

令和 3 年 6 月 16 日現在

機関番号：82606

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2018～2020

課題番号：18K07283

研究課題名(和文) シングルセルレベルでのがん幹細胞集団の細胞不均一性解析と新規治療標的遺伝子の探索

研究課題名(英文) Single-cell gene expression analysis reveals the cellular heterogeneity of colon tumors and identifies novel therapeutic target genes

研究代表者

塩川 大介 (Shiokawa, Daisuke)

国立研究開発法人国立がん研究センター・研究所・ユニット長

研究者番号：90277278

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)：本研究において我々はシングルセルレベルでLGR5+大腸がん幹細胞の性状解析を行った。マウスLGR5+がん幹細胞は増殖型と休止型に大別され、その遺伝子発現プロファイルから休止型がん幹細胞は我々が以前に報告した高造腫瘍能がん幹細胞に一致することを示した。さらに当該休止型がん幹細胞はヒト大腸がんにも存在すること、マウスヒト休止型がん幹細胞に共通する7つのシグネチャー遺伝子を明らかにした。当該遺伝子群の1つであるPROX1発現はTCF7転写因子により制御され、がん幹細胞の休止状態の確立に必須であることを示した、さらにPROX1遺伝子の不活性化により抗がん剤処理後の再増殖が強く抑制されることを見出した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究の成果により、これまで不明であったLGR5陽性幹細胞群の細胞多様性が明らかになり、当該細胞集団が増殖型と休止型の2種に大別されることが示された。さらに休止型がん幹細胞で特異的に発現する遺伝子であるPROX1の機能を抑制することにより抗がん剤への感受性を高めることに成功した。即ち、本件研究の成果として得られた知見は、がん本態解明を目指す基礎研究としてのみならず、効果的ながん治療法の開発の礎となり社会に貢献する大きな意義を持つ研究成果であると考えられる。

研究成果の概要(英文)：LGR5 is an established stem cell marker gene in many digestive tissues, and we previously showed that a subpopulation of LGR5+ cells in colon tumors were responsible for tumorigenicity. In this study, we demonstrated that the tumorigenic subpopulation of mouse LGR5+ cells exist in a quiescent state, and identified a unique gene signature that characterize these quiescent CSCs. Furthermore, seven of the signature genes are specifically expressed in a quiescent LGR5+ cells from xenografted human colon tumors and upregulated in colon cancer clinical specimens. Among these seven, PROX1 is expressed in invasive fronts of colon tumors, and shown to be induced by TCF7 to maintain a quiescent state. Importantly, PROX1 knockout significantly reduces tumor recurrence after chemotherapeutic treatment. The identified slow-cycling CSC signatures will be instrumental in targeting the chemoresistant CSCs and devising effective chemotherapy.

研究分野：がん生物学

キーワード：シングルセル がん幹細胞

## 1．研究開始当初の背景

がん組織を構成する細胞は均一では無く、異なった性状を持つ細胞群から成るヘテロな集団であることが知られている。がんの細胞不均一性を明らかにし、がん組織を構成する個々の細胞の個性を理解することは、がんの発生メカニズム、さらには細胞群ごとに異なる抗がん剤へのレスポンスを考慮した効率の良いがん治療戦略を考える上で非常に重要なテーマである。しかし、実際のがん組織がどのような種類の細胞群から構成されるかに関しては、現在まで免疫染色等の手法に基づき分類されているのが現状であり、その詳細は不明な点が多い。さらにはがん組織の源である「がん幹細胞自体の不均一性」に至っては、本格的な解析が始められたばかりである。

## 2．研究の目的

これまでの研究成果に於いて我々は、Lgr5 陽性大腸がん幹細胞集団に存在する「特に造腫瘍能の高い亜集団」の同定に成功している。本課題に於いては、「当該幹細胞集団の詳細な性状の理解」、「特徴的な高発現遺伝子の網羅的探索」、さらに、がん幹細胞を標的とするがん治療法の開発を目指した「新規な治療標的遺伝子の発見」を目的に研究を行う。

## 3．研究の方法

### 実験 1、サンプルの準備

ApcMin マウスに DSS を経口投与することにより作成した大腸腫瘍組織、及び対応する非腫瘍組織を、独立に 3 組（合計 6 サンプル）準備する。それぞれの組織より上皮細胞を Epcam 陽性を指標にシングルセルソーティングし RNA-seq 用ライブラリーの作成を行う。さらにそれぞれのサンプルよりバルクソーティングした上皮細胞より cDNA 合成、オルガノイド培養細胞の樹立を行い、以下で行うトランスクリプトーム解析で得られた結果の検証実験に用いる。シングルセルソーティングに於いては、Cd24 発現を指標に Lgr5 陽性幹細胞の濃縮を行い、さらに得られた RNA-seq 解析用 cDNA を RT-PCR 法を用い解析し、Lgr5 陽性のサンプルのみを実験 2 で行う解析に用いる。

