

令和 5 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：2020～2022

課題番号：20H03817

研究課題名（和文）難治性前立腺癌のシングルセル解析によるゲノムエピゲノム進化と腫瘍内不均一性の解明

研究課題名（英文）Integrated analysis of ITH in drug resistant prostate cancer by single cell analysis

研究代表者

小坂 威雄（Kosaka, Takeo）

慶應義塾大学・医学部（信濃町）・講師

研究者番号：30445407

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 13,800,000円

研究成果の概要（和文）：新規アンドロゲン受容体シグナル阻害剤や、新規抗がん剤カバジタキセルが近年、去勢抵抗性前立腺癌（Castration Resistant Prostate Cancer: CRPC）に承認されたが、生命予後の改善効果は限定的である。好発転移部位である骨転移は造骨性でアプローチが困難なため再発時の生検検体の採取が困難であることが多い。

本研究では血液循環がん細胞のシングルセル解析と血液循環DNAのNGS解析、CRPC生検検体切片における空間的遺伝子発現解析システムにより解析し、同一患者内のRNA発現のITHの存在を可視化し、新規バイオマーカー候補ならびに新規治療標的候補を同定した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

前立腺癌はITHの存在をその特徴とする。ADTや化学療法による後天的な選択圧、耐性獲得の変異、DNA修復酵素の変異による染色体の不安定性を伴うゲノム進化に加え、がん幹細胞性形質の獲得や相互依存性シグナル経路の活性化、脱分化型の形質獲得などの、エピゲノム進化による可塑性も加わって、空間的・時間的多様性が増し、難治性の要因となると考えられる。解析対象をシングルセル化することで、再発時の時間的、空間的不均一性が見出され、新規バイオマーカー候補ならびに新規治療標的候補を同定した。アンメットニーズを埋める成果として波及効果は甚大である。

研究成果の概要（英文）：A new androgen receptor signaling inhibitor and a new anticancer agent cabazitaxel have recently been approved for castration-resistant prostate cancer (CRPC), but the improvement effect on life prognosis is limited. Bone metastasis, which is a common site of metastasis, is osteoblastic and difficult to approach, so it is often difficult to obtain a biopsy specimen at the time of recurrence.

In this study, single cell analysis of blood circulating cancer cells, NGS analysis of blood circulating DNA, and spatial gene expression analysis system in CRPC biopsy specimen sections were analyzed to visualize the presence of ITH in RNA expression within the same patient. New potential biomarkers as well as potential new therapeutic targets were identified.

研究分野：前立腺癌

キーワード：シングルセル解析 リキッドバイオプシー 前立腺癌 次世代シーケンサー

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

欧米諸国のように前立腺癌の罹患率が高齢化や検診の普及により増加傾向である。早期の前立腺癌に対しては、手術・放射線による根治が可能となってきたが、初発時に転移を有する症例や、手術・放射線療法後の再発に対してはアンドロゲン除去療法 (androgen deprivation therapy: ADT) が選択される。しかし、いずれ ADT に耐性化を獲得し、去勢抵抗性前立腺癌 (Castration Resistant Prostate Cancer: CRPC) に進展する。新規アンドロゲン受容体シグナル阻害剤としてエンザルタミド、アピラテロンが、新規抗がん剤としてカバジタキセルが本邦で承認されたが、生命予後の改善効果は限定的であり、CRPC は予後不良である。薬剤の耐性化が日常臨床で問題になっている。

ゲノム、エピゲノム解析技術の進歩により、固形癌における腫瘍内不均一性 (intratumor heterogeneity: ITH) が次第に明らかになり、原発巣と転移巣の空間的不均一性、初発時と再発時のなどの時間的不均一性が見出され、ITH を生み出すがんのゲノム進化プログラムの解析として Branched evolution と Neutral evolution の癌種による相違、患者間や患者内での多様性が報告されている。前立腺癌は ITH の存在をその特徴とする。ADT や化学療法による後天的な選択圧、耐性獲得の変異、DNA 修復酵素の変異による染色体の不安定性を伴うゲノム進化に加え、がん幹細胞性形質の獲得や相互依存性シグナル経路の活性化、脱分化型の形質獲得などの、エピゲノム進化による可塑性も加わって、空間的・時間的多様性が増し、難治性の要因となると考えられる。CRPC における薬剤選択のためのバイオマーカーがないこと、CRPC はどのように進化して ITH を獲得し、薬剤耐性が生じるのか？ 新規治療標的は何か？ を解明することは泌尿器科医にとって喫緊の課題である。

