）、神経内分泌癌オルガノイド（クラスター5）によって特徴付けられるサブタイプとなった（図 11）。

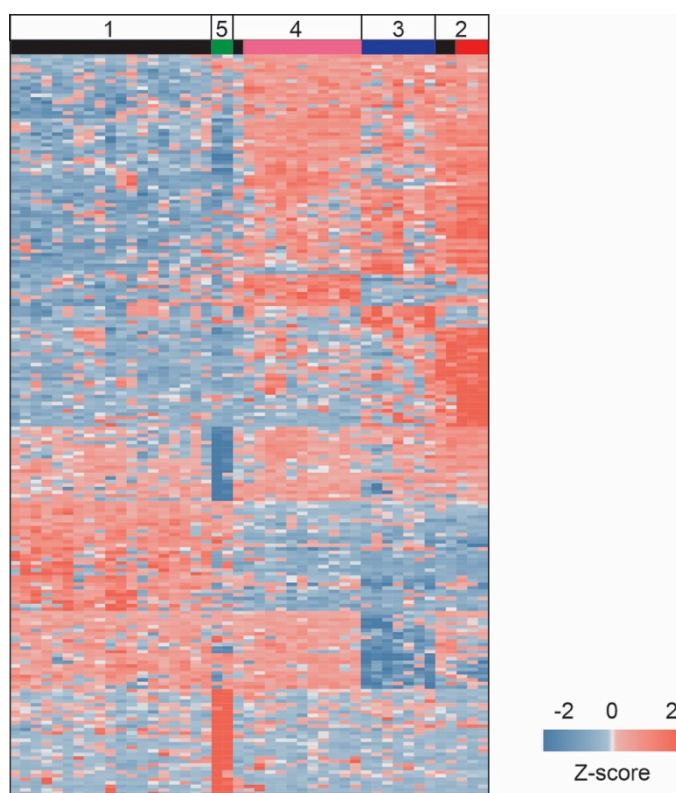


図 11 コンセンサスクラスタリングによるオルガノイド遺伝子発現分類およびヒートマップ

ボックス色は主成分分析で使用した色に相当する（桃：腺腫，赤：鋸歯状病変，黒：MSS 大腸癌，青：MSI 大腸癌，緑：神経内分泌癌）。一部の MSS 大腸癌を除き、各組織型オルガノイドは同一のクラスターに分布する（MSS 大腸癌：クラスター1，鋸歯状病変：クラスター2，MSI 大腸癌：クラスター3，腺腫：クラスター4，神経内分泌癌：クラスター5）。

オルガノイドの遺伝子発現データと既存の臨床サンプルデータとの整合性を検討するため、MSS 大腸癌オルガノイド、MSI 大腸癌オルガノイド、腺腫オルガノイドに特徴的発現が認められる遺伝子群を遺伝子セットとし、それぞれの腫瘍について既存の臨床サンプル遺伝子発現データを用いて Gene Set Enrichment Analysis (GSEA) を行った[39]。その結果、いずれの腫瘍においても臨床サンプルの遺伝子発現データはオルガノイド遺伝子セットの有意な変動を認め、オルガノイドと臨床サンプルの遺伝子発現パターンの整合性が示された (図 12)。

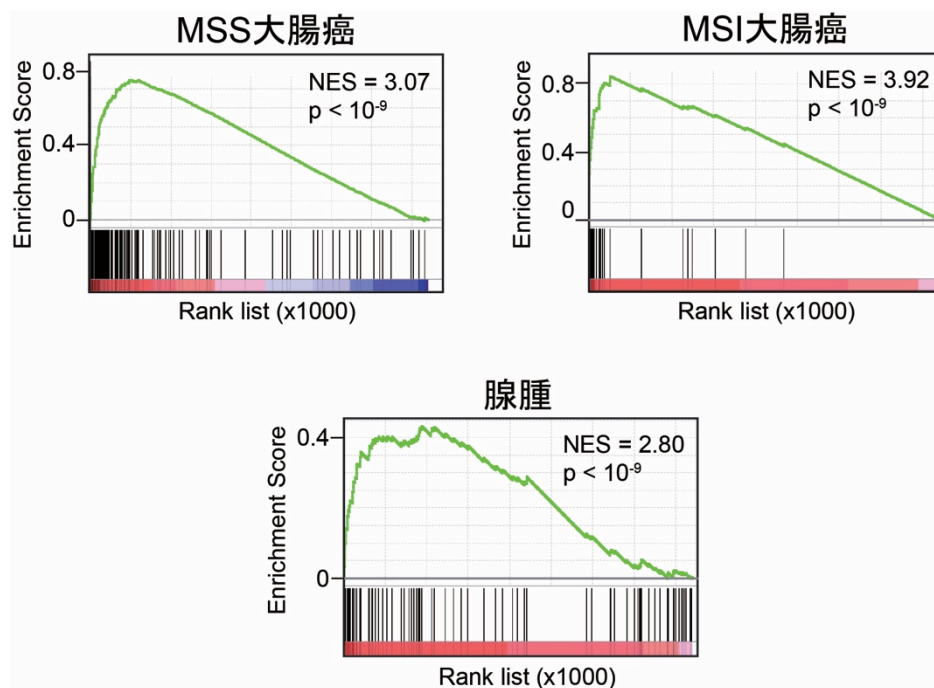


図 12 オルガノイド遺伝子セットおよび既存の臨床検体遺伝子発現データを用いた Gene Set Enrichment Analysis

MSS 大腸癌、MSI 大腸癌、腺腫いずれにおいてもオルガノイドと臨床検体の遺伝子発現パターンの有意な相関が認められる。NES : Normalized Enrichment Score.

大腸癌の遺伝子発現に基づいた分類法として、2015年に6つの既存大腸癌分類法[32, 33, 40-43]を統合したコンセンサス分類（Consensus Molecular Subtypes : CMS）が提唱されている[38]。この分類法では CMS1（MSI, 高メチル化, *BRAF* 遺伝子変異, 免疫反応が特徴的なサブタイプ), CMS2 (染色体異常が特徴的なサブタイプ), CMS3 (*KRAS* 遺伝子変異, 代謝異常が特徴的なサブタイプ), CMS4（間質細胞浸潤, TGF- β 活性化が特徴的で、最も予後不良なサブタイプ）の4つのサブタイプに大腸癌を階層化している。この分類法がオルガノイドにも応用可能か検討するため、コンセンサス分類で使用されたアルゴリズムを用いてオルガノイドの遺伝子発現データのサブタイプニングを行った。その結果、1例の分類不能例を除いた13例（34%）が CMS1, 23例（61%）が CMS2, 1例（3%）が CMS3 に分類されたが、コンセンサス分類において23%で認められた CMS4 はオルガノイドでは認められなかった（図13）。

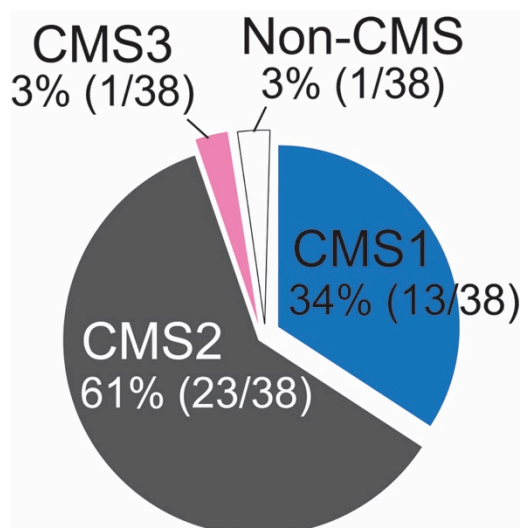
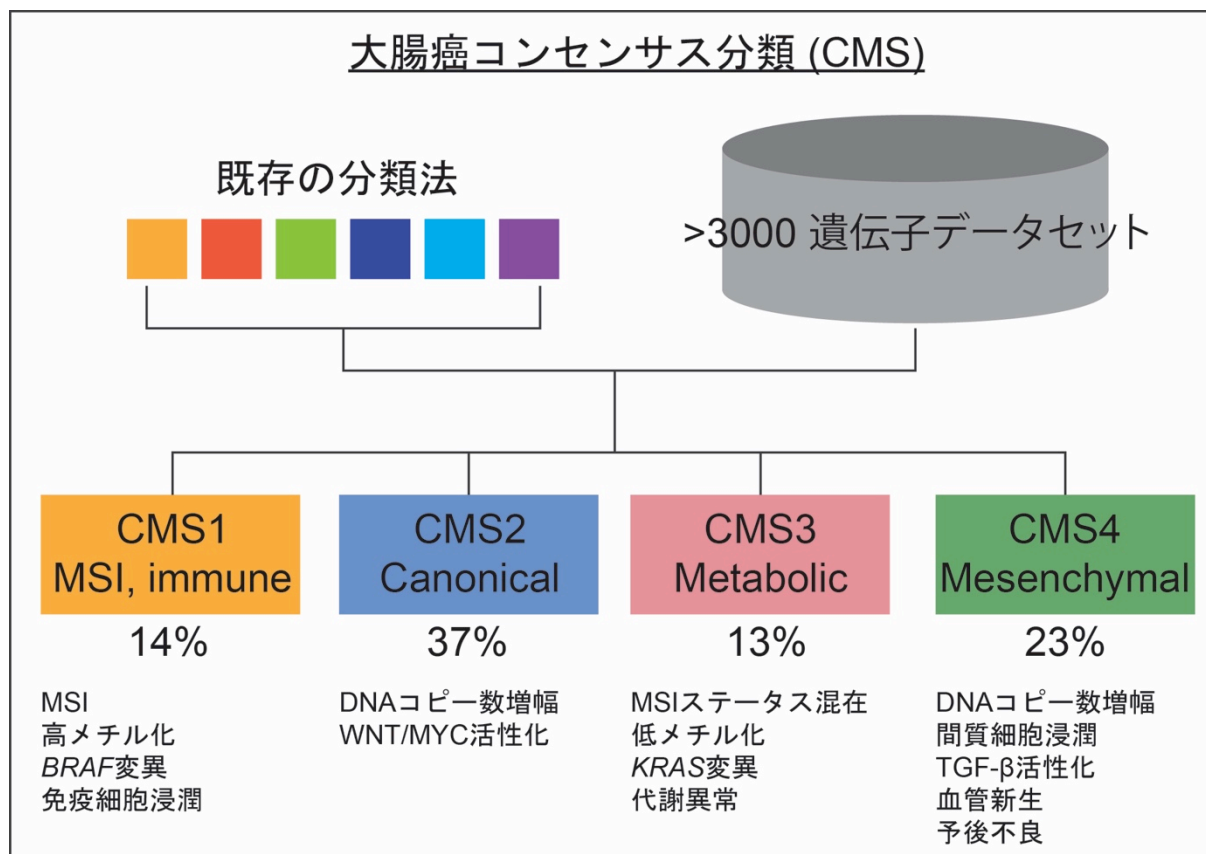


図 13 大腸癌コンセンサス分類に基づいたオルガノイドサブタイプ

上段：大腸癌コンセンサス分類の概要（文献 38 より改変）。下段：コンセンサス分類アルゴリズムを用いたオルガノイドのサブタイプ分類。間質細胞豊富で最も予後不良な CMS4 はオルガノイド遺伝子発現データでは認められなかった。

1.3.4 オルガノイドの遺伝子変異および染色体異常解析

大腸上皮性腫瘍は遺伝子変異の獲得に伴って進行するとされており、それぞれの腫瘍は多岐に渡る遺伝子変異の蓄積を伴う[21-24]。本項目では、まず大腸癌オルガノイドの遺伝子変異をターゲットリシーケンスあるいはエキソームシーケンスにて取得し、近年の大規模解析[25]における変異頻度との整合性を検討した。遺伝子変異パターンは MSS 大腸癌オルガノイドと MSI 大腸癌オルガノイドで大きく異なっており、MSI 大腸癌オルガノイドの特徴として *APC* 遺伝子変異、*TP53* 遺伝子変異の頻度が少なく、*BRAF* 遺伝子変異、*RNF43* 遺伝子変異、*PIK3CA* 遺伝子変異、*TGFBR2* 遺伝子変異、*ACVR2A* 遺伝子変異の頻度が多いといった特徴が認められた（図 14）。1 例の MSI 大腸癌オルガノイド（CRC12）には *hMLH1* 遺伝子変異が認められ、同時に樹立した正常大腸上皮オルガノイドにも *hMLH1* 遺伝子のヘテロ変異が認められた。この患者はアムステルダム基準 II[44]に基づいて臨床的に Lynch 症候群と診断されており、オルガノイドの遺伝子変異解析によってその診断が裏付けられる形となった。本ライブラリにおけるそれぞれの代表的遺伝子変異の頻度は TCGA データベースの頻度とほぼ同等であり、オルガノイド樹立および培養は特定の遺伝子変異に依存しないことが示された。

また、CGH/SNP アレイを用いた染色体異常解析では、MSS 大腸癌の大部分で大腸

癌に認められる代表的な染色体異常（13q, 20p の増幅および 18p, 17p の欠失）が認められた一方で，一部の MSS 大腸癌および MSI 大腸癌の大部分は 2 倍体であった（図 14）．

