

令和 3 年 5 月 31 日現在

機関番号：17102

研究種目：挑戦的研究（萌芽）

研究期間：2019～2020

課題番号：19K22664

研究課題名（和文）Drop-seqによる不均一性を伴う患者由来消化器癌微小環境の単一細胞解析

研究課題名（英文）Analysis of single-cell transcriptome with Drop-seq for heterogeneity in the tumor microenvironment derived from digestive cancers.

研究代表者

大内田 研宙（OHUCHIDA, Kenoki）

九州大学・大学病院・講師

研究者番号：20452708

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 5,000,000円

研究成果の概要（和文）：本研究は、消化器癌におけるheterogeneityをDrop-seq技術を用いたシングルセル解析により解明するために開始された。胃癌・食道癌を対象に、正常部・腫瘍部・所属リンパ節のシングルセルRNAライブラリを約20例ずつ作成し解析したところ、“疲弊した”Tリンパ球は腫瘍部で多く検出され、癌化に伴うTリンパ球の機能低下を認めた。形質細胞は腫瘍部に多く、抗体産生能が亢進していることが示唆された。さらに胃癌と食道癌では、胃癌で活性化Bリンパ球への分化がより促進していることが考えられた。以上のように消化器癌における免疫環境のheterogeneityを詳細に解析することができた。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究は革新的な技術であるDrop-seqを基盤としたシングルセル解析を用いることで、これまで詳細が不明であった消化器癌の腫瘍微小環境内の不均一性を解明することを目的とした。従来のBulkでのRNA-seqでの解析では評価できなかった各細胞の不均一性をシングルセル解析では詳細に解析することが可能であった。特に免疫細胞に関する単一細胞レベルの機能的評価が可能となり、発癌過程の解明や、免疫チェックポイントを中心とした新たな治療法の確立につながると考えられる。

研究成果の概要（英文）：This study was started to elucidate heterogeneity in digestive cancers by single-cell transcriptome with Drop-seq. About gastric and esophageal cancers, we created 20 cases of scRNA-sequencing data for normal mucosae, tumor sites and lymph nodes for each. In the analysis of data with esophageal cancer, “exhausted” T cells were detected more in the tumor sites than in the normal mucosae, and we considered that the T cells function decreased with carcinogenesis. Plasma cells were found more in the tumor lesions, suggesting that many antibodies were produced in the tumor microenvironment. Furthermore, comparing gastric cancers with esophageal cancers, we think that the activation of B cells was promoted more in the gastric cancers. In short, with scRNA-seq, we could analyze the heterogeneity of the digestive tumor microenvironment in detail.

研究分野：医歯薬学

キーワード：消化器癌 胃癌 食道癌 シングルセル解析 腫瘍微小環境 heterogeneity

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

消化器癌は腫瘍微小環境内に heterogeneity といわれる高度な不均一性をもっており、癌の浸潤や転移に大きく関与することが知られている。さらに癌細胞だけではなく微小環境を形成する免疫細胞などの間質細胞にも機能的な heterogeneity が存在することが知られている。しかし従来の Bulk での RNA-seq などではそれらの不均一な細胞集団の機能分類を網羅的に行うことはできなかった。一方、血液腫瘍分野では Drop-seq 技術を用いたシングルセルでの網羅的遺伝子発現解析が注目されており、単一細胞レベルでの網羅的遺伝子プロファイリングの結果から様々な機能別の細胞集団を分類し、さらにこれまでは見出すことができなかった細胞集団を同定することが可能となった。消化器癌においてこの Drop-seq 技術を用いたシングルセル解析による腫瘍微小環境中の細胞集団の同定、分類の報告はこれまでになく、消化器癌の発癌や転移の機序を解明する上では画期的な研究方法と考えられた。

2. 研究の目的

Drop-seq 技術を用いたシングルセル解析を用いて消化器癌の機能的な heterogeneity を明らかにし、治療抵抗性や浸潤・転移・再発に強く関与する悪性度の高い癌細胞集団やそれに関与する癌微小環境中の間質細胞集団の存在やその特性について解析する。

3. 研究の方法

患者由来消化器癌組織の Drop-seq 技術を用いたシングルセル発現解析

患者由来手術切除標本を単一細胞まで分離する。その後 10x genomics 社の Chromium シングルセルコントローラーを使用し単一細胞毎の mRNA を網羅的に抽出する。

シングルセル発現解析による新たな細胞集団の機能的分類の構築

得られた遺伝子発現データから、細胞集団をクラスタリングする。

シングルセル網羅的発現解析により同定された細胞集団の機能的解析

4. 研究成果

患者由来消化器癌組織の Drop-seq 技術を用いたシングルセル発現解析

胃癌・食道癌の切除検体を用いたライブラリー作成を行った。上皮系組織の細胞接着は強固であり当初は生細胞の状態で単一細胞化することに難渋したが、現在では手技を確立することができ、胃癌・食道癌の正常粘膜部・腫瘍部・リンパ節由来のシークエンスデータをそれぞれ 20 例程度作成することができた。