最近数年の急速な技術開発によって、1細胞ごとに細胞を分離してゲノム・エピゲノム解析 (シングルセル解析) が可能となり、実用レベルに達してきている。シングルセル解析は単一細胞に含まれる微量 mRNA から、定量的な RNA シークエンスを可能にした画期的な研究手法である。血液がんを中心に、1細胞ごとのトランスクリプトームが、がんの多様性を可視化し始めているが、CTC からのシングルセル解析はほとんどなされていないため、独自性が高い。前立腺癌の好発転移部位である骨転移は造骨性であることから、アプローチが困難なため再発や転移時の生検検体の採取が困難であることが多い。そこで、血液中の血液循環がん細胞 (CTC) や血液循環 DNA (circulating tumor DNA: ctDNA などのリキッドバイオプシー検体が ITH を内包する複数病変に由来したゲノム情報の全体像に近いと考えられ、近年注目されてきている。一般的に使用される CTC 回収システムは上皮性マーカー EpCAM を指標として回収しているが、上皮性がん細胞生物学的に転移の成立に重要な間葉系への形質転換を考慮すると上皮性マーカーにのみ頼る現在主流の CTC 回収システムは不十分である。実際、申請者は化学療法後の再発患者や、ヒト CRPC 細胞株において EpCAM が発現していないことを確認している。そこで流体力学を応用した次世代の新規 CTC 回収システムを応用し、マーカーで選別しない (ラベルフリー) による CTC の回収率向上、上皮性マーカーが発現していない CTC (間葉系) の回収に成功している。実際にラベルフリーにより患者の血液わずか 7.5ml から数百から数千の生きた状態の CTC 回収が可能となっており、既にプラットフォームは完成され、臨床応用を開始している。ラベルフリーのため、人工的な影響を最小限にした状態で CTC 回収以降の解析が可能となり、シングルセル解析に対し他のプラットフォームに比して有利で独自性がある。

2. 研究の目的

本研究では最先端の流体力学に基づく血中からの循環腫瘍細胞 (CTC) 濃縮システムを駆使して前立腺癌患者からリアルタイムに CTC を回収し、シングルセルレベルで多層性解析を実施する。得られた薬剤耐性トランスクリプトームは組織切片における空間的遺伝子発現解析による活性化遺伝子の 3次元地図情報として可視化し、治療耐性・がん幹細胞が存在する ITH やニッチ構造を明らかにする。

同時に血中の ctDNA を回収し、治療前後の腫瘍検体の免疫組織学的と FFPE 検体の DNA/RNA 解析を加え、がん微小環境における ITH を時空間的に統合的かつ俯瞰的に解析することで、難治性前立腺癌のゲノム・エピゲノム進化と難治性の主要因の一つである ITH を解明し、新規バイオマーカーならびに新規治療標的の同定を目的とする。

3. 研究の方法

(1) 最新の CTC 回収・濃縮システムで解明する化学療法前後・再発時の前立腺癌患者の CTC を用いたシングルセル解析

我々は流体力学を応用した次世代の新規 CTC 回収システムを教室で有し、既に臨床応用している。専用のマイクロ流路チップを利用して、流体力学に基づき CTC がサイズ依存性に他の血球成分と分離され、抗体を用いることなくラベルフリーで CTC が濃縮可能であり、上皮性マーカーの発現に依存する従来の CTC 回収法とはシステムが全く異なる。実際に数百から数千の生きた状態の CTC 回収が可能となっており、既にプラットフォームは完成され、臨床応用を開始している。薬剤耐性 CRPC や NEPC のように上皮性マーカーの発現が乏しいがんにおいても CTC 研究を加速化させる革新性を有している。本研究では患者の進行度に応じ時間軸に沿った、シングルセル