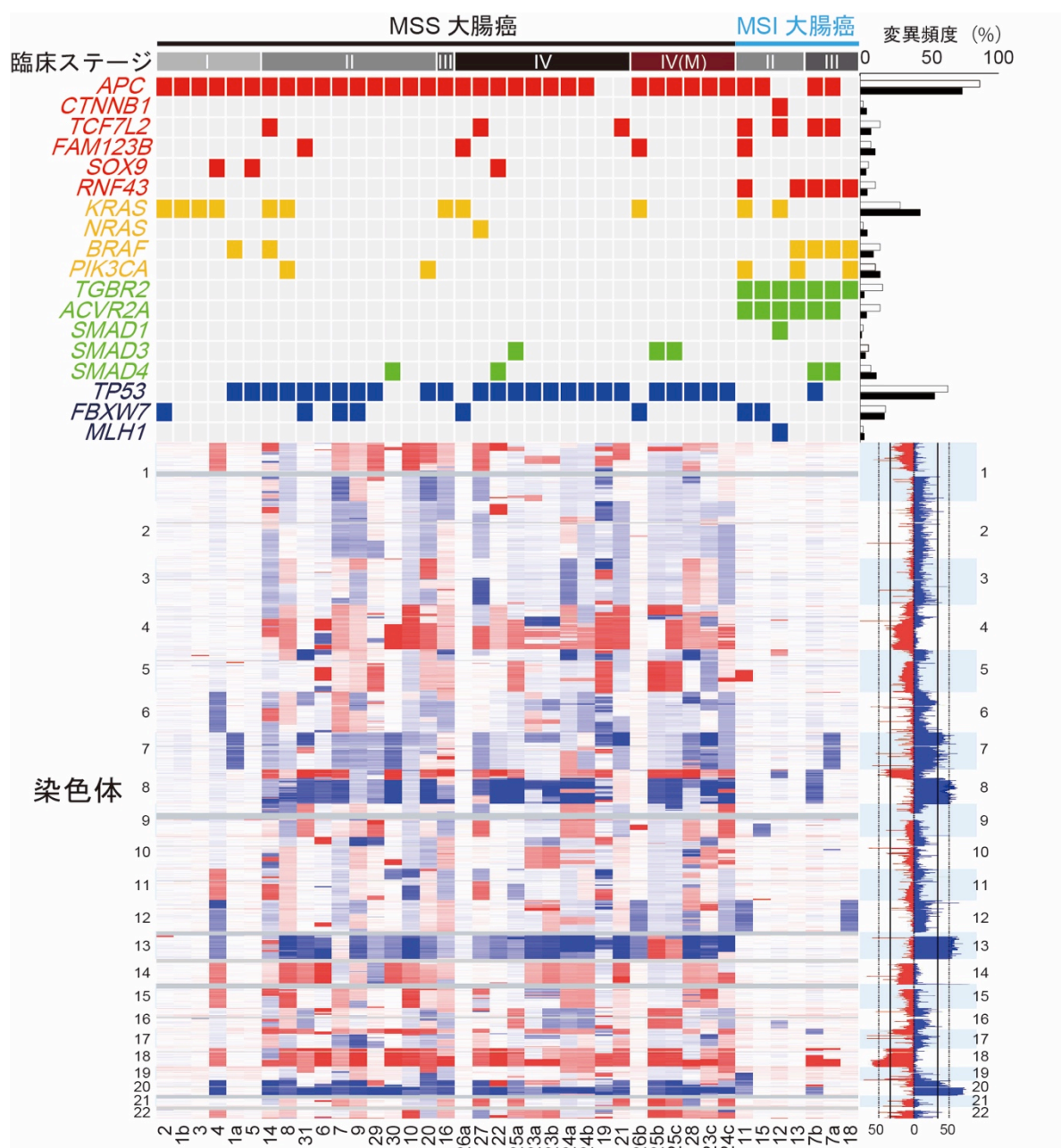


図 14 大腸癌オルガノイドの遺伝子変異スペクトラムおよび染色体異常

大腸癌オルガノイドの ID 番号を下に記す。

上段：大腸癌オルガノイドに認められた体細胞性変異をプロットした。当コホートでの変異頻度（白）および TCGA データベースにおける変異頻度（黒）を右に棒グラフで示す。

下段：SNP アレイデータを基にした染色体構造を示す。染色体の増幅を青，欠失を赤で表した。全オルガノイドにおけるシグナルの平均値を右に示す。

1 例の MSI 大腸癌 (CRC17) については樹立後に形態が全く異なる 2 タイプ (中分化腺癌類似タイプおよび低分化腺癌類似タイプ) のオルガノイドの混在を認めたため、それぞれを単離し培養を行った (CRC17a, CRC17b)。これらのオルガノイドは異種移植下においても中分化腺癌および低分化腺癌に相当する腫瘍を形成し、中分化腺癌成分および低分化腺癌成分をオルガノイドクローンとして分離し得たことが裏付けられた。個別に遺伝子変異解析を行ったところ、*p53* 以外の主要な遺伝子 (*APC*, *TCF7L2*, *BRAF*, *TGFBR2*, *SMAD4*, *RNF43*) 変異は共通して認められた一方で、それぞれのオルガノイドには固有の遺伝子変異が多数蓄積しており、腫瘍進展過程において癌化に寄与する主要な遺伝子変異 (ドライバー遺伝子変異) 獲得後早期の段階で分岐していることが示唆された (図 15)。

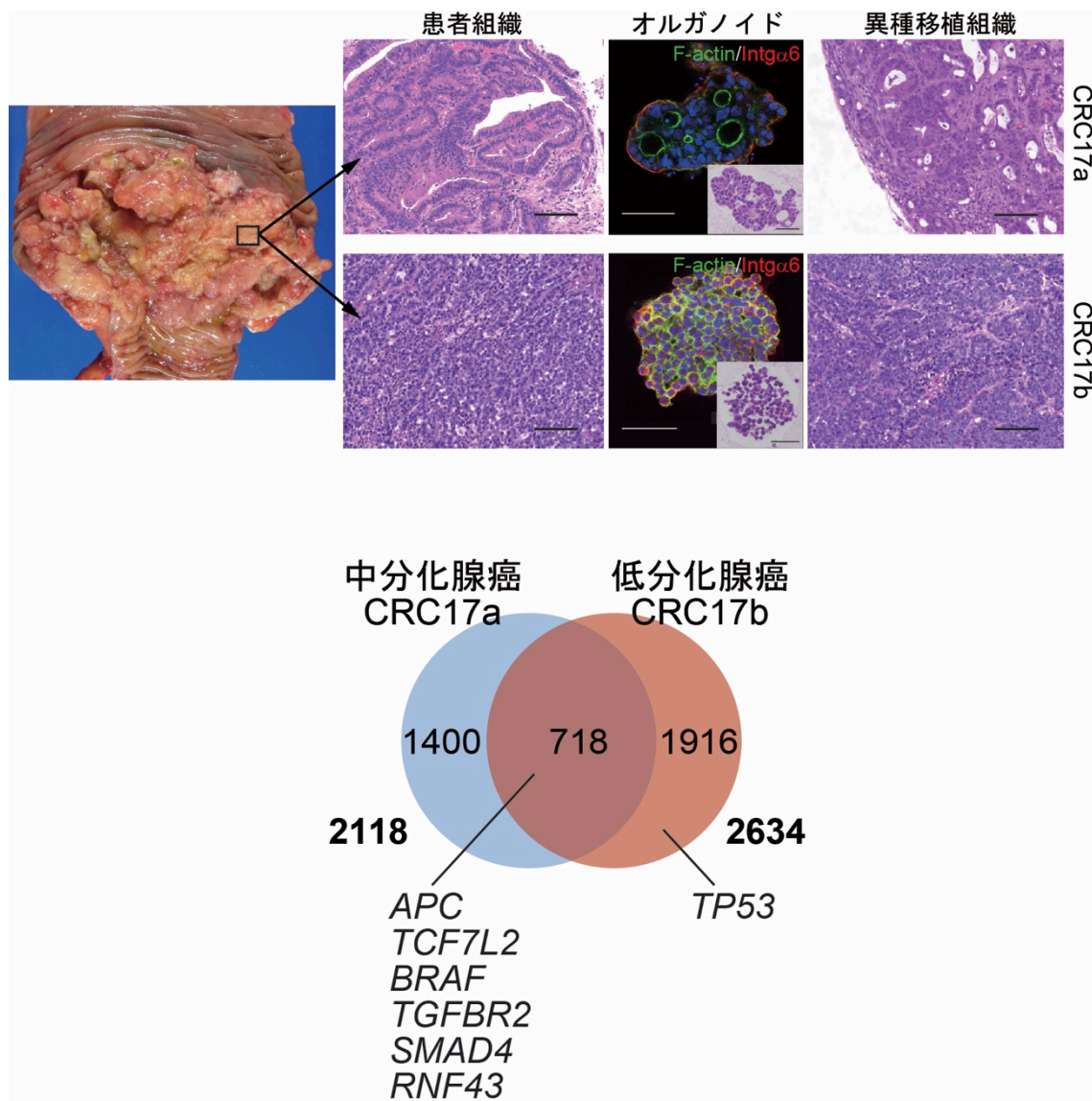


図 15 中分化腺癌・低分化腺癌の混在癌より得られた各組織型オルガノイドクローンの遺伝子変異比較

上行結腸癌の単一サンプルより形態が異なる 2 ラインのオルガノイドを樹立した。それぞれ 2000 以上の遺伝子変異が認められたが、共通しているものは約 700 のみであった。TP53 を除くドライバー遺伝子変異は共通していた。スケールバー: 100 μm (H&E 切片), 50 μm (オルガノイド)。

同一患者の原発巣・転移巣に由来するオルガノイド4組（CRC23, CRC24, CRC25, CRC26）について、遺伝子変異の比較検討を行った。それぞれの組においてドライバー遺伝子変異は全て共通していた一方で、固有の遺伝子変異については遺伝子変異データベース（COSMIC Database）に登録されているものは認められず、いずれも腫瘍学的に意義の乏しい変異（パッセンジャー変異）であることが示唆された（図 16）。この結果は臨床検体において原発巣、転移巣間で主要な遺伝子変異は共通しているというこれまでの報告[45, 46]と合致するものであった。

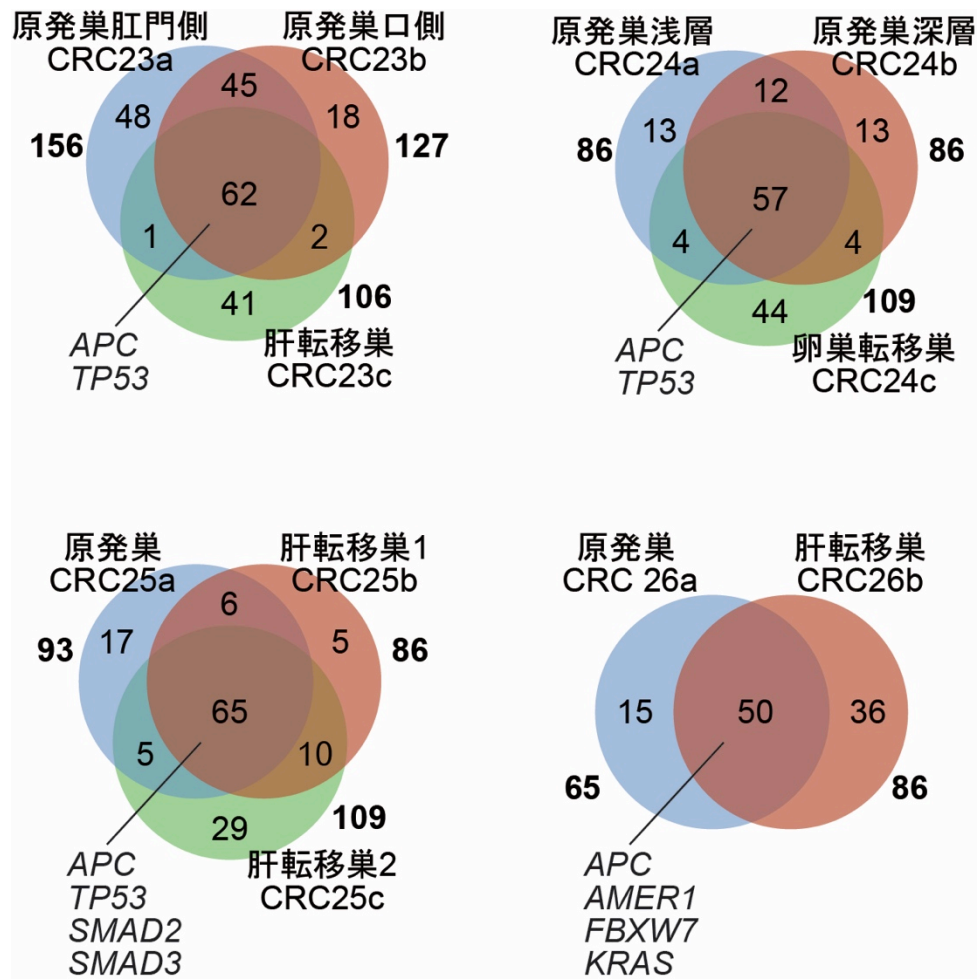


図 16 原発巣・転移巣オルガノイド間の遺伝子変異比較

原発巣，転移巣間ではドライバー遺伝子変異は全て共通していた．固有の遺伝子変異において，遺伝子変異データベースに掲載されているものは認められなかった．

1.4 考察

樹立プロトコールの改変によって、多様な大腸上皮腫瘍から成るオルガノイドライブラリを確立することに成功した。2015年に20例の大腸癌オルガノイドから構成されるバイオバンクの報告がなされたが[47]、この報告では臨床情報の記載はなく、またオルガノイドは原発性結腸癌から樹立したものに限定されていた。その一方で当ライブラリは良性腫瘍や粘液癌などの稀な組織型、直腸癌、転移巣など、バイオバンクにはない腫瘍オルガノイドを含む多彩なオルガノイドから構成されている。ほぼ全てのオルガノイドが詳細な臨床情報との紐付けがなされており、患者腫瘍組織由来の生物学的リソースとして、バイオバンクと比較し明確なアドバンテージを有するといえる。

また、大腸癌オルガノイドの *in vitro* 形態学的検討および遺伝子発現プロファイル解析の結果から、オルガノイドは患者組織の組織形態や遺伝子発現といった細胞生物学的な特徴を体外培養中も保持していることが明らかとなった。同様に、異種移植下においても患者組織像を再構築することが可能であり、これらの結果は *in vitro*, *in vivo* におけるオルガノイドの疾患モデルツールとしての妥当性を強く示唆するものであった。その一方で、オルガノイドの遺伝子発現データではコンセンサス分類における予後不良サブタイプが存在せず、臨床データとの乖離が認められた。この理由として、

第一にオルガノイドサンプルと臨床サンプルの性質差が挙げられる。オルガノイドは上皮細胞のみで構成され均一な組成の培地内で維持されているため、腫瘍細胞自体が本質的に有する遺伝子発現プロファイルを取得することが可能である。一方で、バルクの臨床腫瘍検体は上皮腫瘍細胞以外にも線維芽細胞や免疫細胞等の非上皮細胞の混入が少なからず認められることから、得られたデータが腫瘍細胞自体の特性をどの程度正確に投影しているかを考慮する必要がある。そのため、コンセンサス分類における予後不良サブタイプは間質細胞様の遺伝子発現パターンを呈するが、この特徴は腫瘍細胞の上皮間葉転換（Epithelial to Mesenchymal Transition: EMT）を反映しているのか、あるいはリクルートされた線維芽細胞の遺伝子発現に牽引されているのかを判断するのは難しい。予後不良な大腸癌サブタイプで認められる間質細胞様の遺伝子発現パターンは混入した線維芽細胞の遺伝子発現を反映しているという報告も近年なされており[48, 49], 高度進行癌を含む当オルガノイドライブラリにおいて間質様の遺伝子発現パターンが認められないという解析結果は、これらの報告を支持するものであった。しかしながら、本研究においては臨床検体を全てオルガノイド樹立に使用しており患者腫瘍のコンセンサスサブタイプが不明であるため、CMS4 に該当する大腸癌サンプルを入手できなかった可能性は否定できない。また、オルガノイド培養系には間質細胞や免疫細胞が存在しないため、これらの非上皮細胞に由来するシグナルに

