

令和 4 年 5 月 30 日現在

機関番号：17102

研究種目：基盤研究(B) (一般)

研究期間：2019～2021

課題番号：19H03732

研究課題名(和文) 膵癌PDXライブラリ-を用いたシングルセル解析による腫瘍内治療抵抗不均一性の解明

研究課題名(英文) Elucidation of the intratumor therapeutic resistance heterogeneity using single-cell transcriptome of the PDX libraries with pancreatic cancer.

研究代表者

中村 雅史 (NAKAMURA, Masafumi)

九州大学・医学研究院・教授

研究者番号：30372741

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 13,300,000円

研究成果の概要(和文)：本研究は膵癌の治療抵抗性を解明するためにPDXモデルやヒト膵癌オルガノイドを作成し腫瘍内の多彩な細胞集団を再現すること、さらにそれらに対しシングルセル解析を行うことで腫瘍内不均一性の詳細な評価を行うために開始された。

PDXモデルに関して、ヒト膵癌モデルは6例、ヒト食道癌モデルは4例の作製に成功した。さらに二次移植に関して、前者は4例、後者は3例で可能であった。またヒト膵癌オルガノイドに関しても安定した樹立手技を確立した。シングルセル解析の導入のため、食道癌検体を使用したシングルセル解析を行った。Tリンパ球などの免疫細胞をはじめとした詳細な細胞種へ分類することができた。

研究成果の学術的意義や社会的意義

膵癌は難治性固形腫瘍の代表疾患であるが治療抵抗性に関する細胞集団などの機能など未だ不明な点が多い。また従来の手法で樹立された癌細胞株は本来のヒト原発巣の不均一性を完全には保持できていない。本研究で膵癌のPDXモデル・オルガノイドモデルの樹立が可能となったことで原発巣の腫瘍微小環境の不均一性をより詳細に再現することができ、さらに他の癌腫でも広く本手法の応用が可能である。さらにシングルセル解析の手法を確立したことにより、我々が樹立したヒト膵癌PDXモデルを用いた単一細胞レベルでの腫瘍微小環境の不均一性を解析することができ、化学療法感受性や耐性獲得などの治療抵抗性の解析が可能となると考えられる。

研究成果の概要(英文)：To elucidate the therapeutic resistance with pancreatic cancer, we started to generate PDX models and organoids and to perform single-cell transcriptome analysis.

Firstly, we have generated 6 PDX models with pancreatic cancers and 4 PDX models with esophageal cancers. Moreover, we produced secondary transplantation PDX models, such as 4 cases with pancreatic cancer and 3 cases with esophageal cancer. We have established a stable technique for human pancreatic cancer organoids. Additionally, to introduce single-cell transcriptome analysis, we analyzed with esophageal cancers preliminarily. We classified into detailed cell types including immune cells.

研究分野：医歯薬学

キーワード：膵癌 PDX シングルセル解析 治療抵抗性 腫瘍内不均一性

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

膵癌は予後が極めて不良な固形腫瘍であるが、その理由として腫瘍微小環境内の様々な細胞集団の不均一性が治療抵抗性に寄与していることが報告されている。膵癌の治療抵抗性、特に抗癌剤耐性や再発・転移に強く関わる細胞集団の解明やその機能的な特性を評価する必要があるが、これまで使用されてきた癌細胞株はヒトの原発巣の特徴を完全には保持できておらず、腫瘍微小環境の相同性を維持した腫瘍モデルの構築が必要である。また、これまでの癌の抵抗性に関する研究は、一つの腫瘍組織単位での評価、いわゆる Bulk での解析がほとんどであったが、近年シングルセル解析という単一細胞レベルでの網羅的な遺伝子発現解析を行う画期的な手法が開発され、腫瘍微小環境内の不均一性の解明が進んでいる。