### 実験 2、シングルセル RNA-seq によるトランスクリプトーム解析

実験 1 で作成した RNA-seq 用ライブラリーのシークエンスデータを次世代シークエンサー (HiSeq2500) を用い取得し、マウスゲノムのリファレンス配列にマッピングする。得られた結果より個別細胞での遺伝子発現レベルを計算後、階層的クラスタリング法により Lgr5 陽性幹細胞集団のグループ分けを行う。さらに PCA や tSNE などの次元圧縮法と組み合わせることにより、Lgr5 陽性幹細胞集団内の細胞不均一性を可視化する。

### 実験 3、CRISPR/Cas9 システムを用いた治療標的候補遺伝子の機能解析

実験 1 に於いて作成された腫瘍由来オルガノイドを用い、実験 2 で見出された治療標的候補遺伝子の機能解析を行う。具体的には、1 遺伝子あたり 3 種の sgRNA 配列を持った CRISPR/Cas9 ベクターをそれぞれレンチウイルスでオルガノイドに導入し標的遺伝子の破壊を行う。得られたオルガノイドの増殖能、造腫瘍能等の特性を評価し、腫瘍細胞の生存、増殖に必須である遺伝子を絞り込む。

### 実験 4、ヒト PDX 腫瘍を用いた治療標的候補遺伝子の有効性評価

ここまでの成果により得られた治療標的候補遺伝子は、あくまで動物レベルで有効と判断された候補である。モデルマウスを用いた発がん実験は、結果が安定すること、非がん部とがん部を確実に比較できること等の点で優れているが、臨床へのトランスレーションを考える上でヒト PDX 腫瘍を用いた検証作業は必須であると考ええる。

まず、モデルマウスで見出された治療標的候補遺伝子がヒト LGR5 陽性幹細胞で発現しているかを、RNA-seq 法に比べ検出感度と費用対効果に優れるシングルセル qPCR 法により検証する。必要な条件を満たした候補遺伝子に関して、ドキシサイクリン誘導性 CRISPR/Cas9 ベクターを作成し（1 遺伝子あたり 3 通りの sgRNA を設計）、予めルシフェラーゼ遺伝子を組み込んだ大腸がん手術検体由来のがん幹細胞スフェロイド培養にレンチウイルスを用い導入する。得られたスフェロイド培養を免疫不全マウスに移植、ゼノグラフト腫瘍の形成を確認した後ドキシサイクリンを動物に投与、標的遺伝子のノックアウトを行う。腫瘍の退縮は IVIS イメージングシステムを用い測定する。尚、本実験に用いるスフェロイド培養は遺伝子変異のタイプごとに複数検体をテストし、どのようなタイプの大腸がんが有効であるかの評価も行う。

#### 4. 研究成果

がん組織を構成する細胞は均一では無く、異なった性状を持つ細胞群から成るヘテロな集団であることが知られている。我々はまずシングルセル qPCR 法を用い、がん組織に於ける細胞不均一性の詳細を明らかにすること、さらに正常幹細胞とがん幹細胞の遺伝子発現プロファイルの相違に基づく新たながん治療標的分子の同定を試みた。

Min マウスに DSS 投与後経時的に動物を屠殺、大腸よりがん部、非がん部を回収した。得られた組織からセルソーターを用いシングルセルを調製、様々な腸管上皮細胞の分化状態に特徴的な遺伝子の発現パターンを qPCR 法により解析した。得られた結果をクラスタリング解析することにより、正常及びがん細胞を 7 種のグループに分類した。また、シングルセル遺伝子発現データを PCA 法により次元圧縮を行い 2 次元プロット上に細胞分布を可視化した。PCA プロット上に分類された 7 グループがどのような細胞集団を表すのかをそれぞれのグループに特徴的な遺伝子発現に基づきアノテーションを行った結果、吸収系分化細胞 (Abs Diff)、吸収系プロジェニター細胞 (Abs Pro)、分泌系分化細胞 (Sec Diff)、分泌系プロジェニター細胞 (Sec Pro)、正常幹細胞 (Stem N)、及びがん幹細胞 (Stem T) からなる細胞集団であると判定された。さらに得られた結果をサンプルごとに分離し各細胞集団の発がんに伴う経時変化を調べた。興味深いことに発がんに伴い、1) 分泌系細胞は幹細胞からプロジェニター細胞への分化過程が阻害される、2) 吸収系細胞はプロジェニター細胞への分化は行われるが最終分化過程が阻害される、3) 幹細胞集団は発がんに伴い新たな細胞集団 (Stem T) が出現する、ことが明らかになった (図 1)。

