

令和 4 年 5 月 30 日現在

機関番号：32612

研究種目：基盤研究(B) (一般)

研究期間：2019～2021

課題番号：19H03792

研究課題名(和文)腎癌幹細胞ニッチを掌握する解析基盤の構築とがん組織不均一性の理解

研究課題名(英文)Targeting cancer stem cells and spatial niches in kidney cancer: Unravelling intratumoral heterogeneity

研究代表者

田中 伸之(TANAKA, NOBUYUKI)

慶應義塾大学・医学部(信濃町)・講師

研究者番号：60445244

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 13,500,000円

研究成果の概要(和文)：本研究で我々は、癌幹細胞やその癌幹細胞が生息する「立体的な癌幹細胞ニッチ」の解明に必要な研究基盤を整備した。マウス腫瘍由来の「細胞単離 シングルセルRNAシーケンス」プロトコールは、ヒト腫瘍でも応用可能と考える。マウス腫瘍を最新のICELL8 cx Single-Cell System を利用し、8000を超える細胞のシーケンスを実装した、独自のイメージング技術：DIIFCO法を臨床組織で実装し、癌幹細胞が生息するニッチ構造を3次元で可視化した、多重免疫染色法を駆使した最新のsingle-cell pathologyで、臨床の腎細胞癌免疫微小環境を1細胞レベルで可視化した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

癌幹細胞を頂点とする細胞階層性が紡ぎ出す「がん組織多様性」をいかに克服するか、これが近年の癌研究における課題である。分子標的治療・免疫療法後に生き永らえる癌細胞はどのクローン(癌幹細胞)に由来し、どこ(どのような癌微小環境)に生息するのであろうか?治療耐性を促す癌幹細胞が生息するニッチ構造を、3次元で明らかにすることは、癌根絶に繋がる糸口であり、社会的な波及効果は大きい。今後も新規イメージングの臨床応用を視野とした基盤整備を進めるが、本研究で得られるイメージング技術の知見は、最終的にシングルセルRNAシーケンスと融合するためのプロトコール開発に繋げ、癌幹細胞ニッチの同定に活用したいと考える。

研究成果の概要(英文)：How to overcome the inter and intra "tumor heterogeneity" created by the cancer stemness and cellular hierarchy is an issue in recent cancer research. In this research, we have established a new research modality for elucidating cancer stem cells and the "three-dimensional cancer stem cell niche" in which they inhabit. First, single-cell isolation and RNA sequence protocol derived from mouse tumors can also be applied to human tumors; thereby using the latest ICELL8 cx Single-Cell System, we have implemented a sequence of over 8000 cells from mouse tumors. Second, using a new imaging platform named as the DIIFCO method and clinical tissues, we have uncovered the niche structure inhabited by cancer stem cells in three-dimension. Third, applying the latest multiplexed single-cell pathology, we have visualized the clinical renal cell carcinoma immune microenvironment at single-cell resolution. In sum, our imaging method may have a wider effect on a research community worldwide.

研究分野：泌尿器科学

キーワード：腎細胞癌 分子標的治療 免疫治療 イメージング シーケンス

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

## 1. 研究開始当初の背景

進行性腎がんの薬物療法は近年劇的に進歩し、免疫チェックポイント阻害薬や分子標的薬(血管新生・mTOR 阻害薬等)が中心となった。免疫チェックポイント阻害剤の成功を背景に、今や免疫はがん領域で最も注目される現象である。一方、がん治療中の腫瘍内微小環境は極度の低酸素・低栄養のため、生存に適応し得るサブクローンが常時生み出される。その結果、癌細胞は多様性に富んでいく(細胞の不均一性)。この「がん組織多様性」の概念は、個々の腫瘍毎の相違(腫瘍間不均一性)を飛び越え、同一腫瘍内における単一細胞レベルで異なる癌細胞や間質内のミクロな免疫微小環境の相違(腫瘍内不均一性)へ及ぶ。そして癌幹細胞を頂点とする細胞階層性が紡ぎ出す「がん組織多様性」をいかに克服するか、これが近年の癌研究の喫緊な課題である。

