

令和 3 年 5 月 25 日現在

機関番号：17102

研究種目：研究活動スタート支援

研究期間：2019～2020

課題番号：19K24016

研究課題名（和文）Drop-seqによる不均一性を伴う患者由来大腸癌組織微小環境の単一細胞解析

研究課題名（英文）Drop-sequence of colon cancer to reveal heterogeneity of tumor microenvironment

研究代表者

水内 祐介（MIZUUCHI, Yusuke）

九州大学・大学病院・助教

研究者番号：20849088

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 2,200,000円

研究成果の概要（和文）：複数の種類の固形がんの手術標本を対象にシングルセルRNAライブラリー作成を行い、NGSで解析した。NGS解析後のデータは、Rパッケージ Seuratを用いて単一細胞由来のRNA発現からその細胞集団の特徴や機能に着目し解析を行っている。大腸に関しては、手術を行った家族性大腸腺腫症由来大腸癌の患者の摘出標本から、腫瘍部、腺腫非密生部、腺腫密生部、正常粘膜部、リンパ節を採取し単一細胞懸濁液作成、ライブラリー作成を行った。現在、検体採取部位別に比較しながら、上皮細胞、腫瘍微小環境を構成する細胞について解析をすすめている。また、通常型大腸癌のpublic dataとの比較を行っている。

研究成果の学術的意義や社会的意義

近年、大腸癌に対する効果的な薬物療法が創出され生存率は改善しつつあるが、2017年の大腸癌死亡者数は第2位と依然予後不良な疾患である。その原因として、癌細胞だけでなく微小環境を形成する間質細胞にも観察される高度な不均一性、すなわちheterogeneityが挙げられる。本研究では、通常型大腸癌や家族性大腸腺腫症由来大腸癌のシングルセル解析を行うことで、大腸癌の機能的なheterogeneityを明らかにし、発癌や癌の進展に関わるこれまで同定されていない機能を有する細胞集団を特定し、新規個別化治療の確立を目指すもので、大腸癌患者の予後改善という社会的要請に応じ、革新的な貢献をもたらすと考える。

研究成果の概要（英文）：We conducted single cell RNA sequence of solid tumors including colon cancers. We generated RNA libraries from normal mucosa, adenomas, and cancer tissues, lymph node of a patient with familial adenomatous polyposis (FAP). We compare mRNA expressions of epithelial cells and cells composing tumor microenvironment among each tissues. We also compare mRNA expressions between colorectal cancer with FAP and spontaneous colorectal cancers.

研究分野：医歯薬学

キーワード：大腸癌 シングルセル解析 微小環境 heterogeneity

1. 研究開始当初の背景

癌微小環境中に存在する細胞集団の対象は癌細胞だけでなく間質細胞も含まれており、機能的 heterogeneity は癌細胞だけでなく、間質細胞に存在する。ただ、この機能的 heterogeneity は形態的な特徴として分類することができず、マーカーとなる表面タンパクなどで分類することも一部にとどまるもので、真にその機能的な分類を網羅的に行うことは不可能であった。一方、血液腫瘍の分野では徐々に 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つつある。Drop-seq 技術とは微小管路を用いて、細胞を 1 細胞ずつ droplet に分離し、それぞれ細胞ごとに異なったオリゴバーコードで標識された mRNA を抽出するシステムである。これらの細胞はそれぞれ特異的なオリゴバーコードで標識されているため数百から 1 万の細胞から抽出した RNA をまとめて NGS 解析することが可能で、このシングルセルごと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、さらにはこれまで見出すことができなかった重要な細胞集団を同定することが可能となった。大腸癌においてこの Drop-seq 技術によるシングルセル発現解析による癌微小環境中の細胞集団の同定、分類の報告は、2017 年から研究開始当初まで 3 例の報告のみであり (Li H, et al. Nature Genetics. 2017) (Sophie F.R. et al. Nature. 2018) (Chen K.Y, et al. Conf Proc IEEE Eng Med Soc. 2018)、十分に解明されたとはいえない。また、シングルセルごとの網羅的遺伝子解析結果による癌細胞、間質細胞それぞれの機能的な再分類は、形態や単なるマーカーによる分類とは大きく異なり、これまでにないがん治療の個別化手法につながりうるものであると考えられる。