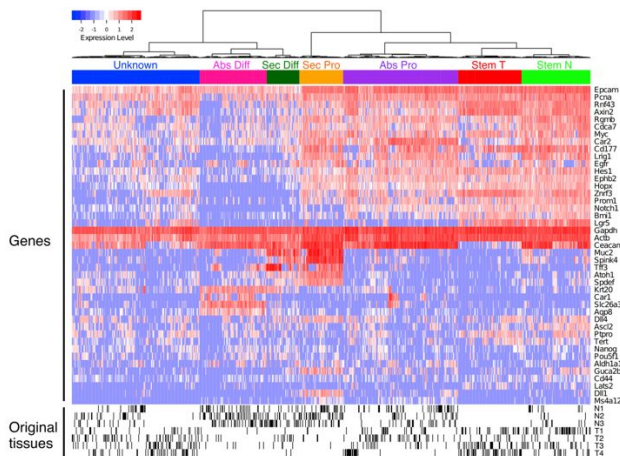


図 1、腸管上皮細胞の階層クラスタリングによる分類

正常 (N1-N3) 及びがん組織 (T1-T4) 由来の上皮細胞を 7 群に分類した。

発がんに伴う幹細胞の性状変化の実態を明らかにするため、正常およびがん組織から回収した幹細胞集団に於ける WNT ターゲット遺伝子群の発現プロファイルを調べた。当該実験に於いては、腸管上皮細胞の幹細胞マーカーとして広く用いられている LGR5 遺伝子発現を指標とした。DSS 投与 Min マウスの大腸よりがん部、非がん部を回収し、酵素処理により得られた細胞を EPCAM/CD24 発現を基にシングルセルソーティングした。それぞれの細胞より cDNA を合成、腸管幹細胞で発現する WNT ターゲット遺伝子の発現レベルを定量した。得られたデータセットより LGR5 遺伝子陽性細胞を選択し以下の解析を行った。上述により得られたシングルセルデータをクラスタリング法により 4 種のグループに分類した。さらに PCA 法により 3 次元プロット上にそれぞれの細胞集団を可視化した。得られた結果を正常及びがん由来のサンプル群に分けて解析したところ、正常組織由来 LGR5 陽性幹細胞は A, B 及び C の 3 群から構成されること、がん組織由来 LGR5 陽性幹細胞は B, C 及び D の 3 群から構成されることが明らかとなった。即ち、がんの発生に伴い新たな幹細胞集団 (Stem D) が出現することを見出した (図 2)。

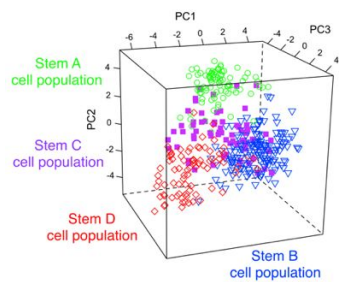


図 2、LGR5 陽性幹細胞の遺伝子発現プロファイルに基づく PCA 次元圧縮による可視化

上述の成果により見出されたがん特異的幹細胞の性状を詳細に解析するため、我々はシングルセル RNA-seq 法を用い、Min マウス大腸がん組織由来 LGR5 陽性幹細胞のトランスクリプトーム解析を行った。得られた遺伝子発現データに基づき LGR5 陽性がん幹細胞を 3 グループに分類、WNT ターゲット遺伝子群の発現プロファイルの比較により、グループ 1 が上述のがん特異的幹細胞集団 (Stem D) に相当することを見出した (図 3)。GSEA の結果が示す様に当該幹細胞群では TNF, WNT シグナル等に関連する遺伝子セットが高発現するが、興味深いことに細胞増殖に関連する遺伝子群は強く抑制されることが明らかになった。即ち、大腸がんの発生に伴い出現する幹細胞群は休眠型の幹細胞であることが示された (図 4)。この Min マウス大腸がんモデ

ルで見出された休眠型がん幹細胞はヒト大腸がんでも保存されており、我々はマウス及びヒトの休眠型がん幹細胞に共通する7つのシグネチャー遺伝子、APCDD1, KRT17, MEX3A, NOTUM, PROX1, SP5, さらに ZNF503 を同定した。