免疫チェックポイント阻害薬は、これまでの標準治療(抗がん剤等)と比較して、効果に個人差が強く、全体の奏効率は20%程度である。さらに、多くの腎がんは一時的な奏功で、間もなく再燃し耐性化する。このがん免疫治療下の臨床像「奏功 再燃 耐性化」は、癌幹細胞や腫瘍内への免疫浸潤がもたらす「がん組織多様性」の関与を疑う。しかし、現在の高精度医療は依然としてバルク組織での「腫瘍間で異なるゲノム不安定性に対して、個別に対応しながら行う医療」に捉われており、バイオマーカー開発もバルク組織での検討に留まる。一方、実際の腫瘍組織では、癌細胞に生じる様々な遺伝子・エピジェネティック変異に加え、再燃過程において微小環境に刻々と構造変化が起こり得る。では、免疫治療の耐性克服を可能にする「がん組織多様性」の解明は、バルクな枠組みで達成可能であろうか?この点で我々は、単一細胞レベルでの多様性解析が、バイオマーカーや治療耐性を克服する革新的な免疫治療法の開発に不可欠と考えた。

## 2. 研究の目的

それでは、分子標的・免疫治療後に生き永らえる癌細胞はどのクローン(癌幹細胞)に由来し、どこ(どのような微小環境)に生息するのであろうか?治療耐性を促す癌幹細胞が生息するニッチ構造を明らかにすることは、癌根絶に繋がる糸口であり、社会的な波及効果は大きい。我々は、これら「問い」への回答には、シングルセルRNA シークエンスで1細胞レベルの癌幹細胞トランスクリプトームを明らかにし、独自の新規イメージング(ライトシート顕微鏡や膨張顕微鏡法等)により生体内で立体的に可視化することで、治療耐性を促す癌幹細胞が生息するニッチの空間情報を明らかにすることが必要と考えた。

また、腫瘍内における癌微小環境の不均一性も「癌幹細胞性の維持」には欠かせない。進行・再燃過程の腫瘍組織では、がん特有の脈管・層構造で複雑化したがん間質へ入り込む免疫細胞も多様性に富む。近年、急速に発展しているシングルセルパソロジー(単一細胞病理)では、多重染色後にバーチャル化されたスライド画像を用いることで、腫瘍内に浸潤する免疫細胞が1細胞レベルで自動定量化できる(オートメーションシングルセルカウント)。我々は、本手法をいち早く取り入れることで、腫瘍免疫微小環境の中に存在する異質な免疫細胞を可視化し、幹細胞性維持や分子標的治療・免疫療法耐性に関与する宿主因子も多様性解析を行いたいと考えた。

本研究は、1) 難治性腎がんの「癌幹細胞」を1細胞レベルで明らかにし、2) これら癌幹細胞が生息する微小環境、即ち癌幹細胞ニッチの3次元構造を再現し、3) 腫瘍内で混在するサブクローンや腫瘍免疫浸潤の全容を可視化し、癌幹細胞ニッチとの不均一な位置・空間関係を意義付けする事を目的とする。癌幹細胞の根絶はがん組織多様性の克服に不可欠であり、我々は腎がん高精度医療を可能にする分子基盤や癌幹細胞を標的とする新規治療軸を構築したいと考えた。

### 3. 研究の方法

(1) 当教室は、先端の流体力学に基づく循環腫瘍細胞 (CTC) 濃縮回収装置「Clear Cell FX」を保有している。最新の同装置は、専用のマイクロ流路チップを利用し、ラベルフリーでハイスループットな CTC 濃縮回収が可能である。このプラットフォームでは、わずか患者血液 7.5 mL から抗体染色を使わずに腎がん CTC が判定可能である。逐次療法が行われている腎がん分子標的・免疫治療患者からリアルタイムで CTC を回収することで、分子標的・免疫治療下の「多様な CTC に潜む癌幹細胞」の全容解明を図りたいと考える。本研究は、当院で前向き観察研究として承認された「腎細胞癌患者を対象とした血中バイオマーカーの検討」に順じて、腎がん CTC 濃縮を試みた。(2) 革新的なシングルセル RNA シークエンスは、多種多様な細胞群に潜む特定の 1 細胞 (癌幹細胞) を可視化する、理想的な研究アプローチである。円滑なシングルセル RNA シークエンスには cell viability を維持した単細胞化プロトコールに求められる。CTC に加えて、固形癌からのシングルセル RNA シークエンスの実装に備えて、バルク組織を利用した 1 細胞単離プロトコールの作成と改良に従事した。(3) 我々は、新規がんイメージングのトランスレーショナル研究では先駆的立場を自負する。特に革新的なライトシート顕微鏡・膨張顕微鏡法では、治療耐性を促す癌幹細胞が生息するニッチ構造を生体内で立体的に可視化できる。シングルセル RNA シークエンスで腎癌幹細胞トランスクリプトームが明らかとなれば、臨床組織での実装に移し、織透明化法に独自の免疫染色・in situ hybridization 法を組み合わせることで、癌幹細胞ニッチ構造が見て解ることができる。(4) 我々は、「ベンチからベットサイド」の観点から、新規がんイメージングの臨床応用を想定し、ハイスループットなシングルセルパソロジーを臨床組織で実装に移し、独自の腎細胞癌組織マイクロアレイを利用した腫瘍免疫微小環境の解析を、原則オートメーションシングルセルカウントで進めた。自動化されたシングルセルカウントでは、人為的なバイアスが入りづらく、新しい視点でのバイオマーカー開発に繋がると考える。