2. 研究の目的

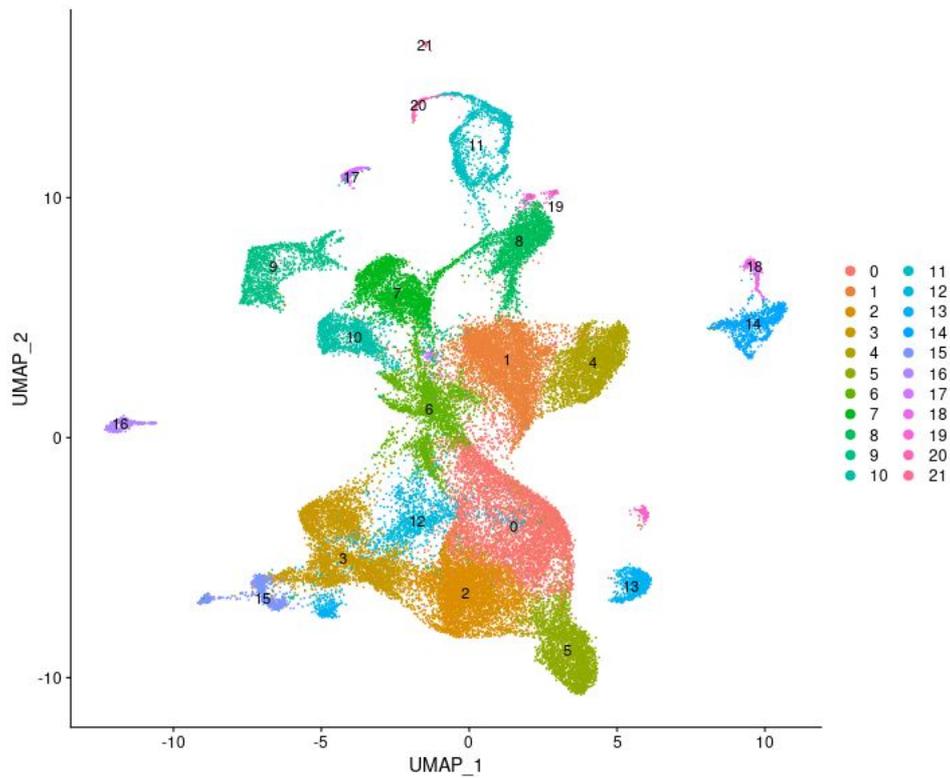
本研究の目的は、Drop-seq 技術を基盤としたシングルセル解析を用いて大腸癌の機能的な heterogeneity を明らかにし、治療抵抗性や浸潤・転移・再発に強く関わる悪性度の高い癌細胞集団やそれに関わる癌微小環境中の間質細胞集団の存在やその特性について解析することである。現在、血液腫瘍の分野では徐々に Drop-seq 技術を用いたシングルセルでの網羅的遺伝子発現解析が注目されつつある。Drop-seq 技術とは微小管路を用いて、細胞を 1 細胞ずつ droplet に分離し、それぞれ細胞ごとに異なったオリゴバーコードで標識された mRNA を抽出するシステムである。これらの細胞はそれぞれ特異的なオリゴバーコードで標識されているため数百から 1 万の細胞から抽出した RNA をまとめて NGS 解析することが可能で、このシングルセルごと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、さらにはこれまで見出すことができなかった重要な細胞集団を同定することが可能となった。シングルセルごとの網羅的遺伝子解析結果による癌細胞、間質細胞それぞれの機能的な再分類は、形態や単なるマーカーによる分類とは大きく異なり、これまでにない癌治療の個別化手法につながりうる、創造性の高い研究計画といえる。大腸癌における Drop-seq 技術によるシングルセル発現解析による癌微小環境中の細胞集団の同定、分類の報告も近年散見されるようになった (Li H, et al. Nature Genetics 2017, Sophie F.R. et al. Nature 2018, Chen K.Y, et al. Conf Proc IEEE Eng Med Soc. 2018)。しかし治療の個別化など、臨床への応用にはまだ至っていない。本研究は、大腸癌の治療抵抗性を腫瘍微小環境の不均一性という側面から検討する研究であり、大腸癌治療開発の新しい切り口になると考えられる。本研究により大腸癌の治療抵抗性に関わる重要な細胞集団やそれに関わる癌微小環境中の間質細胞集団やその特性が同定され、新規治療法の開発につながれば、将来的には大腸癌患者の予後改善が期待できる。