2. 研究の目的

今回、患者腫瘍組織移植 (patient-derived xenograft: PDX)モデルや膵癌オルガノイドモデルを作製することでヒト原発巣の腫瘍微小環境の不均一性を再現する。さらに、それらに対しシングルセル解析を用いて単一細胞レベルでの多様な細胞集団の機能的解析を行うことで癌の治療抵抗性に関わる機能的な細胞集団を解明し新たな治療戦略を解明するために本研究は開始された。

3. 研究の方法

ヒト悪性腫瘍 PDX モデルライブラリーの作製

外科的切除した新鮮な腫瘍組織を小切片に切離し、超免疫不全マウスへ皮下移植する。移植腫瘍が生着・増大した所で腫瘍を単細胞へと懸濁しフローサイトメトリーで上皮系マーカーである CK19 とヒト白血球抗原 (HLA) を発現するヒト由来の癌細胞集団であることを確認する。

ヒト膵癌オルガノイドの作製

膵癌オルガノイドと呼ばれる、患者膵癌の遺伝情報や表現型を保持した 3 次元生体外モデルに関して、ヒト膵癌切除検体を使用し作成する。

シングルセル解析の導入

シングルセル解析は対象検体を単一細胞化したのちに drop-seq 技術を用いた網羅的な発現解析を行う技術であり、各細胞の機能的な遺伝子発現の違いを元にシングルセル解析専用の R パッケージを用いて評価を行う。まずシングルセル解析の導入として、食道癌サンプルを使用し各細胞種への分類を検討した。

4. 研究成果

ヒト悪性腫瘍 PDX モデルライブラリーの作製

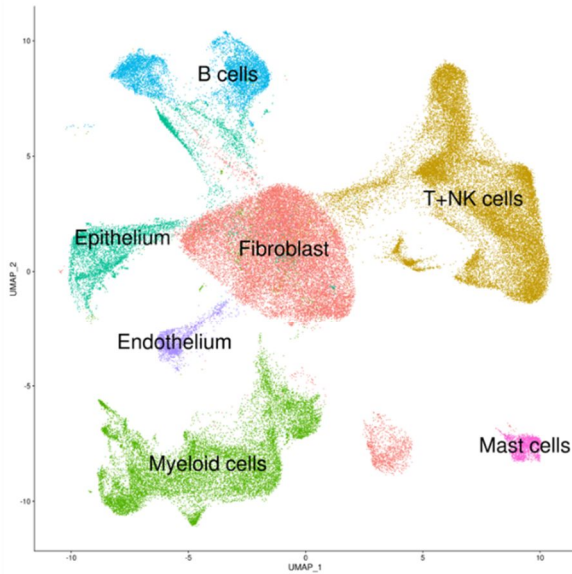
これまで、外科切除したヒト膵癌組織を使用し、超免疫不全マウスへの皮下移植を行ったところ、6 例の膵癌患者より採取した腫瘍組織片を用いた PDX モデルの樹立が完了した。さらに、二次移植を行ったところ、4 例の二次移植が可能であった。一方、消化管癌として食道癌に対しても同様の PDX モデル作製を検討した。膵癌と同様の手法を用いて、4 例の食道癌患者の PDX モデルが樹立でき、さらに 3 例の二次移植が可能であった。以上により PDX モデル作製に関するプロトコル・手法が確立できた。

ヒト膵癌オルガノイドの作製

ヒト膵癌切除組織を使用したオルガノイドモデルも 10 例程度樹立することができた。様々な病理組織学的分化度での樹立が可能であった。

シングルセル解析の導入

シングルセル解析の導入のために、preliminary な解析として食道癌サンプルを使用した解析を行った。それぞれの細胞に特徴的な遺伝子発現を網羅的に解析し subpopulation へと分類したところ、T リンパ球・B リンパ球・骨髄球系細胞といった免疫細胞のほかに、線維芽細胞・血管内皮細胞・肥満細胞などの詳細な細胞種へクラスター分類できた。



(図1) 腫瘍微小環境内の詳細なサブタイプ分類

(まとめ)