### 4. 研究成果

(1) 腎がんにおける癌幹細胞とは一体何なのか? どうすれば得られるか? 特に固形癌の癌幹細胞研究では、この単純な疑問が研究遂行の最大の障壁となる。我々は、先端の CTC 濃縮システムを駆使し、逐次療法が行われている腎がん分子標的・免疫治療患者からリアルタイムで CTC 由来癌幹細胞の同定を試みた。合計 18 名の転移性腎がん患者から血液採取を行い、独自のプロトコールで腎がん CTC 濃縮を進めた (内 6 名は免疫チェックポイント阻害薬治療中の患者)。

(2) 次にシングルセル RNA シークエンスの実装に備えて、1 細胞単離プロトコールの作成と改良に従事した。1 細胞毎にトランスクリプトーム解析には、急速に技術が発展しているシングルセル RNA シークエンスの利用が最適である。元々細胞が単離されている CTC は、シングルセル RNA シークエンスへの応用は比較的容易であるが、固形癌 (バルク組織) からのロバストな 1 細胞単離プロトコールは、円滑なシングルセル RNA シークエンスに欠かせない。我々は、独自の細胞単一化プロトコールでマウス腫瘍の 1 細胞トランスクリプトーム解析を進めた。マウス腫瘍由来の「細胞単離 シングルセル RNA シークエンス」プロトコールは、ヒト腫瘍でも応用可能と考える。実際にマウス腫瘍を用いて、最新の ICELL8 cx Single-Cell System を利用し、8000 を超える細胞の高品質なシングルセルシークエンスを実装した。今後もシングルセルシークエンスを利用し、多様性解析を進める予定である。

(3) ライトシート顕微鏡を用いる研究は、3D イメージングパイプライン: DIIFCO (diagnosing in situ and immuno-fluorescence-labelled cleared onco-samples) 法の考案・整備に従事した。組織透明化法に独自の免疫染色・in situ hybridization 法を組み合わせることで、組織深

部まで高解像度なシングルセルカウント・タンパク/RNA の同時発現解析が可能となった。この世界初の試みは、シングルセル RNA シークエンス結果を立体的な腫瘍空間で再現し、「立体的な癌幹細胞ニッチ」の解明に欠かすことが出来ない画像解析ツールと考える。最終的にライトシート顕微鏡を用いた 3 次元画像解析は、独自のイメージングプラットフォームでヒト腎細胞癌組織を解析し、微小な腫瘍血管の立体構造が特定の遺伝子変異と関係していることが分かった。一方、ナノレゾリジョンな膨張顕微鏡法も、組織膨張下での in situ hybridization 実装のプロトコル確立・整備に従事した。膨張顕微鏡法は DIIFCO 法を組み合わせることで、ナノレゾリジョンでタンパク/RNA 局在が見て解る。DIIFCO 法で採用される in situ hybridization は、hybridization chain reaction 法を採用しており、この最新の hybridization chain reaction 法は、プローブが 20-50b 長である。プローブ作成が安価で容易であるため、ハイスループットなナノレゾリジョンの RNA 発現・局在解析を進めることが可能となった。最終的に膨張顕微鏡法では、腎がん悪性化に關与する lncRNA の細胞内局在が明らかとなった。