より惹起される遺伝子発現パターンの再現は困難である。従って、今回の検討では大腸癌における EMT の有無を実証するには不十分であり、その検討には臨床サンプルとオルガノイドの遺伝子発現パターンの詳細な比較、さらには線維芽細胞と上皮細胞の共培養など、新規培養体系の確立が必要であると考えられた。

大腸癌オルガノイドの遺伝子変異および染色体異常解析では、MSS 大腸癌と MSI 大腸癌で全くことなる特徴が認められた。MSS 大腸癌の大部分で *APC* 遺伝子変異および染色体異常が認められ、これらの MSS 大腸癌は染色体不安定性 (Chromosomal instability) を伴い、腺腫を経て大腸癌に至る adenoma-carcinoma sequence を主体としていることが裏付けられた。しかしながら、MSS かつ 2 倍体の Stage IV 大腸癌が 1 例 (CRC26) 認められ、染色体異常自体は癌の進行や転移能の獲得には必須ではない可能性が示唆された。今回行ったゲノム解析はクローン化を行った 2 例 (CRC17a, CRC17b) を除いては単一臨床検体からオルガノイドを樹立、増幅したポリクローナルな細胞集団を対象としており、特に腫瘍細胞の生存や増殖への寄与が乏しいパッセンジャー変異の有無の確認や詳細な機能解析に際しては、単一細胞から培養を行い、クローナルなオルガノイドを用いる必要があると考えられた。

最終的には臨床情報および統合的な分子生物学的解析を通じてそれぞれの大腸腫瘍オルガノイドを明瞭に特徴づけることに成功し、生きた生物学的ツールとして非常

に高い価値を有するリソースを構築することが可能であった。当ライブラリはベッドサイドと有機的に結びついた機能的なプラットフォームであり、将来的な薬剤スクリーニング、標的治療や個別化治療への応用が期待される。

1.5 結論

培養プロトコールの改変によって大腸腫瘍からの効率的なオルガノイド樹立が可能となり，多様な組織型を含む大腸腫瘍オルガノイドライブラリを確立した．大腸腫瘍オルガノイドは培養中および異種移植下において，元の患者腫瘍の組織像を再構築した．網羅的遺伝子発現解析および遺伝子変異解析によって，当ライブラリの詳細な分子生物学的特徴づけが可能であった．

第二章

大腸腫瘍オルガノイドの細胞学的特性と幹細胞ニッチ要求性の連関

2.1 目的

腫瘍オルガノイドの最大の利点として、従来不可能であった患者腫瘍細胞の詳細な機能的解析が可能であることが挙げられる。これまで大腸腫瘍細胞が必要とする幹細胞ニッチについて検討した報告はなく、本章ではそれぞれの大腸腫瘍オルガノイドが増殖のために必要とするニッチ因子条件に着目し、第一章で得られたオルガノイドの分子生物学的特性とニッチ因子要求性の相関について検討した。さらに、異種移植モデルにおける大腸癌オルガノイドの局所増殖能および転移能を規定する因子について、ニッチ因子要求性を含めた細胞学的特性からのアプローチを行った。

2.2 方法

2.2.1 オルガノイドの至適ニッチ条件検討

それぞれの大腸腫瘍オルガノイドについて、初期培養条件より各増殖因子を一つずつ省いた培養条件下における増殖能を観察した。対象と比較して増殖能が低下した場合には、その増殖因子は必要なニッチ因子と判断された。増殖が阻害されない場合にはさらに別の増殖因子を省き、同様の検討を繰り返すことで増殖に必要十分なニッチ条件を導出した。また、嫌氣的解糖系の亢進に伴う低酸素下増殖能（Warburg 効果）は癌でしばしば認められる特徴の一つであり[50, 51]、低濃度酸素（0.5% 酸素）における増殖能の変化も検討に加えた。

2.2.2 EGF および p38 MAPK 阻害剤処理による EGFR タンパク発現変化の検討

腺腫オルガノイド（Ad3a）を対象とし、ウェスタンブロットおよびフローサイトメトリーを用いて EGF, p38 MAPK 阻害剤処理による EGFR 発現の変化を評価した。EGF 非処理群は解析 5 日前より EGF 非添加培地にて培養を行い、p38 MAPK 阻害剤非処理群は 2 日前より SB202190 を培地から除去した。各因子処理群はそれぞれの因子を添加した培地にて培養を継続し、さらに解析直前にそれぞれの因子を含む新鮮な培地に交換した。

ウェスタンブロットは一般的なプロトコールに従って泳動分離、ブロッティングを行い、ウサギ抗 ERK 1/2 抗体 (9102, CST, 1000 倍希釈で使用), ウサギ抗リン酸化 ERK 1/2 (Thr202/Tyr204) 抗体 (4370, CST, 1000 倍希釈で使用) および HRP 標識ヤギ抗ウサギ IgG 抗体 (AP307P, Millipore, 5000 倍希釈にて使用) にて標識した. ECL Select Western Blotting Detection Reagent (GE Healthcare) および Image Quant LAS 500 (GE Healthcare) を用いてシグナルを検出した.

フローサイトメトリーに使用するオルガノイドは TrypLE Express 処理を行った上で 20 μ m 細胞フィルターを通過させ、細胞塊を除去した. 細胞を PBS にて洗浄し、PE 標識マウス抗ヒト EGFR 抗体 (351903, BioLegend) にて標識した. 死細胞を 7-Amino-Actinomycin D (7-AAD) (559925, BD Biosciences) にて染色し、フローサイトメーター (FACS Jazz, BD Biosciences) を用いて解析を行った.

2.2.3 TGF- β 刺激下におけるコロニー形成能およびリン酸化 Smad2 タンパク量解析

TGF- β 1 刺激によるオルガノイドのコロニー形成能変化を定量化するため、腺腫オルガノイドおよび大腸癌オルガノイド 3 ライン (CRC7, CRC20, CRC28) に対して、TGF- β 1 (5 ng/ml, R&D) 刺激を継代後 2 日目より 5 日間行った. その後、TrypLE express にて単細胞化し、同一の細胞密度 (各ウェルあたり 5000 細胞) となるように接種し

た．継代より 7 日後に顕微鏡 (BZ-X710, Keyence) にて各ウェルの撮影を行った．付属画像解析ソフトウェア (BZ-X analyzer, Keyence) にてコロニー面積の測定を行い，対象 (TGF- β 1 非処理群) との面積比をコロニー形成能の指標とした．

また，TGF- β 1 刺激による下流シグナルの活性化の指標として，リン酸化 Smad2 タンパクの検出を行った．コロニー形成アッセイに使用したオルガノイド (CRC7, CRC20, CRC28) に対して TGF- β 1 (5 ng/ml) 処理を継代後 5 日目より 2 日間行い，細胞分画タンパク質抽出キット (NE-PER Nuclear and Cytoplasmic Extraction Reagents, Thermo Scientific) を用いて核タンパクを回収した．タンパクの分離および検出は全自動キャピラリー電気泳動イムノアッセイシステム (Simple Western System, proteinsimple) およびウサギ抗リン酸化 Smad2 (Ser465/467) /Smad3 (Ser423/425) 抗体 (8828, CST)，ローディングコントロールとしてウサギ抗 TBP 抗体 (44059, CST) を用いて行った．

2.2.4 大腸癌オルガノイドの異種移植

移植に先立ち，エレクトロポレーション法[52]を用いて大腸癌オルガノイドを緑色蛍光タンパク (Green Fluorescent Protein ; GFP) にて標識した．腎被膜下への移植は第一章 (1.2.3) と同様に行った．一部のオルガノイドについては脾臓移植による肝転移アッセイも同時に施行した．腎被膜下移植後に同一の開腹創より脾臓を牽引露出さ

せ、インスリンシリンジを用いて 10 μ l (1×10^5 細胞相当) のオルガノイド浮遊マトリゲルを脾臓内に注入した。各大腸癌オルガノイドについて、3-4 匹のマウスへの移植を行った。

移植後 2 ヶ月目に解剖を行い、左腎あるいは肝臓を摘出した。実体顕微鏡 (Nikon) にて摘出臓器の GFP 蛍光画像撮影を行い、画像解析ソフトウェア (LuminaVision, Nikon) を用いて腫瘍面積を測定した。本動物実験は慶應義塾大学医学部動物実験センターの承認 (承認番号 12012) を得た上で施行された。

2.3 結果

2.3.1 大腸腫瘍オルガノイドのニッチ因子要求性と臨床ステージの相関

各大腸腫瘍オルガノイドの増殖における幹細胞ニッチ因子（Wnt3-a/R-Spondin1, EGF, p38 MAPK 阻害剤, Noggin, TGF- β 受容体阻害剤）および酸素濃度の影響をプロットした（図 17）。全ての幹細胞ニッチ因子を必要とする正常オルガノイド 17 ラインを左に加えた。大腸腫瘍については発癌形態，すなわち腺腫を経て MSS 大腸癌に至る経路（adenoma-carcinoma sequence）および鋸歯状病変を経て MSI 大腸癌に至る経路（serrated pathway）に大別した。後者では，鋸歯状病変は高度のニッチ因子要求性を呈する一方で MSI 大腸癌の多くでニッチ因子非依存的な増殖が認められ，MSI 大腸癌多数で認められる多数の遺伝子変異を反映していることが示唆された。前者では腺腫から大腸癌に至る過程でニッチ因子への依存性が大きく減少している（ $p = 0.02$, Mann-Whitney U test）一方で，早期癌と進行癌および転移癌の比較では一定の傾向は認められず，高度なニッチ依存性を呈するステージ 4 大腸癌も認められた（CRC27）。

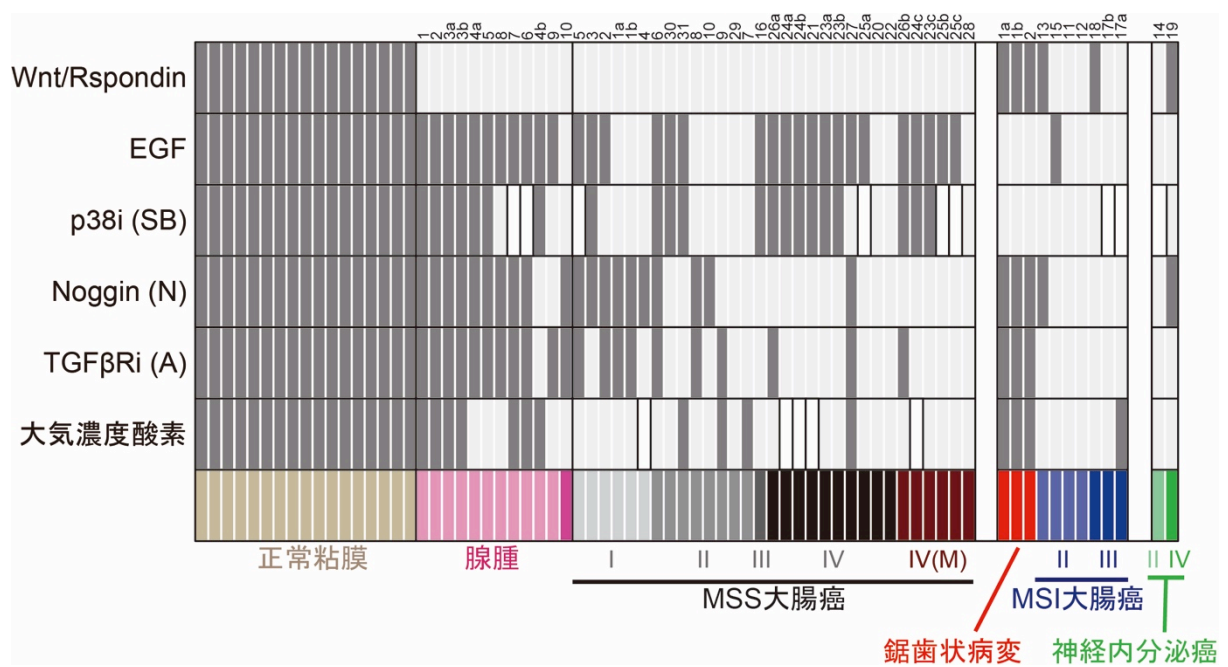


図 17 各オルガノイドのニッチ因子要求性

各オルガノイドの ID 番号を上記に記す。必要な因子を濃灰色、不要な因子を淡灰色、増殖を悪化させる因子を白色で表した。

2.3.2 Wnt-3a/R-Spondin1 要求性を規定する因子の検討

大腸癌オルガノイドにおける各幹細胞ニッチ因子要求性と分子生物学的異常の相関について検討した。Wnt 経路は腸管上皮幹細胞の自己複製において必須である一方で[53, 54], 過剰な活性化は腫瘍化を来すため[55, 56], その活性は複数のフィードバック機構により厳密に制御されている[57, 58]。Wnt リガンドが存在しない状況では, 転写因子である β -Catenin は APC, Axin2 等と複合体を形成し, プロテアソーム系によって速やかに分解される。また, R-Spondin 不在の状況では RNF43/ZNRF3 によって Wnt 受容体である Frizzled が細胞内に移行し, プロテアソーム系により分解される[59, 60]。Wnt 経路の活性化には Wnt, R-Spondin のいずれも必須であることを踏まえて, 各大腸癌オルガノイドについて Wnt-3a/R-Spondin1 の要求性, および第一章で得られた Wnt パスウェイ遺伝子 (*APC*, *CTNNB1*, *TCF7L2*, *FAM123B*) 変異の有無をプロットした (図 18)。