シングルセル発現解析による新たな細胞集団の機能的分類の構築

得られた各症例の網羅的遺伝子発現データについて、各細胞集団の代表的な発現遺伝子に注目することで初期クラスタリングを行った(図1)。

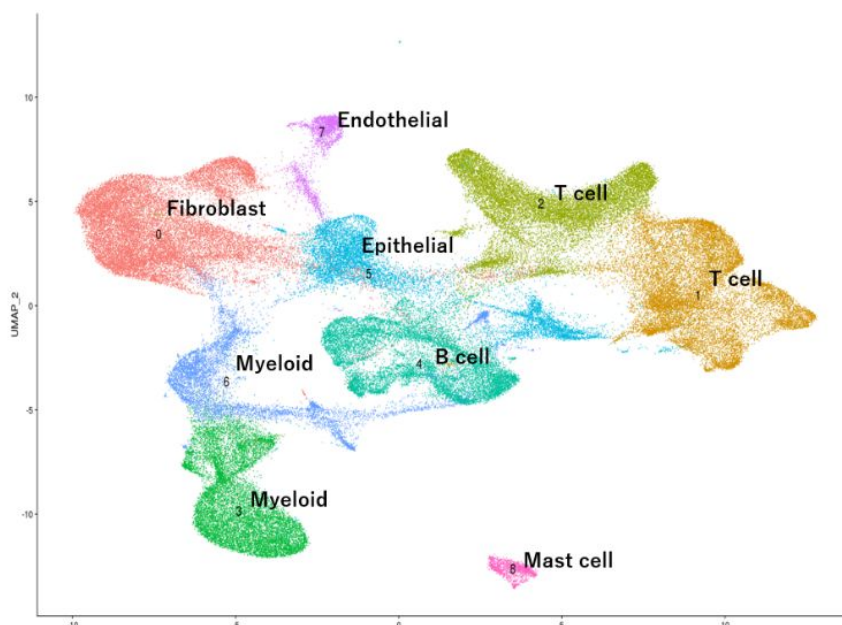


図1 代表遺伝子を参考に初期クラスタリング

これらのクラスターのうち、特にTリンパ球、Bリンパ球に着目した。近年、免疫チェックポイント阻害薬の出現に伴い“疲弊した”T細胞という機能的な新たなサブセットが提唱されているが、これらは食道扁平上皮癌において、正常部と比較し腫瘍部で多く検出され、Tリンパ球の細胞障害機能が低下していると考えられた。また、Bリンパ球に関して、分化過程の様々なサブセットを同定することができた。さらに腫瘍部で形質細胞が多く検出され抗体産生能が亢進していることが示唆された。さらに胃癌と食道癌で比較すると胃癌で活性化Bリンパ球への分化が促進していると考えられた。

シングルセル網羅的発現解析により同定された細胞集団の機能的解析

“疲弊した”Tリンパ球に対し、さらに詳細な評価を行うと、疲弊マーカーとして注目されているPD-1以外にも、TIM3やLAG3などの抑制性マーカーも共発現していることが判明した。

(まとめ)

革新的な技術であるDrop-seq技術を用いたシングルセル解析により消化器癌の腫瘍微小環境内の不均一性、特にTリンパ球、Bリンパ球を中心とした免疫細胞の機能的な不均一性を詳細に解明することができた。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計2件（うち査読付論文 2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 Iwamoto Chika, Ohuchida Kenoki, Shinkawa Tomohiko, Okuda Sho, Otsubo Yoshiki, Okumura Takashi, Sagara Akiko, Koikawa Kazuhiro, Ando Yohei, Shindo Koji, Ikenaga Naoki, Nakata Kohei, Moriyama Taiki, Miyasaka Yoshihiro, Ohtsuka Takao, Eto Masatoshi, Akashi Koichi, Nakamura Masafumi	4. 巻 512
2. 論文標題 Bone marrow-derived macrophages converted into cancer-associated fibroblast-like cells promote pancreatic cancer progression	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Cancer Letters	6. 最初と最後の頁 15~27
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.canlet.2021.04.013	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 Feng Haimin, Moriyama Taiki, Ohuchida Kenoki, Sheng Nan, Iwamoto Chika, Shindo Koji, Shirahane Kengo, Ikenaga Naoki, Nagai Shuntaro, Nakata Kohei, Mizumoto Kazuhiro, Nakamura Masafumi	4. 巻 40
2. 論文標題 N-acetyl cysteine induces quiescent-like pancreatic stellate cells from an active state and attenuates cancer-stroma interactions	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Journal of Experimental & Clinical Cancer Research	6. 最初と最後の頁 133
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1186/s13046-021-01939-1	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 0件/うち国際学会 0件）

1. 発表者名 奥田翔、大内田研宙、伊達聡美、久野恭子、持田侑己、大坪慶志輝、新川智彦、松本奏吉、相良亜希子、進藤幸治、森山大樹、仲田興平、永井俊太郎、大塚隆生、水元一博、中村雅史
2. 発表標題 Single-cell RNA-sequenceを用いた術前化学療法後食道扁平上皮癌の解析
3. 学会等名 第120回日本外科学会定期学術集会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 大坪慶志輝、大内田研宙、奥田翔、久野恭子、持田郁己、伊達聡美、新川智彦、松本奏吉、相良亜希子、岩本千佳、進藤幸治、森山大樹、大塚隆生、水元一博、中村雅史
2. 発表標題 Single cell解析による胃癌微小環境内免疫細胞のheterogeneityの解明
3. 学会等名 第120回日本外科学会定期学術集会
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	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	森山 大樹 (MORIYAMA Taiki) (70586859)	九州大学・大学病院・准教授 (17102)	
研究分担者	永吉 絹子 (NAGAYOSHI Kinuko) (90761015)	九州大学・大学病院・助教 (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
---------	---------