(4) 本研究で得られるイメージング技術の知見は、最終的にシングルセル RNA シークエンスと融合するためのプロトコル開発に繋げ、癌幹細胞ニッチの同定に活用したいと考える。シングルセルパソロジーは、豊富な腎細胞癌組織マイクロアレイやデジタルパソロジーに加えて、最新の多重免疫染色法を実装し、以下の 4 点で具体的成果を得た。1) 腎がん CD8 陽性 T 細胞の不均一性解析 (Murakami T, et al. 2021): 腎がんは、他の固形癌と一線を画す、特殊な腫瘍免疫微小環境の存在が示唆されている。我々は、CD8 陽性 T 細胞を均一な細胞集団として扱うのではなく、不均一性を考慮しサブポピュレーションごとに分類して扱う必要があると考えた。本成果では、腎がん腫瘍免疫微小環境の理解において、CD8 陽性 T 細胞不均一性に考慮した解析の重要性が、シングルセルパソロジーで明らかとなった。2) 腎がんシングルセルパソロジーによる AXL/GAS6 発現解析 (Hakozaki K, et al. 2021): 我々は、腎細胞癌における AXL/GAS6 発現と予後・癌免疫微小環境との関連を、シングルセルパソロジーによって解析した。本成果では、シングルセルパソロジーによって示された腎がん AXL/GAS6 score は有用な予後マーカーであると同時に、癌免疫微小環境とも相関することが示された。3) 免疫チェックポイント分子 LAG-3, TIM-3, TIGIT による腎がんリスク分類の構築 (Takamatsu K, et al. 2021): LAG-3, TIM-3, TIGIT は、次世代チェックポイント阻害剤の標的分子として注目を集める。我々は、腎がんにおけるこれら 3 分子の発現を空間的に評価し、臨床病理的な診断基盤を最新のシングルセルパソロジーによって作成した。4) 淡明型腎細胞癌における三次リンパ様構造の特異性解析 (Masuda T, et al. 2022): 近年、様々な癌種で三次リンパ様構造と免疫チェックポイント阻害薬の治療効果が関連付けられており、腫瘍免疫における B 細胞の注目度は高い。我々は、淡明型腎細胞癌の三次リンパ様構造を、同じ泌尿器癌の膀胱癌と比較検討し、予後への影響・成熟度・空間分布・腫瘍免疫環境の相違を包括的に評価した。

## 5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計7件（うち査読付論文 7件/うち国際共著 2件/うちオープンアクセス 2件）

1. 著者名 Tanaka Nobuyuki, Kanatani Shigeaki, Kaczynska Dagmara, ...、Uhlen Per	4. 巻 4
2. 論文標題 Three-dimensional single-cell imaging for the analysis of RNA and protein expression in intact tumour biopsies	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Nature Biomedical Engineering	6. 最初と最後の頁 875 ~ 888
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1038/s41551-020-0576-z	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 該当する
1. 著者名 Niwa Naoya, Tanaka Nobuyuki, Hongo Hiroshi, Miyazaki Yasumasa, Takamatsu Kimiharu, Mizuno Ryuichi, Kikuchi Eiji, Mikami Shuji, Kosaka Takeo, Oya Mototsugu	4. 巻 99
2. 論文標題 TNFAIP2 expression induces epithelial-to-mesenchymal transition and confers platinum resistance in urothelial cancer cells	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Laboratory Investigation	6. 最初と最後の頁 1702 ~ 1713
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1038/s41374-019-0285-y.	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -
1. 著者名 Grahn Alexandra, Tanaka Nobuyuki, Uhlen Per, Brehmer Marianne	4. 巻 37
2. 論文標題 Volumetric imaging: a potential tool to stage upper tract urothelial carcinoma	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 World Journal of Urology	6. 最初と最後の頁 2297 ~ 2302
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1007/s00345-019-02682-1.	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 該当する
1. 著者名 Murakami Tetsushi, Tanaka Nobuyuki, Takamatsu Kimiharu, Hakozaki Kyohei, Fukumoto Keishiro, Masuda Tsukasa, Mikami Shuji, Shinojima Toshiaki, Kakimi Kazuhiro, Tsunoda Tatsuhiko, Sawada Kazuaki, Imamura Takeshi, Mizuno Ryuichi, Oya Mototsugu	4. 巻 70
2. 論文標題 Multiplexed single-cell pathology reveals the association of CD8 T-cell heterogeneity with prognostic outcomes in renal cell carcinoma	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Cancer Immunology, Immunotherapy	6. 最初と最後の頁 3001 ~ 3013
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1007/s00262-021-03006-2	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Hakozaki Kyohei, Tanaka Nobuyuki, Takamatsu Kimiharu, Takahashi Ryohei, Yasumizu Yota, Mikami Shuji, Shinojima Toshiaki, Kakimi Kazuhiro, Kamatani Takashi, Miya Fuyuki, Tsunoda Tatsuhiko, Aimonon Eriko, Nishihara Hiroshi, Mizuno Ryuichi, Oya Mototsugu	4. 巻 125
2. 論文標題 Landscape of prognostic signatures and immunogenomics of the AXL/GAS6 axis in renal cell carcinoma	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 British Journal of Cancer	6. 最初と最後の頁 1533 ~ 1543
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1038/s41416-021-01559-8	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Masuda Tsukasa, Tanaka Nobuyuki, Takamatsu Kimiharu, Hakozaki Kyohei, Takahashi Ryohei, Anno Tadatsugu, Kufukihara Ryohei, Shoji Kazunori, Mikami Shuji, Shinojima Toshiaki, Kakimi Kazuhiro, Tsunoda Tatsuhiko, Aimonon Eriko, Nishihara Hiroshi, Mizuno Ryuichi, Oya Mototsugu	4. 巻 10
2. 論文標題 Unique characteristics of tertiary lymphoid structures in kidney clear cell carcinoma: prognostic outcome and comparison with bladder cancer	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Journal for ImmunoTherapy of Cancer	6. 最初と最後の頁 e003883 ~ e003883
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1136/jitc-2021-003883	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 -