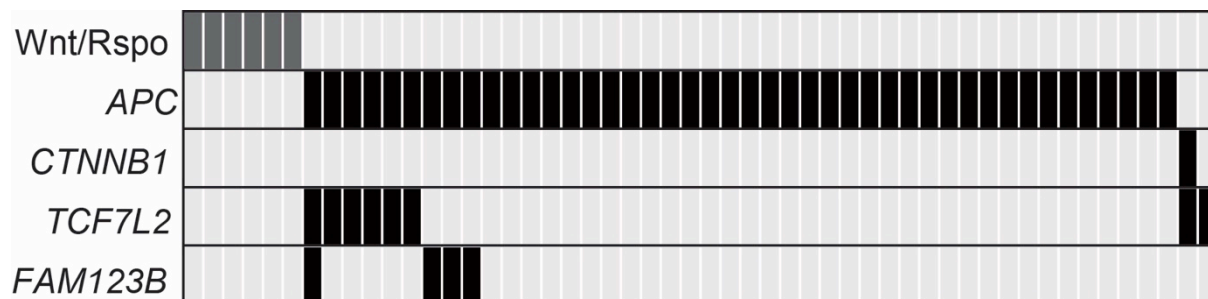
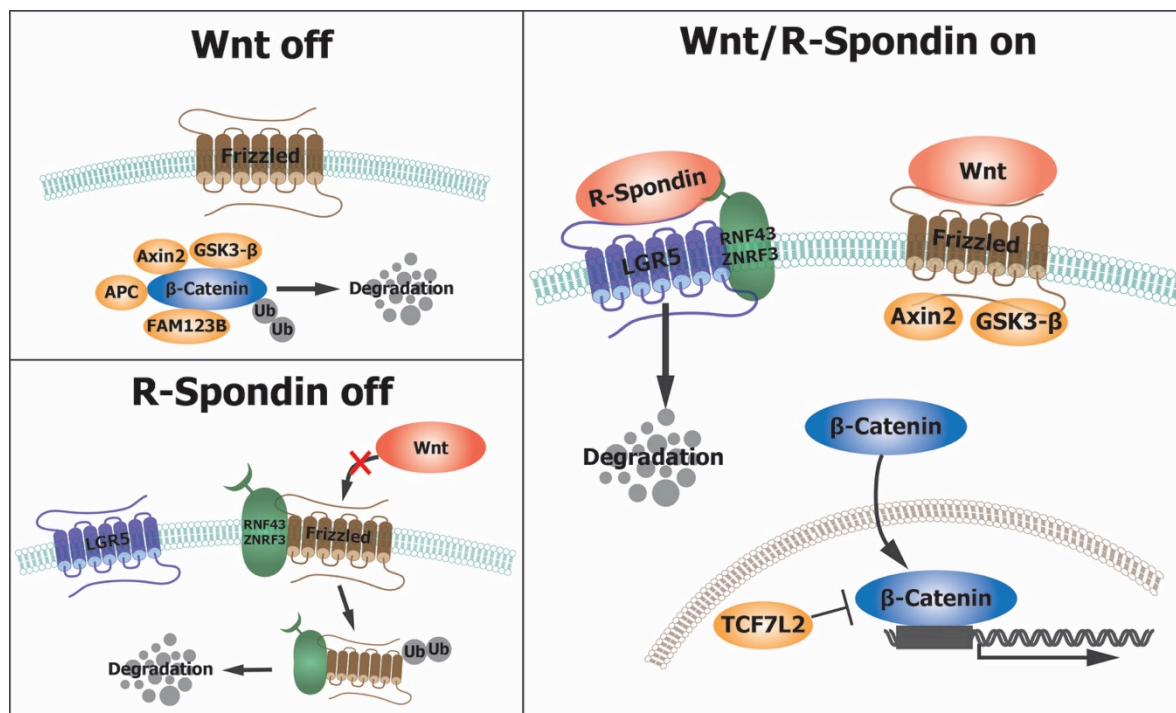


図 18 大腸癌オルガノイドにおける Wnt-3a/R-Spondin1 要求性および Wnt パスウェイ遺伝子変異

大腸腫瘍オルガノイドについて Wnt-3a/R-Spondin1 を必要とする場合には灰色，各 Wnt パスウェイ遺伝子変異を有する場合には黒色でプロットした．Wnt-3a/R-Spondin1 要求性は遺伝子変異で厳密に規定されている．

Wnt-3a/R-Spondin1 非依存オルガノイドには全例 Wnt パスウェイ変異が認められた.

その一方で Wnt-3a/R-Spondin1 を必要とする大腸癌オルガノイドが 3 例認められ, いずれも稀な組織型 (粘液癌および神経内分泌癌) から樹立したものであった (図 19).

これらの Wnt-3a/R-Spondin1 依存オルガノイドには Wnt パスウェイ変異が認められなかったが, 他のドライバー遺伝子変異を有することから正常細胞の混入を除外することが可能であった. 以上の結果より, Wnt-3a/R-Spondin1 への依存性は遺伝子変異によって厳密に規定されていることが示された.,

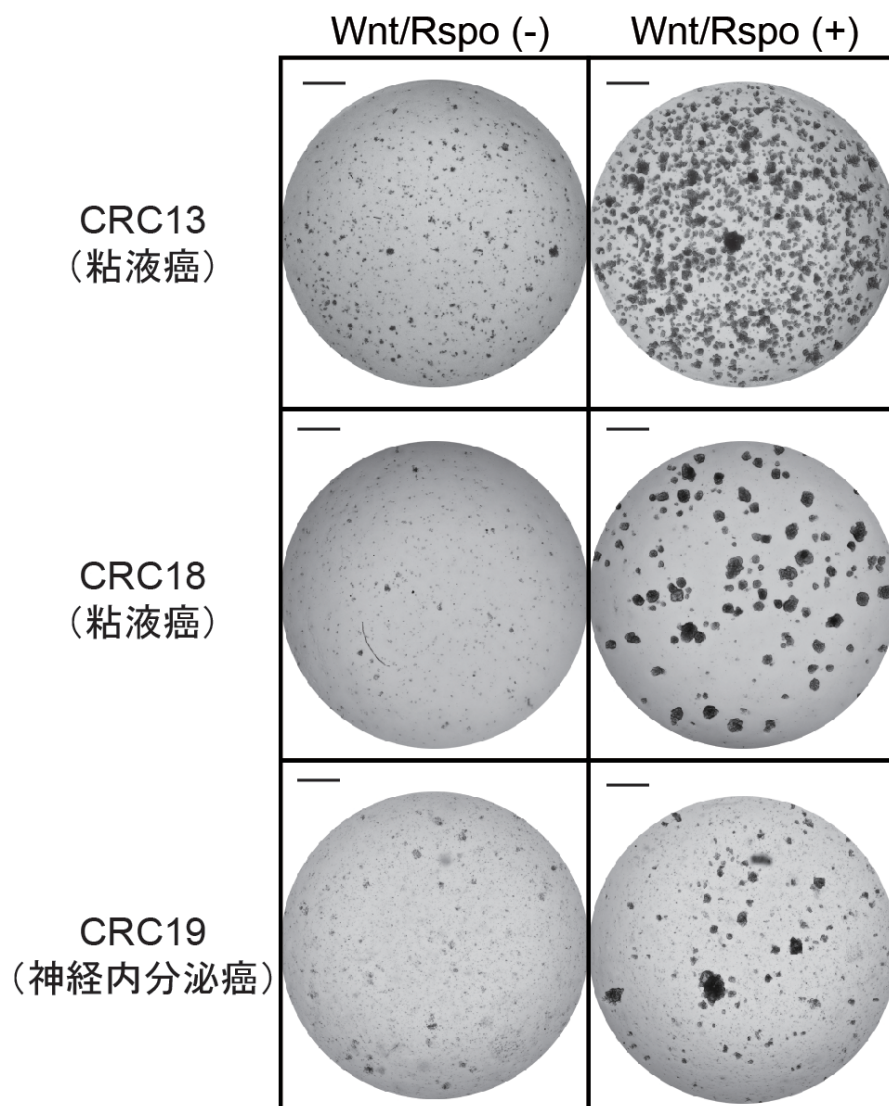


図 19 Wnt-3a/R-Spondin1 除去による Wnt-3a/R-Spondin1 依存オルガノイドの増殖抑制効果

いずれの Wnt-3a/R-Spondin1 依存大腸癌オルガノイドも培地からの Wnt-3a/R-Spondin1 除去によって著しく増殖が抑制される。スケールバー：500 μm 。

2.3.3 EGF 要求性を規定する因子の検討

各大腸癌オルガノイドについて, EGF への依存性, EGFR パスウェイ遺伝子 (*BRAF*, *KRAS*, *NRAS*, *PIK3CA*) 変異の有無および EGF 関連リガンドである *EREG* 遺伝子の過剰発現[61]をプロットした. また, 図 17 より p38 MAPK 阻害剤要求性と EGF 要求性の相関が示唆されたため, p38 MAPK 阻害剤要求性の有無も併せてプロットした (図 20).

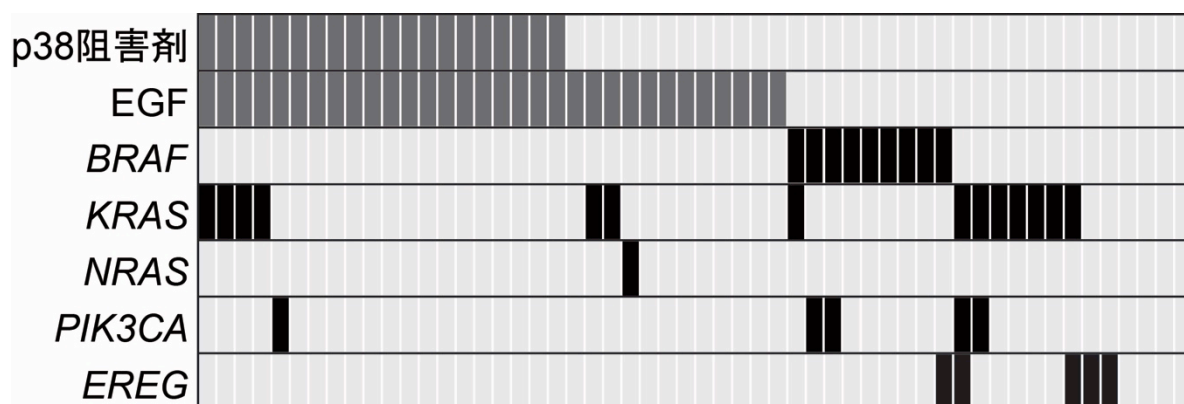
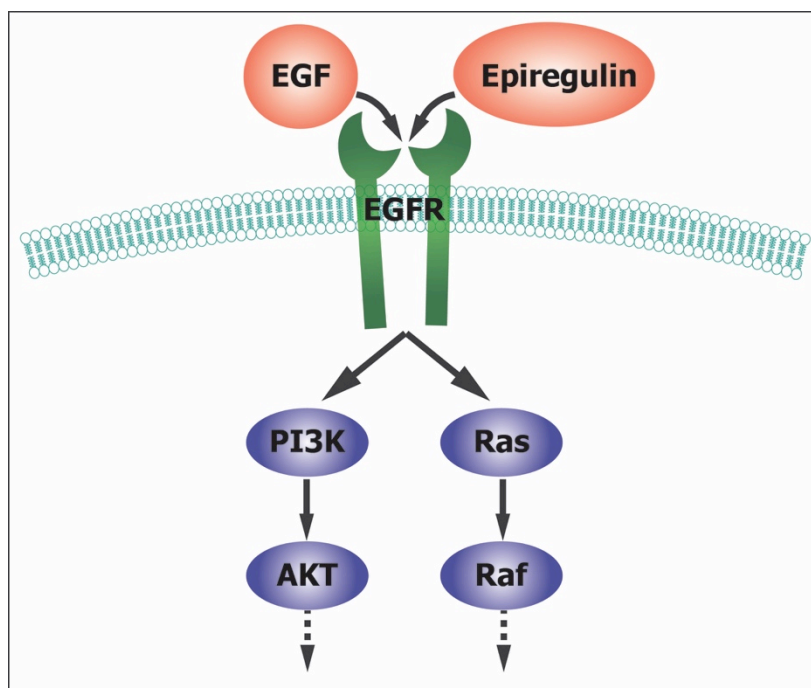


図 20 p38MAPK 要求性, EGF 要求性と遺伝子異常の相関

大腸腫瘍オルガノイドについて, p38 阻害剤, EGF を必要とする場合に灰色, 各パスイグウェイ遺伝子変異を有する場合および *EREG* 遺伝子過剰発現 (z score > 3.0) を認める場合に黒色でプロットした.

EGF 非依存オルガノイドの多くは Ras-Raf シグナル, PI3K シグナルいずれかにおける EGFR パスウェイ遺伝子変異を有していた. また, パスウェイ遺伝子変異を有さない EGF 非依存オルガノイド 2 例 (CRC28, CRC29) では *EREG* の過剰発現が認められた. これら *EREG* 過剰発現オルガノイドは EGFR 阻害剤で増殖が抑制され, 関連リガンドの自己分泌あるいは傍分泌により自律的に EGF シグナルが活性化されていることが示された (図 21). 一方で, *KRAS* 遺伝子変異を有するオルガノイドの一部は至適な増殖に EGF を必要としており, *KRAS* 遺伝子変異のみでは完全な EGF 非依存性は獲得しないという既存の報告[62]と一致していた.