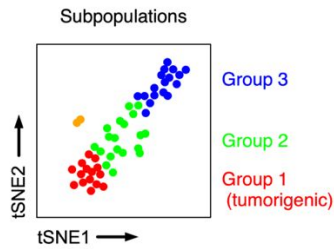


図3、LGR5 陽性がん幹細胞のシングルセルトランスクリプトームデータに基づく分類

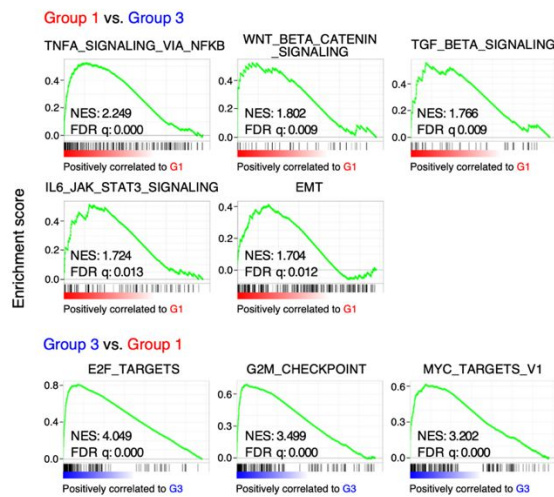


図4、LGR5 陽性がん幹細胞群の Gene Set Enrichment 解析

この休眠型がん幹細胞はどのようなメカニズムでその休眠状態を確立しているのだろうか？この問いに答えるため我々は当該シグネチャー遺伝子の機能解析を行い、7 遺伝子の一つである転写因子 PROX1 がサイクリンインヒビターp57(CDKN1C)を発現誘導し細胞周期の停止状態を確立することを示した。さらに PDX モデルによる抗癌剤感受性試験の結果から 1) 当該休眠型がん幹細胞群が治療抵抗性細胞の本態であること、さらに 2) PROX1 遺伝子の遺伝子破壊により抗癌剤治療後の再発がん形成が強く抑制されることを見出した(図6)。

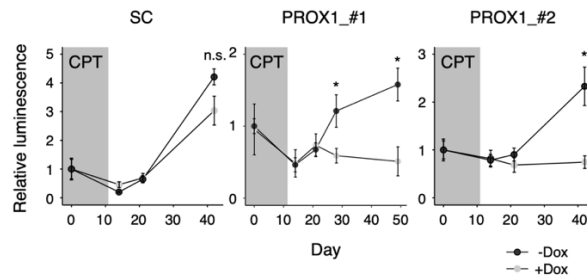


図6、抗癌剤治療後の再発がん形成に於ける PROX1 の役割

免疫不全マウス PDX モデルに於いてドキシサイクリン(Dox)誘導 CRISPR-Cas9 システムを用い PROX1 遺伝子を in vivo で破壊した。さらにカンプトテシン(CPT)投与による腫瘍退縮と投与停止後の再発がん形成を IVIS システムにより観察した。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計1件（うち査読付論文 1件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 1件）

1. 著者名 Ohata H, Shiokawa D, Obata Y, Sato A, Sakai H, Fukami M, Hara W, Taniguchi H, Ono M, Nakagama H, Okamoto K	4. 巻 28
2. 論文標題 NOX1-Dependent mTORC1 Activation via S100A9 Oxidation in Cancer Stem-like Cells Leads to Colon Cancer Progression.	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Cell Rep.	6. 最初と最後の頁 1282-1295
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.celrep.2019.06.085	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -

〔学会発表〕 計2件（うち招待講演 1件/うち国際学会 0件）

1. 発表者名 Daisuke Shiokawa, Hirokazu Ohata, Koji Okamoto
2. 発表標題 Transcriptional factor Tcf1 controls the drug resistance of Lgr5-positive colon tumor stem cells
3. 学会等名 日本癌学会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Daisuke Shiokawa
2. 発表標題 The slow-growing sub-population of Lgr5-positive colon tumor stem cells is resistant to an anti-cancer drug treatment
3. 学会等名 日本癌学会（招待講演）
4. 発表年 2018年

〔図書〕 計1件

1. 著者名 塩川大介	4. 発行年 2019年
2. 出版社 羊土社	5. 総ページ数 646
3. 書名 阻害剤・活性化剤ハンドブック（秋山徹、河府和義 編）	

〔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
--	---------------------------	-----------------------	----

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
---------	---------