1. 著者名 Takamatsu Kimiharu, Tanaka Nobuyuki, Hakozaki Kyohei, ..., Mikami Shuji, Shinojima Toshiaki, Sasaki Takashi, Sato Yusuke, Kume Haruki, Ogawa Seishi, Kakimi Kazuhiro, Kamatani Takashi, Miya Fuyuki, Tsunoda Tatsuhiko, Aimonon Eriko, Nishihara Hiroshi, Sawada Kazuaki, Imamura Takeshi, Mizuno Ryuichi, Oya Mototsugu	4. 巻 12
2. 論文標題 Profiling the inhibitory receptors LAG-3, TIM-3, and TIGIT in renal cell carcinoma reveals malignancy	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Nature Communications	6. 最初と最後の頁 5547
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1038/s41467-021-25865-0	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 1件 / うち国際学会 0件)

1. 発表者名 田中 伸之、丹羽直也、本郷周、安水洋太、武田利和、松本一宏、森田伸也、小坂威雄、水野隆一、浅沼宏、Per Uhlen、大家基嗣
2. 発表標題 Single-cell RNA-seq analysis of intra-tumor heterogeneity dynamics reveals the novel platinum resistance gene COX7B in patients with urinary bladder cancer
3. 学会等名 第108回日本泌尿器科学会総会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 田中 伸之、三上 修治、小坂 威雄、水野 隆一、大家 基嗣
2. 発表標題 3次元ライトシート顕微鏡による腫瘍内不均一性の可視化：スライドフリーな1細胞レベルのタンパク/RNA発現解析
3. 学会等名 第78回日本癌学会学術総会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 田中 伸之、三上 修治、榊田 司、武田 利和、松本 一宏、森田 伸也、小坂 威雄、浅沼 宏、水野 隆一、大家 基嗣
2. 発表標題 3次元ライトシート顕微鏡を用いた次世代泌尿器癌イメージング：腫瘍内不均一性の可視化
3. 学会等名 第57回 日本癌治療学会学術集会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 田中 伸之
2. 発表標題 シングルセルから超高解像度ナノレベルまで：次世代イメージングで見て解る癌 微小環境の全容
3. 学会等名 第109回日本泌尿器科学会総会（招待講演）
4. 発表年 2021年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

慶應義塾大学医学部 泌尿器科学教室ホームページ  
<http://www.keio-urology.jp/>

## 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	大家 基嗣  (Mototsugu Oya)  (00213885)	慶應義塾大学・医学部(信濃町)・教授    (32612)	
研究分担者	三上 修治  (Shuji Mikami)  (20338180)	慶應義塾大学・医学部(信濃町)・講師    (32612)	
研究分担者	小坂 威雄  (Takeo Kosaka)  (30445407)	慶應義塾大学・医学部(信濃町)・講師    (32612)	
研究分担者	水野 隆一  (Ryuichi Mizuno)  (60383824)	慶應義塾大学・医学部(信濃町)・准教授    (32612)	
研究分担者	松本 一宏  (Kazuhiro Matsumoto)  (80366153)	慶應義塾大学・医学部(信濃町)・講師    (32612)	

## 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		
スウェーデン	Karolinska Institutet		