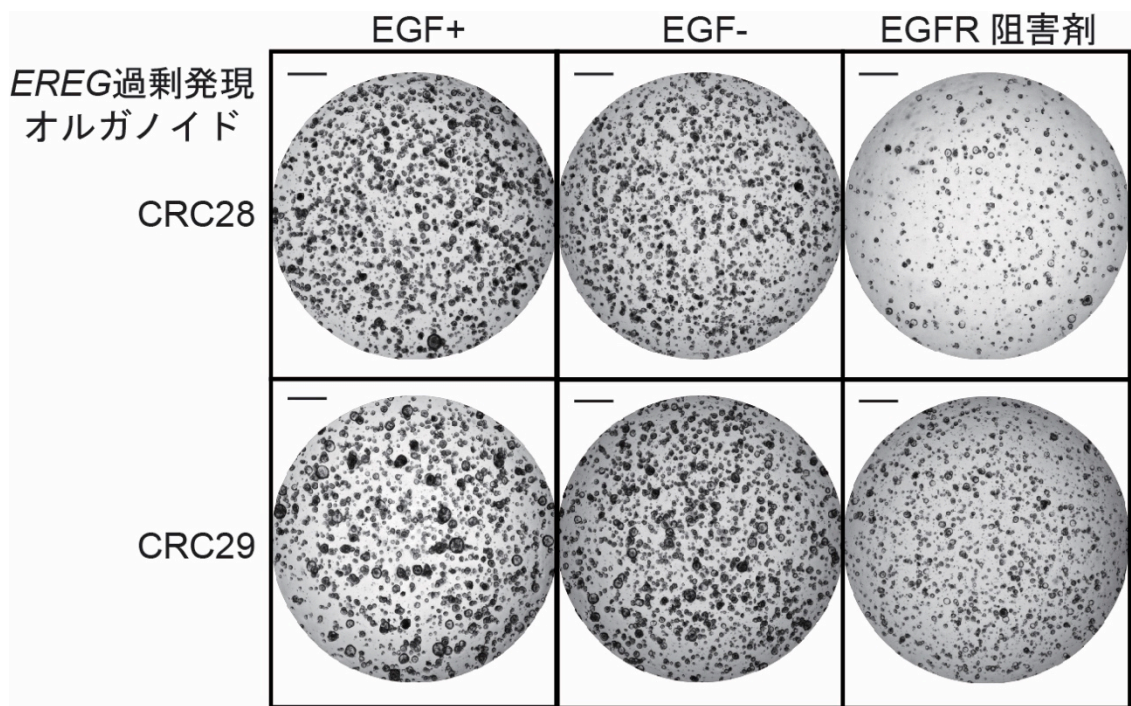


図 21 EGFR 阻害剤による *EREG* 過剰発現大腸癌オルガノイドの増殖抑制効果

EREG 過剰発現オルガノイドは EGF 非依存であるが EGFR 阻害剤によって増殖を阻害される．スケールバー：500 μm ．

また、p38 阻害剤依存オルガノイドは全例 EGF を必要としており、EGF シグナルの効率的な活性化に p38 シグナルの阻害が必要であることが示唆された。まず、EGF、p38 阻害剤依存腺腫オルガノイド (Ad3) を用いて EGF、p38 阻害剤処理による EGF シグナルの活性化をウェスタンブロットにて評価したところ、同時処理群のみ ERK のリン酸化が認められた (図 22 左上)。EGF 自体には EGFR の細胞内移行による負のフィードバックが存在するため[63]、フローサイトメトリーを用いて EGF、p38 阻害剤処理による EGFR 発現を評価した。その結果、EGF 単独処理では EGFR の細胞膜における発現低下が認められたが、p38 阻害剤処理によってこの作用が阻害された (図 22 右上)。以上の結果より、p38 シグナル阻害は EGFR の細胞膜における安定化作用を有することが示唆された (図 22 下)。

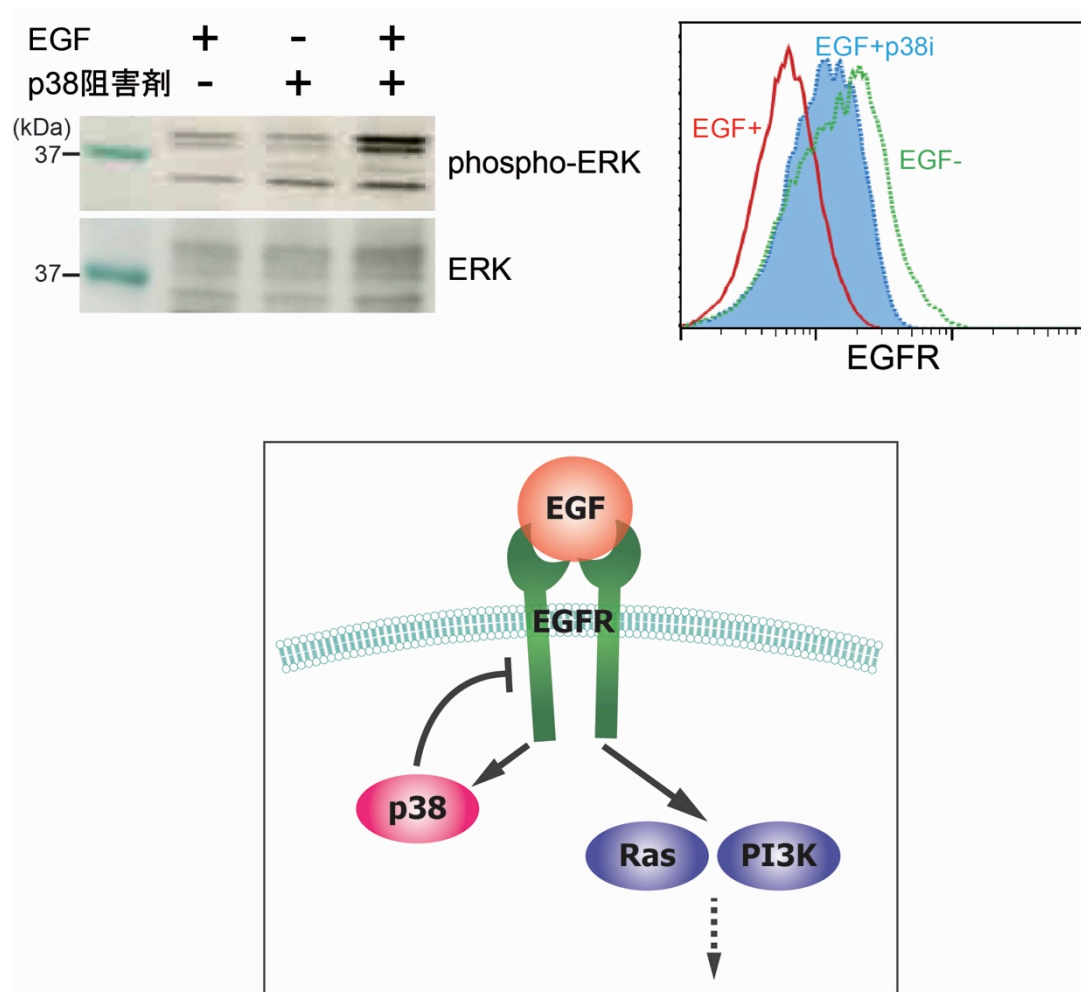


図 22 p38MAPK 阻害剤による EGFR 安定化作用

左上：ウェスタンブロットによるリン酸化 ERK 発現の評価．EGF，p38 同時処理群のみ ERK のリン酸化が認められる．

右上：フローサイトメトリーによる細胞膜上 EGFR 発現の解析．EGF 処理による EGFR 発現低下は p38 阻害剤処理によってキャンセルされる．

下：想定される EGF シグナルと p38 シグナルの関連．p38 は EGFR を負に制御し，その阻害は EGFR の細胞膜状における安定化作用を有する．

2.3.4 TGF- β 阻害剤要求性を規定する因子の検討

各大腸癌オルガノイドについて、TGF- β 受容体阻害剤 (A83-01) の要求性と TGF- β パスウェイ遺伝子 (*TGFBR2*, *SMAD4*, *SMAD3*) の有無をプロットした。18 番染色体長腕 (18q) には *SMAD4* 遺伝子座が存在し、染色体異常に伴う欠失と予後の相関が報告されていることから[64, 65], 18q 欠失の有無と臨床ステージも併せてプロットした。同様に、Noggin 要求性および *SMAD4* 遺伝子変異の有無、臨床ステージのプロットを作製した (図 23)。

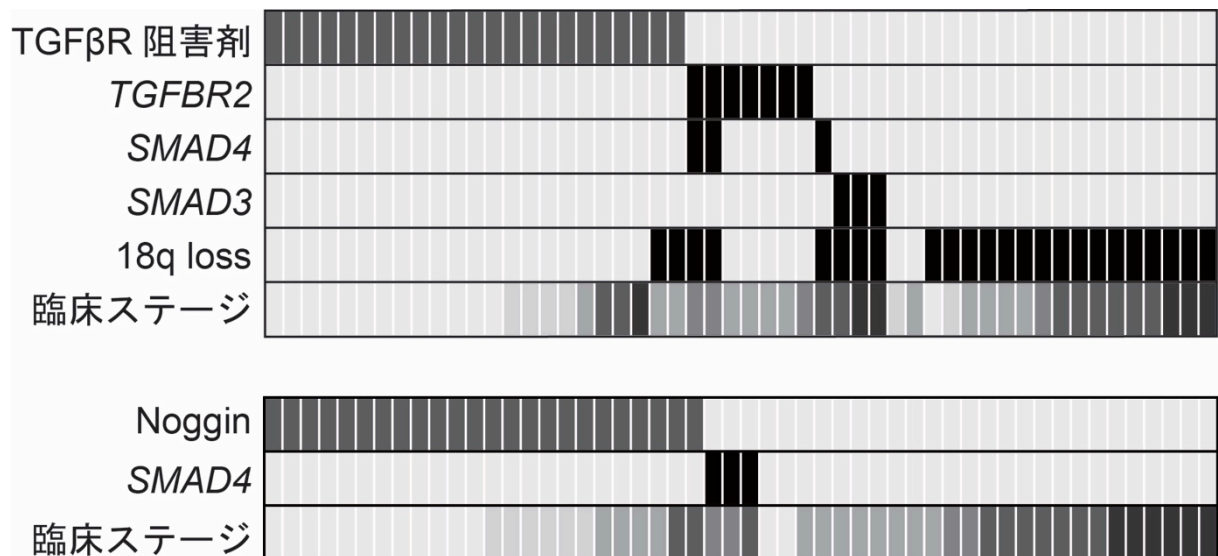
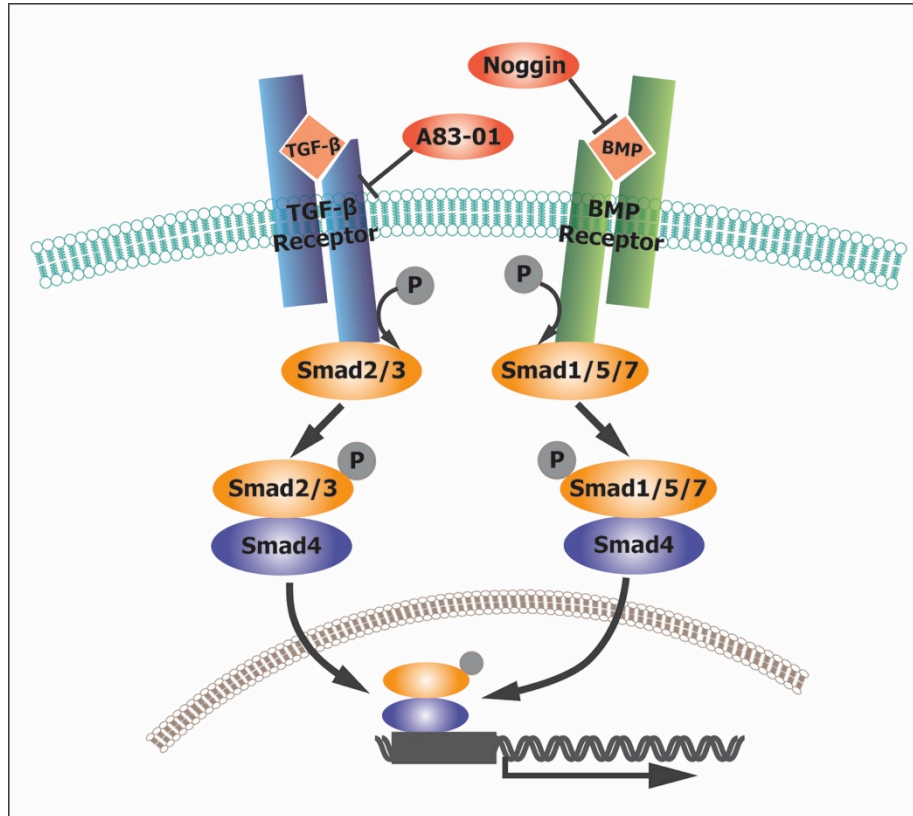


図 23 TGF-β 受容体阻害剤, Noggin 要求性とパスウェイ遺伝子異常, 18q 欠失および臨床ステージの相関

大腸腫瘍オルガノイドについて, TGF-β 受容体阻害剤あるいは Noggin を必要とする場合に灰色, 各パスウェイ変異および 18q 染色体欠失を有する場合に黒色でプロットした. また, 臨床ステージを背景色 (良性病変) から濃灰色 (転移巣) の濃淡で表した.

TGFBR2 遺伝子変異を有するオルガノイドは全例 MSI を呈しており, MSI 大腸癌における TGF- β 受容体阻害剤非依存性は主に遺伝子変異によって規定されていることが示唆された. 一方で, MSS 大腸癌オルガノイドにおける TGF- β 受容体阻害剤非依存性の多くはパスウェイ遺伝子変異に依らない一方で, 18q 欠失と有意に相関が認められた ($p < 0.01$, Fisher's exact test). パスウェイ遺伝子変異を有さない TGF- β 受容体阻害剤非依存 MSS 大腸癌オルガノイドは TGF- β 阻害剤依存オルガノイドと比較して有意に TGF- β 1 刺激後のコロニー形成能が優れており, 遺伝子変異非依存的に TGF- β に対する耐性を有することが示された (図 24).