3. 研究の方法

まず、手術直後の新鮮組織から単一細胞懸濁液を作成する。10XGENOMICS 社の Chromium シングルセルコントローラーにより効率的に単一細胞を droplet に封入しその内部で RNA を抽出、細胞 (droplet) ごとに特異的な配列をもつオリゴバーコードで標識する。さらにこの標識された RNA は細胞ごとにコードされ、約 10000 細胞由来の RNA ライブラリを NGS で解析する。NGS 解析後のデータをもとに、R パッケージ Seurat を用いて上皮細胞や腫瘍微小環境を構成する免疫細胞、非免疫細胞の細胞集団をクラスタリングする。まず、初期クラスタリングとして、遺伝子発現データからこれらの細胞集団のクラスタリングをおこなう。これらの既存の細胞集団の分類はその代表的な遺伝子の発現パターンがすでにわかっているため容易である。この初期クラスタリングの後に分類された癌細胞集団の中で deep なクラスタリングをすすめていく。これにより癌細胞集団の中でも EMT の特性が高い細胞集団や増殖能力が高い細胞集団、治療抵抗性の遺伝子プロファイリングを示す細胞集団などこれまでの独自の発現解析データをもとに機能別にクラスタリングしていく。さらには様々な pathway やシグナル、あるいは特徴的な遺伝子発現プロファイルを新たに同定し、それによるクラスタリングを行いこれまでに分類されることがない機能別の細胞集団を同定し、機能的な heterogeneity を明らかにする。同定された細胞集団の網羅的遺伝子発現プロファイルからその細胞集団のマーカーとなる分子や制御するための標的となりうる分子をリストアップする。

4. 研究成果

胃癌や食道癌、大腸癌を含む複数の種類の固形がんの手術標本を対象にシングルセル RNA ライブラリー作成を行い、NGS で解析した。NGS 解析後のデータは、R パッケージ Seurat を用いて単一細胞由来の RNA 発現からその細胞集団の特徴や機能に着目し解析を行っている。胃癌、食道癌などと合わせて、固形がん 30 症例を超えるライブラリー作成を行ってきた。大腸に関しては、手術を行った家族性大腸腺腫症由来大腸癌の患者の摘出標本から、腫瘍部、腺腫非密生部、腺腫密生部、正常粘膜部、リンパ節を採取し単一細胞懸濁液作成、ライブラリー作成を行った。現在、検体採取部位別に比較しながら、上皮細胞、腫瘍微小環境を構成する免疫細胞、非免疫細胞について解析をすすめている。また、通常型大腸癌の public data との比較を行っている。



FAP 患者の正常部、腺腫非密生部、腺腫密生部、癌部、リンパ節から得た単一細胞のクラスタリング図

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計1件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 久野恭子、水内祐介、大内田研宙、中村祥一、奥田翔、大坪慶志輝、進藤幸治、仲田興平、森山大樹、永井俊太郎、中村雅史
2. 発表標題 scRNA-seqを用いたFAPにおける発癌過程の観察
3. 学会等名 第57回九州外科学会
4. 発表年 2021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
---------------------------	-----------------------	----

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