ヒト膀胱癌・食道癌 PDX モデルの樹立に成功し、PDX モデル作製に関するプロトコール・手法を確立した。またヒト膀胱癌オルガノイドの作製を行った。シングルセル解析を用いて、腫瘍組織内の様々な細胞種へのクラスター分類の手法を獲得した。

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 Shinkawa Tomohiko, Ohuchida Kenoki, Mochida Yuki, Sakihama Kukiko, Iwamoto Chika, Abe Toshiya, Ideno Noboru, Mizuuchi Yusuke, Shindo Koji, Ikenaga Naoki, Moriyama Taiki, Nakata Kohei, Oda Yoshinao, Nakamura Masafumi | 4. 巻 41 |
| 2. 論文標題 Subtypes in pancreatic ductal adenocarcinoma based on niche factor dependency show distinct drug treatment responses | 5. 発行年 2022年 |
| 3. 雑誌名 Journal of Experimental Clinical Cancer Research | 6. 最初と最後の頁 89 |
| 掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1186/s13046-022-02301-9 | 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4件（うち招待講演 0件/うち国際学会 0件）

| |
|--|
| 1. 発表者名 奥田翔、大内田研宙、大坪慶志輝、中村祥一、久野恭子、持田郁己、新川智彦、寅田信博、水内祐介、進藤幸治、森山大樹、仲田興平、中村雅史 |
| 2. 発表標題 Single-cell RNA-sequenceを用いた食道扁平上皮癌の免疫環境についての解析 |
| 3. 学会等名 第29回日本消化器関連学会週間（JDDW 2021） |
| 4. 発表年 2021年 |

| |
|---|
| 1. 発表者名 新川智彦、大内田研宙、持田郁己、小山虹輝、林昌孝、松本奏吉、岩本千佳、進藤幸治、池永直樹、仲田興平、中村雅史 |
| 2. 発表標題 分化型膵癌は癌関連線維芽細胞由来の微小環境因子に依存して分化度を保持している |
| 3. 学会等名 第52回日本膵臓学会大会 |
| 4. 発表年 2021年 |

| |
|---|
| 1. 発表者名 新川智彦、大内田研宙、持田郁己、奥田翔、大坪慶志輝、岩本千佳、進藤幸治、池永直樹、仲田興平、中村雅史 |
| 2. 発表標題 膵癌における癌関連線維芽細胞由来の微小環境因子が腫瘍分化度に与える影響についての検討 |
| 3. 学会等名 第76回日本消化器外科学会総会 |
| 4. 発表年 2021年 |

| |
|--|
| 1. 発表者名 Shinkawa T, Ohuchida K, Matsumoto S, Iwamoto C, Shindo K, Nakata K, Ohtsuka T, Nakamura M |
| 2. 発表標題 Subtype classification of pancreatic ductal adenocarcinoma based on microenvironmental niche factors dependency and chemotherapy resistance |
| 3. 学会等名 14th World Congress of International Hepeto-Pancreato-Biliary Association(IHPBA) |
| 4. 発表年 2020年 |

〔図書〕 計0件

〔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 |
|-------|---|---|----|
| 研究分担者 | 仲田 興平 (NAKATA Kohei) (30419569) | 九州大学・大学病院・講師 (17102) | |
| 研究分担者 | 宮坂 義浩 (MIYASAKA Yoshihiro) (40507795) | 九州大学・医学研究院・共同研究員 (17102) | |
| 研究分担者 | 藤田 逸人 (FUJITA Hayato) (40611281) | 九州大学・医学研究院・共同研究員 (17102) | |
| 研究分担者 | 大内田 研宙 (OHUCHIDA Kenoki) (20452708) | 九州大学・大学病院・講師 (17102) | |
| 研究分担者 | 大塚 隆生 (OHTSUKA Takao) (20372766) | 鹿児島大学・歯学部医学系・教授 (17701) | |

6. 研究組織（つづき）

| | 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 |
|-------------------|---|--|----|
| 研究 分 担 者 | 森山 大樹 (MORIYAMA Taiki) (70586859) | 九州大学・大学病院・准教授 (17102) | |

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 |
|---------|---------|
| | |