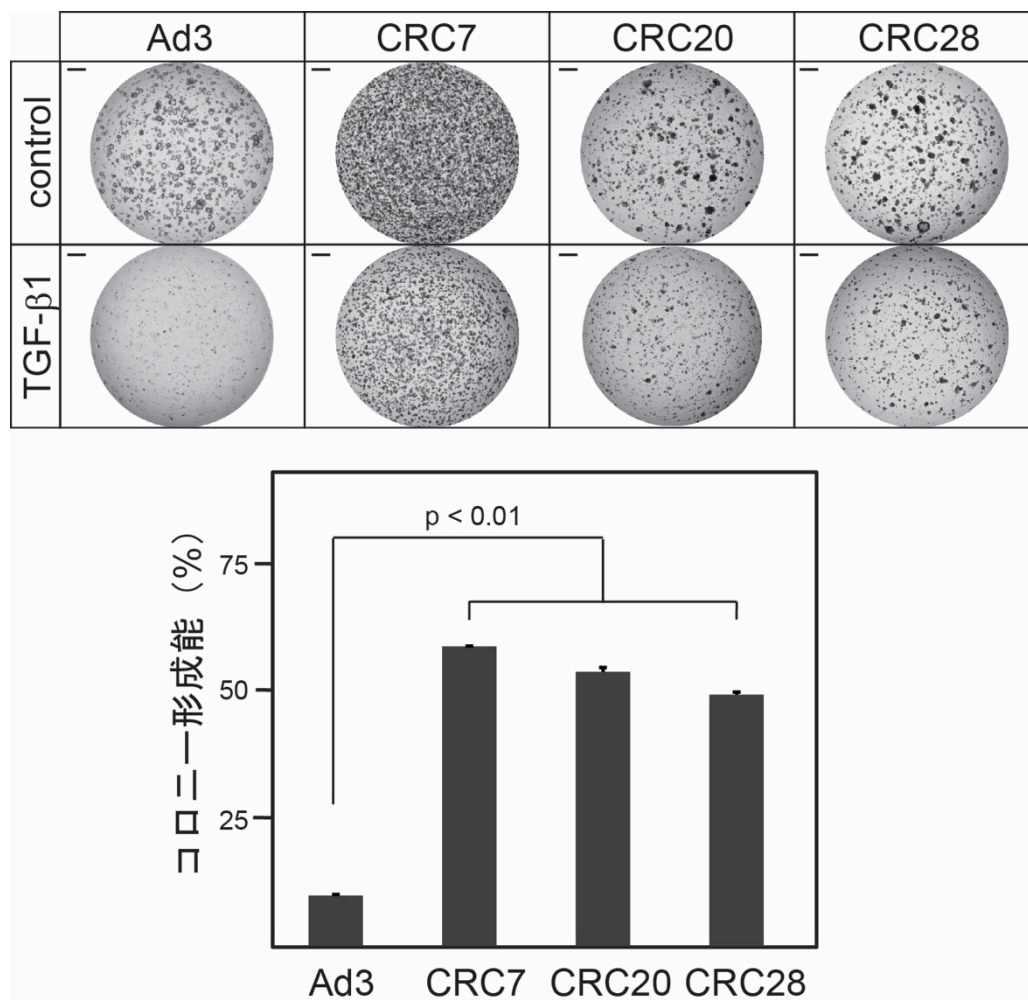


図 24 パスウェイ変異を有さない TGF- β 受容体阻害剤非依存大腸癌オルガノイドの TGF- β 1 刺激によるコロニー形成能の変化

CRC7, CRC20, CRC28 は TGF- β パスウェイ変異を有さないが, TGF- β 受容体阻害剤を必要としない. いずれのオルガノイドも対象と比較して TGF- β 1 刺激後のコロニー形成能が優れており, 遺伝子変異非依存的に TGF- β 耐性を獲得していることが示唆される. スケールバー: 500 μ m.

TGF- β 耐性の機序を検討するため、TGF- β 1 刺激によるリン酸化 Smad2 タンパク量の評価を行った。その結果、いずれのオルガノイドも Smad2 のリン酸化が認められ、Smad レベルまでの TGF- β シグナルの活性化を伴っていた。このことから、TGF- β 耐性は Smad よりさらに下流のシグナル異常によって規定されていることが示された (図 25)。

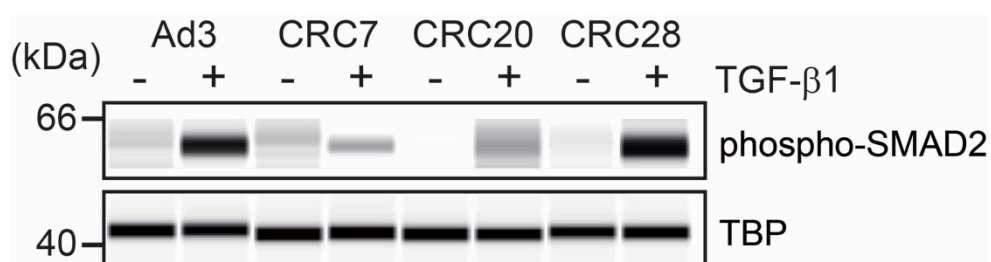


図 25 パスウェイ変異を有さない TGF- β 受容体阻害剤非依存大腸癌オルガノイドの TGF- β 1 刺激による SMAD2 活性化の検討

いずれのオルガノイドも TGF- β 1 刺激によって SMAD2 のリン酸化および核内移行が認められる。

2.3.5 異種移植下における腫瘍増殖能とニッチ因子の相関

大腸癌オルガノイドの *in vivo* 腫瘍形成能における幹細胞ニッチ因子依存性の影響を検討するため、大腸癌オルガノイド 19 ラインを GFP にて標識した後、NOG マウスの腎被膜下に移植した。それぞれの大腸癌オルガノイドが必要とするニッチ因子の個数を横軸、腫瘍面積を縦軸にプロットした（図 26）。代表的な移植組織写真を併せて提示する。

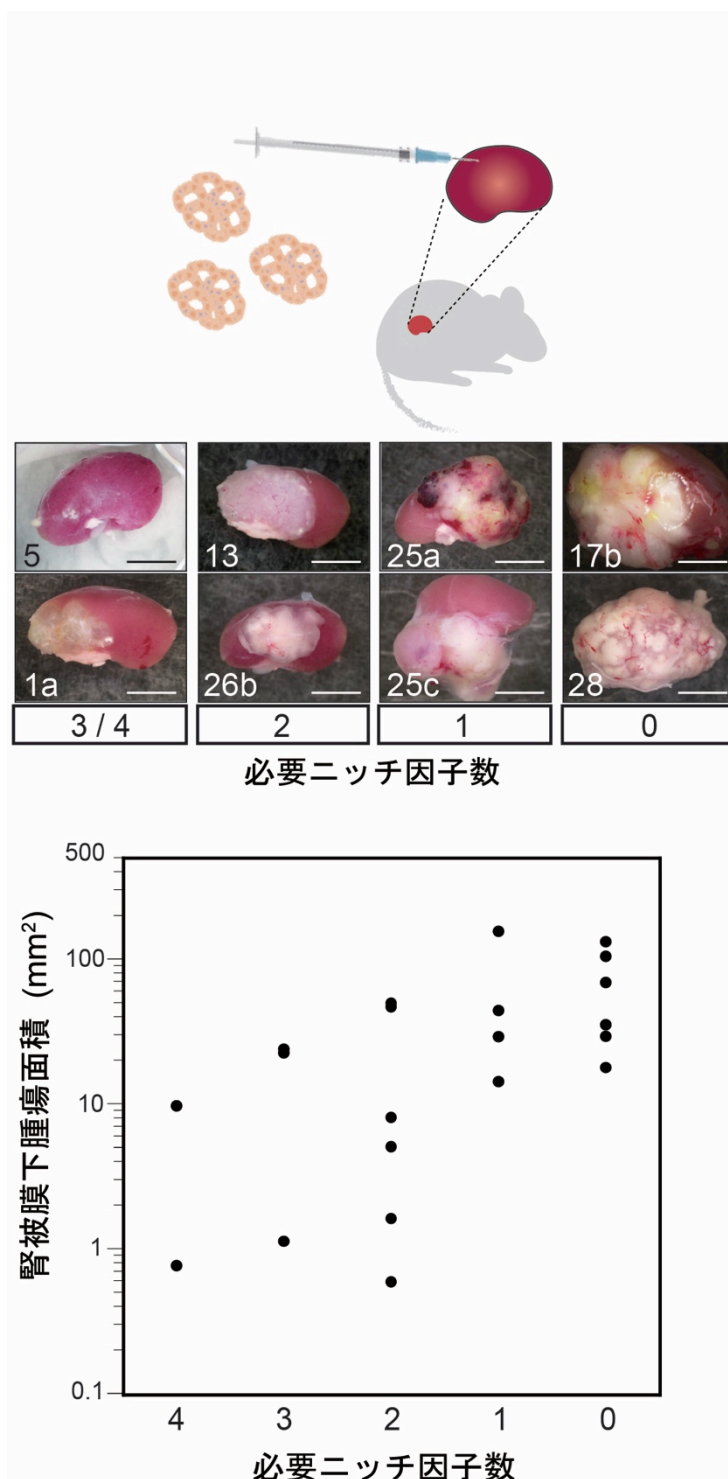


図 26 大腸癌オルガノイドの腎被膜下移植組織面積と必要ニッチ因子個数の相関

上段に移植の模式図，中段に必要ニッチ因子数に相当する代表的な大腸癌オルガノイドの移植組織写真を提示した．スケールバー：5 mm.

腎被膜下における腫瘍形成能と必要ニッチ因子の個数には負の相関(Spearman 相関係数 $\rho = -0.62$, $p < 0.01$) が認められ, 必要ニッチ因子が少ないほど大きな腫瘍を形成した. この結果は, 遺伝子編集ツールを用いた人為的な遺伝子改変大腸癌オルガノイドモデルにおいて, 移植下の腫瘍形成能はドライバー遺伝子変異の個数と相関するという既報[62]と合致するものであった.

一部の原発巣由来オルガノイドおよび肝転移由来オルガノイドについては脾臓への移植を並行して行い, 肝転移能の評価を行った. 面積 1 mm^2 以上のマクロな肝転移をプロットしたところ, 肝転移の個数は原発巣由来オルガノイドと比較して肝転移由来オルガノイドにおいて有意に多く, 同一患者由来の原発巣および肝転移巣オルガノイドの比較においても同様の傾向が認められた (図 27).

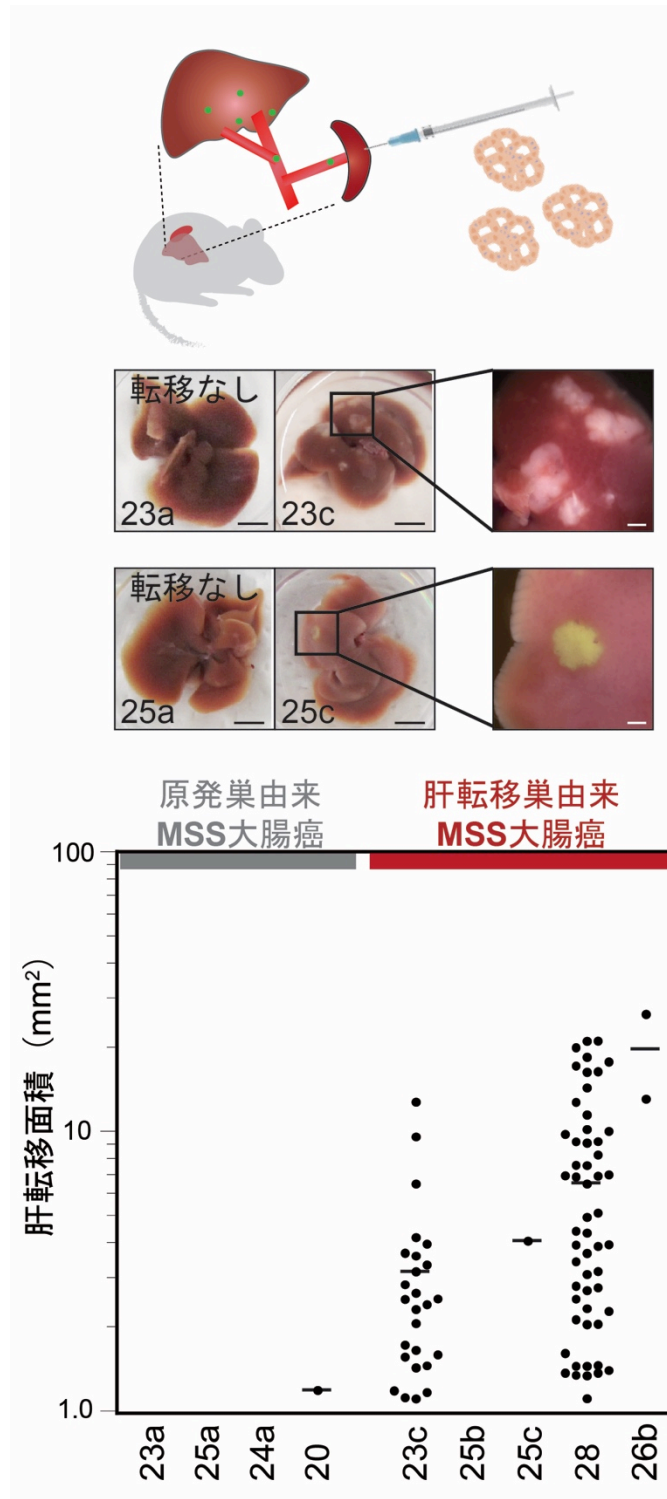


図 27 脾注モデルによるオルガノイドの肝転移能評価

原発巣オルガノイド (CRC20, CRC24a), 肝転移オルガノイド (CRC26b, CRC28) および原発巣・肝転移のセット (CRC23a/b, CRC25a/b/c) について, NOG マウスへの脾注による肝転移能評価を行った. 肝転移巣由来オルガノイドはより効率的に肝転移を形成した. スケールバー: 5 mm.

対となる原発巣，肝転移巣オルガノイドは同等の遺伝子発現パターンを有しており（図 28），遺伝子発現パターンの変化を伴わない機序によって肝転移能は規定されていることが示唆された．

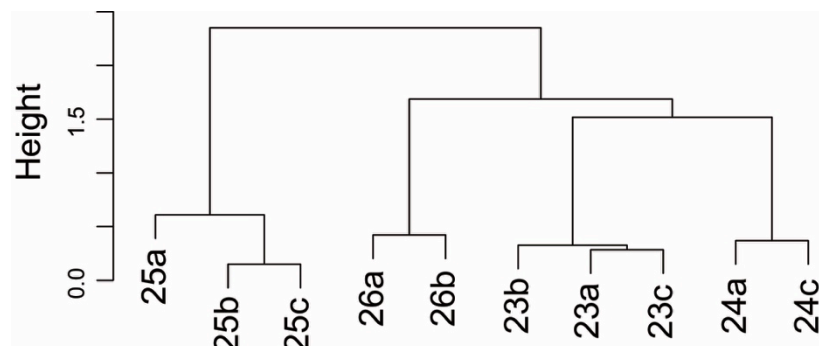


図 28 対となる原発巣・肝転移巣由来オルガノイドの遺伝子発現パターンに基づいた階層クラスタリング

対となる原発巣・肝転移巣由来オルガノイドの遺伝子発現データを対象に階層クラスタリングを行うと，同一患者由来のオルガノイドは同一のクラスターに分布する．

2.4 考察

第一章で確立したヒト大腸腫瘍オルガノイドライブラリを用いた機能的アッセイとして、各オルガノイドのニッチ因子要求性と分子生物学的異常の連関、さらに異種移植モデルにおける局所増殖能、肝転移能を評価した。ニッチ因子要求性の統合的な検討では、腺腫から MSS 大腸癌に至る過程で有意に必要ニッチ因子の減少を伴う一方で、早期癌と進行癌との比較では一定の傾向は認められなかった。高度のニッチ要求性を呈するステージ 4 大腸癌が存在することも考慮すると、遺伝子異常によるニッチ因子非依存的な増殖能の獲得は良性病変から癌に至る過程で肝要である一方で、癌の進行には必ずしも必要でないことが示唆された。

各ニッチ因子の要求性を規定する因子を探索するため、対応するシグナルパスウェイにおける遺伝子異常を詳細に検討したところ、Wnt-3a/R-Spondin1 要求性はパスウェイ遺伝子変異によって厳密に規定されていることが判明した。一方で Wnt-3a/R-Spondin1 依存性大腸癌オルガノイドが 3 例認められた。これらのオルガノイドは Wnt-3a/R-Spondin1 除去によって著明な増殖抑制を呈することから、Wnt-3a/R-Spondin1 依存大腸癌に対する治療戦略として、Wnt のパルミチル化阻害剤である Porcupine 阻害剤等による Wnt 標的治療[66, 67]が有効であることを示唆している。

一方で、EGF と TGF- β の要求性にはパスウェイ遺伝子変異のみでは説明不能な表現系が認められた。EGF 要求性の検討では至適増殖に EGF を必要とする *KRAS* 変異型オルガノイドが存在し、このような大腸癌に対しては抗 EGFR 抗体による EGFR 標的治療が有効であることが示唆される。また、TGF- β 阻害剤要求性の検討ではパスウェイ遺伝子変異を有さない TGF- β 耐性オルガノイドが認められた。TGF- β 阻害剤への非依存性は臨床ステージと有意に相関しており（ステージ III, IV 対ステージ I, II : $p < 0.01$, Fisher's exact test), TGF- β 耐性の獲得は癌の進行を特徴付ける形質の一つであることを示している。

NOG マウスを用いた大腸癌オルガノイドの異種移植モデルでは、腎被膜下における局所増殖能は必要ニッチ因子との有意な負の相関を認め、遺伝子編集技術を用い人工大腸癌モデルにおいて導入したドライバー遺伝子の個数に応じて局所増殖能が向上するという既報[62]と一致する結果であった。一方で脾臓への移植による肝転移モデルでは、肝転移由来オルガノイドのみ効率的に肝転移を形成した。本検討で用いた転移モデルでは、腫瘍細胞は門脈血流を介して直接肝臓に到達することが可能であり、類洞に捕捉された状況での腫瘍増殖能を反映していると考えられる。そのため、原発巣から血管内への遊走を経由する本来の転移プロセスとは乖離がある。また、異種移植を行ったオルガノイドラインはクローン化されておらずポリクローナルな集団で

あり，原発巣オルガノイドにも高い転移能を有するクローンが存在する可能性は否定できない．しかしながら，同一患者より樹立したオルガノイドにおいても，肝臓における増殖能が異なる細胞集団が存在し，これら対となるオルガノイドは同様の遺伝子変異プロファイル，ニッチ因子要求性および遺伝子発現パターンを有していることは本研究より明らかである．このような肝臓に生着した腫瘍細胞の増殖能を規定する因子として分子生物学的機序では説明できない機序が存在することが示唆され，オルガノイドを用いた今後の検討にてこのメカニズムが解明されることが期待される．

以上のような患者腫瘍細胞を用いた機能的な表現型を観察することは，従来の癌細胞株やマウスモデルを用いた研究では極めて困難であり，患者由来オルガノイドを用いることで初めて可能となった．その結果，ニッチ因子要求性，異種移植における肝転移能といった従来の遺伝子型・表現型相関では説明できない形質を認め，オルガノイドを用いた患者レベルでの表現型評価体系の有用性が示唆された．

2.5 結論

患者由来オルガノイドを用いた機能的解析としてニッチ因子要求性および異種移植による局所増殖能および肝転移能の評価を行った。腺腫から大腸癌に至る過程でニッチ因子要求性の有意な減少が認められた。Wnt-3a/R-Spondin1 要求性は遺伝子変異によって厳密に規定されていた一方で, EGF および TGF- β 受容体阻害剤への要求性, および異種移植モデルでの肝転移能において, 遺伝子異常によらないメカニズムの存在が示唆された。

結語

ヒト大腸腫瘍の多様性を網羅するバイオリソースを構築するため、良性腫瘍や転移巣、従来培養困難であった稀な組織型を含む様々な大腸腫瘍からオルガノイド株を樹立し、計 55 ラインから構成されるヒト大腸腫瘍オルガノイドのライブラリを確立した。オルガノイドは培養中、異種移植後も患者腫瘍の組織学的特徴や分化階層構造、組織型に特徴的な遺伝子発現パターンを保持することが可能であり、オルガノイドは患者腫瘍の体外モデリングツールとして非常に有用であると考えられた。

オルガノイドを用いた大腸腫瘍細胞の機能的解析では、良性病変から癌に至る過程で幹細胞ニッチ因子要求性の有意な減少が認められ、ニッチという制約からの脱却は癌化プロセスにおいて重要であることが示唆された。個別のニッチ因子解析では主に遺伝子異常で規定されていた Wnt-3A/R-Spondn1 および EGF の要求性と異なり、特に 18q 染色体の欠失を伴う高度進行癌において遺伝子変異非依存的な TGF- β 耐性が認められた。また、大腸癌オルガノイドの異種移植モデルにおいて局所増殖能は必要ニッチ因子の個数と負の相関が認められた。一方、転移巣由来オルガノイドは原発巣由来オルガノイドと比較し同等の分子生物学的プロファイル、ニッチ因子要求性を有するが、より効率的に肝転移を形成することが可能であった。このような形質は従来の遺

伝型表現系相関では説明困難であり，オルガノイドを用いた患者腫瘍レベルでの解析によりはじめて明らかになったといえる．

今回解析に用いた全てのオルガノイドは凍結ストック化により随時利用である．今後，本ライブラリを用いた詳細な遺伝子機能解析や個別化治療を視野に入れた薬剤スクリーニングや薬効評価への応用が期待される．

謝辞

本研究を進めるにあたり、東京大学大学院 医学系研究科 外科学専攻 臓器病態外科学講座 腫瘍外科学・血管外科学 渡邊聡明教授にはひとかたならぬ御指導・御鞭撻を賜り、深く感謝いたします。慶應義塾大学医学部 内科学教室（消化器） 佐藤俊朗准教授には研究テーマの設定から論文執筆に至るまで多岐にわたって終始御指導して頂きました。同教室 金井隆典教授には実験の場および貴重な臨床検体を提供して頂きました。また、実際の実験に際しては 同教室 下川真理子氏、高野愛氏、股野麻未氏、南木康作先生、太田悠木氏、利光孝太氏、中里圭宏先生、川崎健太先生、浦岡俊夫先生に多大なるご協力を頂き、ここに深甚なる謝意を表します。

引用文献

1. A. Gregorieff and H. Clevers. Wnt signaling in the intestinal epithelium: from endoderm to cancer. *Genes Dev.* 19, 877-890. 2005.
2. J. P. Heath. Epithelial cell migration in the intestine. *Cell Biol Int.* 20, 139-146. 1996.
3. E. Sancho, E. Batlle and H. Clevers. Live and let die in the intestinal epithelium. *Curr Opin Cell Biol.* 15, 763-770. 2003.
4. M. Bjerknes and H. Cheng. Clonal analysis of mouse intestinal epithelial progenitors. *Gastroenterology.* 116, 7-14. 1999.
5. D. J. Winton and B. A. Ponder. Stem-cell organization in mouse small intestine. *Proc Biol Sci.* 241, 13-18. 1990.
6. E. Marshman, C. Booth and C. S. Potten. The intestinal epithelial stem cell. *Bioessays.* 24, 91-98. 2002.
7. P. A. Hall, P. J. Coates, B. Ansari and D. Hopwood. Regulation of cell number in the mammalian gastrointestinal tract: the importance of apoptosis. *J Cell Sci.* 107 (Pt 12), 3569-3577. 1994.
8. H. Clevers. Stem cells, asymmetric division and cancer. *Nat Genet.* 37, 1027-1028. 2005.
9. J. P. Medema and L. Vermeulen. Microenvironmental regulation of stem cells in intestinal homeostasis and cancer. *Nature.* 474, 318-326. 2011.
10. L. Li and T. Xie. Stem cell niche: structure and function. *Annu Rev Cell Dev Biol.* 21, 605-631. 2005.
11. N. Barker, J. H. van Es, J. Kuipers, P. Kujala, M. van den Born, M. Cozijnsen, A. Haegebarth, J. Korving, H. Begthel, P. J. Peters and H. Clevers. Identification of stem cells in small intestine and colon by marker gene Lgr5. *Nature.* 449, 1003-1007. 2007.
12. H. Davis, S. Irshad, M. Bansal, H. Rafferty, T. Boitsova, C. Bardella, E. Jaeger, A. Lewis, L. Freeman-Mills, F. C. Giner, P. Rodenas-Cuadrado, S. Mallappa, S. Clark, H. Thomas, R. Jeffery, R. Poulson, M. Rodriguez-Justo, M. Novelli, R. Chetty, A. Silver, O. J. Sansom, F. R. Greten, L. M. Wang, J. E. East, I. Tomlinson and S. J. Leedham. Aberrant epithelial GREM1 expression initiates colonic tumorigenesis from cells outside the stem cell niche. *Nat Med.* 21, 62-70. 2015.
13. Z. Kabiri, G. Greicius, B. Madan, S. Biechele, Z. Zhong, H. Zaribafzadeh, Edison, J. Aliyev, Y. Wu, R. Bunte, B. O. Williams, J. Rossant and D. M. Virshup. Stroma provides an intestinal stem cell niche in the absence of epithelial Wnts. *Development.* 141, 2206-2215.

2014.

14. T. Sato, J. H. van Es, H. J. Snippert, D. E. Stange, R. G. Vries, M. van den Born, N. Barker, N. F. Shroyer, M. van de Wetering and H. Clevers. Paneth cells constitute the niche for Lgr5 stem cells in intestinal crypts. *Nature*. 469, 415-418. 2011.
15. N. Takeda, R. Jain, M. R. Leboeuf, Q. Wang, M. M. Lu and J. A. Epstein. Interconversion Between Intestinal Stem Cell Populations in Distinct Niches. *Science*. 2011.
16. T. Sato, R. G. Vries, H. J. Snippert, M. van de Wetering, N. Barker, D. E. Stange, J. H. van Es, A. Abo, P. Kujala, P. J. Peters and H. Clevers. Single Lgr5 stem cells build crypt-villus structures in vitro without a mesenchymal niche. *Nature*. 459, 262-265. 2009.
17. T. Sato, D. E. Stange, M. Ferrante, R. G. Vries, J. H. Van Es, S. Van den Brink, W. J. Van Houdt, A. Pronk, J. Van Gorp, P. D. Siersema and H. Clevers. Long-term expansion of epithelial organoids from human colon, adenoma, adenocarcinoma, and Barrett's epithelium. *Gastroenterology*. 141, 1762-1772. 2011.
18. P. Jung, T. Sato, A. Merlos-Suarez, F. M. Barriga, M. Iglesias, D. Rossell, H. Auer, M. Gallardo, M. A. Blasco, E. Sancho, H. Clevers and E. Batlle. Isolation and in vitro expansion of human colonic stem cells. *Nat Med*. 17, 1225-1227. 2011.
19. J. F. Dekkers, C. L. Wiegerinck, H. R. de Jonge, I. Bronsveld, H. M. Janssens, K. M. de Winter-de Groot, A. M. Brandsma, N. W. de Jong, M. J. Bijvelds, B. J. Scholte, E. E. Nieuwenhuis, S. van den Brink, H. Clevers, C. K. van der Ent, S. Middendorp and J. M. Beekman. A functional CFTR assay using primary cystic fibrosis intestinal organoids. *Nat Med*. 19, 939-945. 2013.
20. T. Sato and H. Clevers. Growing self-organizing mini-guts from a single intestinal stem cell: mechanism and applications. *Science*. 340, 1190-1194. 2013.
21. B. Vogelstein, E. R. Fearon, S. R. Hamilton, S. E. Kern, A. C. Preisinger, M. Leppert, Y. Nakamura, R. White, A. M. Smits and J. L. Bos. Genetic alterations during colorectal-tumor development. *N Engl J Med*. 319, 525-532. 1988.
22. E. R. Fearon and B. Vogelstein. A genetic model for colorectal tumorigenesis. *Cell*. 61, 759-767. 1990.
23. B. Vogelstein, N. Papadopoulos, V. E. Velculescu, S. Zhou, L. A. Diaz, Jr. and K. W. Kinzler. Cancer genome landscapes. *Science*. 339, 1546-1558. 2013.
24. E. R. Fearon. Molecular genetics of colorectal cancer. *Annu Rev Pathol*. 6, 479-507. 2011.
25. N. Cancer Genome Atlas. Comprehensive molecular characterization of human colon and rectal cancer. *Nature*. 487, 330-337. 2012.
26. S. Seshagiri, E. W. Stawiski, S. Durinck, Z. Modrusan, E. E. Storm, C. B. Conboy, S. Chaudhuri, Y. Guan, V. Janakiraman, B. S. Jaiswal, J. Guillory, C. Ha, G. J. Dijkgraaf, J.

- Stinson, F. Gnad, M. A. Huntley, J. D. Degenhardt, P. M. Haverty, R. Bourgon, W. Wang, H. Koeppen, R. Gentleman, T. K. Starr, Z. Zhang, D. A. Largaespada, T. D. Wu and F. J. de Sauvage. Recurrent R-spondin fusions in colon cancer. *Nature*. 488, 660-664. 2012.
27. A. Ootani, X. Li, E. Sangiorgi, Q. T. Ho, H. Ueno, S. Toda, H. Sugihara, K. Fujimoto, I. L. Weissman, M. R. Capecchi and C. J. Kuo. Sustained in vitro intestinal epithelial culture within a Wnt-dependent stem cell niche. *Nat Med*. 15, 701-706. 2009.
28. M. Ito, H. Hiramatsu, K. Kobayashi, K. Suzue, M. Kawahata, K. Hioki, Y. Ueyama, Y. Koyanagi, K. Sugamura, K. Tsuji, T. Heike and T. Nakahata. NOD/SCID/gamma(c)(null) mouse: an excellent recipient mouse model for engraftment of human cells. *Blood*. 100, 3175-3182. 2002.
29. N. Suraweera, A. Duval, M. Reperant, C. Vaury, D. Furlan, K. Leroy, R. Seruca, B. Iacopetta and R. Hamelin. Evaluation of tumor microsatellite instability using five quasimonomorphic mononucleotide repeats and pentaplex PCR. *Gastroenterology*. 123, 1804-1811. 2002.
30. C. R. Boland, S. N. Thibodeau, S. R. Hamilton, D. Sidransky, J. R. Eshleman, R. W. Burt, S. J. Meltzer, M. A. Rodriguez-Bigas, R. Fodde, G. N. Ranzani and S. Srivastava. A National Cancer Institute Workshop on Microsatellite Instability for cancer detection and familial predisposition: development of international criteria for the determination of microsatellite instability in colorectal cancer. *Cancer Res*. 58, 5248-5257. 1998.
31. W. E. Johnson, C. Li and A. Rabinovic. Adjusting batch effects in microarray expression data using empirical Bayes methods. *Biostatistics*. 8, 118-127. 2007.
32. E. M. F. De Sousa, X. Wang, M. Jansen, E. Fessler, A. Trinh, L. P. de Rooij, J. H. de Jong, O. J. de Boer, R. van Leersum, M. F. Bijlsma, H. Rodermond, M. van der Heijden, C. J. van Noesel, J. B. Tuynman, E. Dekker, F. Markowitz, J. P. Medema and L. Vermeulen. Poor-prognosis colon cancer is defined by a molecularly distinct subtype and develops from serrated precursor lesions. *Nat Med*. 19, 614-618. 2013.
33. A. Sadanandam, C. A. Lyssiotis, K. Homicsko, E. A. Collisson, W. J. Gibb, S. Wullschlegel, L. C. Ostos, W. A. Lannon, C. Grotzinger, M. Del Rio, B. Lhermitte, A. B. Olshen, B. Wiedenmann, L. C. Cantley, J. W. Gray and D. Hanahan. A colorectal cancer classification system that associates cellular phenotype and responses to therapy. *Nat Med*. 19, 619-625. 2013.
34. M. D. Wilkerson and D. N. Hayes. ConsensusClusterPlus: a class discovery tool with confidence assessments and item tracking. *Bioinformatics*. 26, 1572-1573. 2010.
35. T. Watanabe, T. Kobunai, Y. Yamamoto, K. Matsuda, S. Ishihara, K. Nozawa, H. Yamada, T. Hayama, E. Inoue, J. Tamura, H. Iinuma, T. Akiyoshi and T. Muto.

Chromosomal instability (CIN) phenotype, CIN high or CIN low, predicts survival for colorectal cancer. *J Clin Oncol.* 30, 2256-2264. 2012.

36. T. Watanabe, T. Kobunai, E. Toda, Y. Yamamoto, T. Kanazawa, Y. Kazama, J. Tanaka, T. Tanaka, T. Konishi, Y. Okayama, Y. Sugimoto, T. Oka, S. Sasaki, T. Muto and H. Nagawa. Distal colorectal cancers with microsatellite instability (MSI) display distinct gene expression profiles that are different from proximal MSI cancers. *Cancer Res.* 66, 9804-9808. 2006.

37. G. Valcz, A. V. Patai, A. Kalmar, B. Peterfia, I. Furi, B. Wichmann, G. Muzes, F. Sipos, T. Krenacs, E. Mihaly, S. Spisak, B. Molnar and Z. Tulassay. Myofibroblast-derived SFRP1 as potential inhibitor of colorectal carcinoma field effect. *PLoS One.* 9, e106143. 2014.

38. J. Guinney, R. Dienstmann, X. Wang, A. de Reynies, A. Schlicker, C. Soneson, L. Marisa, P. Roepman, G. Nyamundanda, P. Angelino, B. M. Bot, J. S. Morris, I. M. Simon, S. Gerster, E. Fessler, E. M. F. De Sousa, E. Missiaglia, H. Ramay, D. Barras, K. Homicsko, D. Maru, G. C. Manyam, B. Broom, V. Boige, B. Perez-Villamil, T. Laderas, R. Salazar, J. W. Gray, D. Hanahan, J. Tabernero, R. Bernards, S. H. Friend, P. Laurent-Puig, J. P. Medema, A. Sadanandam, L. Wessels, M. Delorenzi, S. Kopetz, L. Vermeulen and S. Tejpar. The consensus molecular subtypes of colorectal cancer. *Nat Med.* 21, 1350-1356. 2015.

39. A. Subramanian, P. Tamayo, V. K. Mootha, S. Mukherjee, B. L. Ebert, M. A. Gillette, A. Paulovich, S. L. Pomeroy, T. R. Golub, E. S. Lander and J. P. Mesirov. Gene set enrichment analysis: a knowledge-based approach for interpreting genome-wide expression profiles. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 102, 15545-15550. 2005.

40. P. Roepman, A. Schlicker, J. Tabernero, I. Majewski, S. Tian, V. Moreno, M. H. Snel, C. M. Chresta, R. Rosenberg, U. Nitsche, T. Macarulla, G. Capella, R. Salazar, G. Orphanides, L. F. Wessels, R. Bernards and I. M. Simon. Colorectal cancer intrinsic subtypes predict chemotherapy benefit, deficient mismatch repair and epithelial-to-mesenchymal transition. *Int J Cancer.* 134, 552-562. 2014.

41. E. Budinska, V. Popovici, S. Tejpar, G. D'Ario, N. Lapique, K. O. Sikora, A. F. Di Narzo, P. Yan, J. G. Hodgson, S. Weinrich, F. Bosman, A. Roth and M. Delorenzi. Gene expression patterns unveil a new level of molecular heterogeneity in colorectal cancer. *J Pathol.* 231, 63-76. 2013.

42. A. Schlicker, G. Beran, C. M. Chresta, G. McWalter, A. Pritchard, S. Weston, S. Runswick, S. Davenport, K. Heathcote, D. A. Castro, G. Orphanides, T. French and L. F. Wessels. Subtypes of primary colorectal tumors correlate with response to targeted treatment in colorectal cell lines. *BMC Med Genomics.* 5, 66. 2012.

43. L. Marisa, A. de Reynies, A. Duval, J. Selves, M. P. Gaub, L. Vescovo, M. C. Etienne-Grimaldi, R. Schiappa, D. Guenot, M. Ayadi, S. Kirzin, M. Chazal, J. F. Flejou, D.

- Benchimol, A. Berger, A. Lagarde, E. Pencreatch, F. Piard, D. Elias, Y. Parc, S. Olschwang, G. Milano, P. Laurent-Puig and V. Boige. Gene expression classification of colon cancer into molecular subtypes: characterization, validation, and prognostic value. *PLoS Med.* 10, e1001453. 2013.
44. H. F. Vasen, P. Watson, J. P. Mecklin and H. T. Lynch. New clinical criteria for hereditary nonpolyposis colorectal cancer (HNPCC, Lynch syndrome) proposed by the International Collaborative group on HNPCC. *Gastroenterology*. 116, 1453-1456. 1999.
45. A. R. Brannon, E. Vakiani, B. E. Sylvester, S. N. Scott, G. McDermott, R. H. Shah, K. Kania, A. Viale, D. M. Oschwald, V. Vacic, A. K. Emde, A. Cercek, R. Yaeger, N. E. Kemeny, L. B. Saltz, J. Shia, M. I. D'Angelica, M. R. Weiser, D. B. Solit and M. F. Berger. Comparative sequencing analysis reveals high genomic concordance between matched primary and metastatic colorectal cancer lesions. *Genome Biol.* 15, 454. 2014.
46. E. Vakiani, M. Janakiraman, R. Shen, R. Sinha, Z. Zeng, J. Shia, A. Cercek, N. Kemeny, M. D'Angelica, A. Viale, A. Heguy, P. Paty, T. A. Chan, L. B. Saltz, M. Weiser and D. B. Solit. Comparative genomic analysis of primary versus metastatic colorectal carcinomas. *J Clin Oncol.* 30, 2956-2962. 2012.
47. M. van de Wetering, H. E. Francies, J. M. Francis, G. Bounova, F. Iorio, A. Pronk, W. van Houdt, J. van Gorp, A. Taylor-Weiner, L. Kester, A. McLaren-Douglas, J. Blokker, S. Jaksani, S. Bartfeld, R. Volckman, P. van Sluis, V. S. Li, S. Seepo, C. Sekhar Pedamallu, K. Cibulskis, S. L. Carter, A. McKenna, M. S. Lawrence, L. Lichtenstein, C. Stewart, J. Koster, R. Versteeg, A. van Oudenaarden, J. Saez-Rodriguez, R. G. Vries, G. Getz, L. Wessels, M. R. Stratton, U. McDermott, M. Meyerson, M. J. Garnett and H. Clevers. Prospective derivation of a living organoid biobank of colorectal cancer patients. *Cell.* 161, 933-945. 2015.
48. A. Calon, E. Lonardo, A. Berenguer-Llargo, E. Espinet, X. Hernando-Momblona, M. Iglesias, M. Sevillano, S. Palomo-Ponce, D. V. Tauriello, D. Byrom, C. Cortina, C. Morral, C. Barcelo, S. Tosi, A. Riera, C. S. Attolini, D. Rossell, E. Sancho and E. Batlle. Stromal gene expression defines poor-prognosis subtypes in colorectal cancer. *Nat Genet.* 47, 320-329. 2015.
49. C. Isella, A. Terrasi, S. E. Bellomo, C. Petti, G. Galatola, A. Muratore, A. Mellano, R. Senetta, A. Cassenti, C. Sonetto, G. Inghirami, L. Trusolino, Z. Fekete, M. De Ridder, P. Cassoni, G. Storme, A. Bertotti and E. Medico. Stromal contribution to the colorectal cancer transcriptome. *Nat Genet.* 47, 312-319. 2015.
50. G. Kroemer and J. Pouyssegur. Tumor cell metabolism: cancer's Achilles' heel. *Cancer Cell.* 13, 472-482. 2008.
51. G. L. Semenza. Oxygen sensing, hypoxia-inducible factors, and disease pathophysiology.

Annu Rev Pathol. 9, 47-71. 2014.

52. M. Fujii, M. Matano, K. Nanki and T. Sato. Efficient genetic engineering of human intestinal organoids using electroporation. *Nat Protoc.* 10, 1474-1485. 2015.

53. F. Kuhnert, C. R. Davis, H. T. Wang, P. Chu, M. Lee, J. Yuan, R. Nusse and C. J. Kuo. Essential requirement for Wnt signaling in proliferation of adult small intestine and colon revealed by adenoviral expression of Dickkopf-1. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 101, 266-271. 2004.

54. D. Pinto, A. Gregorieff, H. Begthel and H. Clevers. Canonical Wnt signals are essential for homeostasis of the intestinal epithelium. *Genes Dev.* 17, 1709-1713. 2003.

55. N. Barker and H. Clevers. Catenins, Wnt signaling and cancer. *Bioessays.* 22, 961-965. 2000.

56. O. J. Sansom, K. R. Reed, A. J. Hayes, H. Ireland, H. Brinkmann, I. P. Newton, E. Batlle, P. Simon-Assmann, H. Clevers, I. S. Nathke, A. R. Clarke and D. J. Winton. Loss of Apc in vivo immediately perturbs Wnt signaling, differentiation, and migration. *Genes Dev.* 18, 1385-1390. 2004.

57. J. Y. Leung, F. T. Kolligs, R. Wu, Y. Zhai, R. Kuick, S. Hanash, K. R. Cho and E. R. Fearon. Activation of AXIN2 expression by beta-catenin-T cell factor. A feedback repressor pathway regulating Wnt signaling. *J Biol Chem.* 277, 21657-21665. 2002.

58. T. Reya and H. Clevers. Wnt signalling in stem cells and cancer. *Nature.* 434, 843-850. 2005.

59. B. K. Koo, M. Spit, I. Jordens, T. Y. Low, D. E. Stange, M. van de Wetering, J. H. van Es, S. Mohammed, A. J. Heck, M. M. Maurice and H. Clevers. Tumour suppressor RNF43 is a stem-cell E3 ligase that induces endocytosis of Wnt receptors. *Nature.* 488, 665-669. 2012.

60. W. de Lau, W. C. Peng, P. Gros and H. Clevers. The R-spondin/Lgr5/Rnf43 module: regulator of Wnt signal strength. *Genes Dev.* 28, 305-316. 2014.

61. I. Baba, S. Shirasawa, R. Iwamoto, K. Okumura, T. Tsunoda, M. Nishioka, K. Fukuyama, K. Yamamoto, E. Mekada and T. Sasazuki. Involvement of deregulated epiregulin expression in tumorigenesis in vivo through activated Ki-Ras signaling pathway in human colon cancer cells. *Cancer Res.* 60, 6886-6889. 2000.

62. M. Matano, S. Date, M. Shimokawa, A. Takano, M. Fujii, Y. Ohta, T. Watanabe, T. Kanai and T. Sato. Modeling colorectal cancer using CRISPR-Cas9-mediated engineering of human intestinal organoids. *Nat Med.* 21, 256-262. 2015.

63. L. K. Goh, F. Huang, W. Kim, S. Gygi and A. Sorkin. Multiple mechanisms collectively regulate clathrin-mediated endocytosis of the epidermal growth factor receptor. *J Cell Biol.* 189, 871-883. 2010.

64. O. A. Ogunbiyi, P. J. Goodfellow, K. Herfarth, G. Gagliardi, P. E. Swanson, E. H. Birnbaum, T. E. Read, J. W. Fleshman, I. J. Kodner and J. F. Moley. Confirmation that chromosome 18q allelic loss in colon cancer is a prognostic indicator. *J Clin Oncol.* 16, 427-433. 1998.
65. L. Sarli, L. Bottarelli, G. Bader, D. Iusco, S. Pizzi, R. Costi, T. D'Adda, M. Bertolani, L. Roncoroni and C. Bordi. Association between recurrence of sporadic colorectal cancer, high level of microsatellite instability, and loss of heterozygosity at chromosome 18q. *Dis Colon Rectum.* 47, 1467-1482. 2004.
66. B. K. Koo, J. H. van Es, M. van den Born and H. Clevers. Porcupine inhibitor suppresses paracrine Wnt-driven growth of Rnf43;Znrf3-mutant neoplasia. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 112, 7548-7550. 2015.
67. J. Liu, S. Pan, M. H. Hsieh, N. Ng, F. Sun, T. Wang, S. Kasibhatla, A. G. Schuller, A. G. Li, D. Cheng, J. Li, C. Tompkins, A. Pferdekamper, A. Steffy, J. Cheng, C. Kowal, V. Phung, G. Guo, Y. Wang, M. P. Graham, S. Flynn, J. C. Brenner, C. Li, M. C. Villarroel, P. G. Schultz, X. Wu, P. McNamara, W. R. Sellers, L. Petruzzelli, A. L. Boral, H. M. Seidel, M. E. McLaughlin, J. Che, T. E. Carey, G. Vanasse and J. L. Harris. Targeting Wnt-driven cancer through the inhibition of Porcupine by LGK974. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 110, 20224-20229. 2013.