ル解析による腫瘍進化の最小単位の細胞を調べ解析を実施する。シングルセル化のための前処理のプラットフォームとしては数種類が報告されてきており、本研究に先駆けて予備検討を重ねてきた。シングルセル分割能が優れ、RNA が分解される前に短時間で処理可能で、同時に処理可能なサンプルが多いという特徴を有する 10× Genomics 社の Chromium single cell をライブラリ調整システムを使用したプラットフォームで CTC のシングルセル RNA シーケンス解析を施行する。このプラットフォームでは分子バーコード (400 万以上) を持つオリゴがコートされたゲルビーズと高分子ゲノムを、100 万個以上の液滴 (Gel Beads in Emulsion: GEM) に分割する技術である。1 つの GEM には、1 つのアレル由来の DNA 分子が 1 分子しか入らないことと、GEM ごとに分子バーコードが異なるため、NGS から出力されたショートリードを分子バーコードで分類することで、同じ分子から読まれた配列情報を見分けることができ、シングルセルの解析を感度・特異度が高く、ハイスループットでの NGS 解析を可能にした。本研究に先駆け、申請者はドセタキセル耐性株 (Prostate 2010, J Urol 2014) やカバジタキセル耐性株 (Cancer Sci 2018) を樹立してきた。これらの細胞株は新規バイオマーカー候補の発現や機能解析のためのプラットフォームを提供するものである。またこれらの薬剤耐性細胞株をシングルセル解析し、耐性獲得前後のシングルセル解析し、患者 CTC におけるシングルセル解析と比較検証し、最終的にどの細胞集団が耐性を獲得しているのかの ITH を明らかにする。

(2) 患者の治療前後の ctDNA の比較解析によるゲノム進化解析

患者の治療前後の時間軸に沿って患者 CTC を回収する際に、ctDNA 検体もあわせて収集し NGS 解析する。我々は、CTC に加えて circulation tumor DNA (ctDNA) の前向きな解析も倫理委員会の承認を得ている。患者によっては、初期診断時の手術検体や診断のために転移巣 (実質臓器として肝臓や肺転移) の生検が実施される患者も一定数存在する。CTC シングル解析した患者の生検や手術のパラフィン包埋検体から DNA/RNA を抽出し NGS 解析し、これらのマルチオミクスデータを統合することで新規バイオマーカー候補や新規治療標的の探索を俯瞰的に実施するとともに、ゲノム・エピゲノム進化を解明する。

(3) ITH の俯瞰的解析による薬剤耐性前立腺癌の多様性とトランスクリプトームの可視化

初期診断時の生検や手術検体、転移巣 (実質臓器として肝臓や肺転移) 生検が実施し得る患者では、最新の空間的遺伝子発現解析システム (Visium 空間的遺伝子発現ソリューション) を用いて ITH を解析する。本システムはスライドガラス上にポリ T のオリゴ配列を並べ、分子バーコードを付与した塩基を使って RNA 解析する画期的な技術である。CRPC 生検検体切片における全トランスクリプトームを空間的な位置情報を保ったままマッピングすることで、組織切片上で活性化している遺伝子の地図を入手することができる。

4. 研究成果

研究期間はコロナの影響もあり、入院や外来通院などが規制され、経時的な検体採取が困難な症例もあった。また、臨床検体の輸送に制限があったことで、研究の進捗が予定通り進まないこともあった。しかし以下のように成果を得ることができた。

(1) 最新の CTC を用いたシングルセル解析

感度・特異度を高めたハイスループットの次世代シーケンサーシステム (Chromium システム) を使用し、CTC のシングルセル解析を施行した。8 例の CRPC 患者のシングルセル RNA シーケンスを実施した。これらの検体では、患者ごとに CTC の 1 細胞ごとの RNA 発現の不均一性を見出し、AR の発現があるものの下流のシグナルの発現が上昇しているクラスターと低下しているクラスターを含め、それぞれの症例で 3 - 8 種類のクラスターに分類され、患者毎にも、CTC の中でも ITH が存在していた。それぞれのクラスターを特徴づけるバイオマーカー候補を数種類同定した。カバジタキセル耐性株においてもシングルセル解析を施行して、CTC と細胞株における発現の比較と、機能解析のプラットフォームとして意義についてさらに解析を進めている。

(2) 患者の治療前後の ctDNA の比較解析によるゲノム進化解析

患者の治療前後の時間軸に沿って ctDNA を回収した。合計 16 例の患者において ctDNA の質と量が十分な NGS 解析が可能であった。治療前の遺伝子変異プロファイルと耐性獲得後の遺伝子変異プロファイルを解析した。特定の細胞増殖関連遺伝子が増幅している症例群が有意に予後不良であった。耐性獲得後においても新規に遺伝子変異を獲得している症例を見出しており、現在 CTC のトランスクリプトームの発現プロファイルとの関連を解析している。

(3) ITH の俯瞰的解析による薬剤耐性前立腺癌の多様性とトランスクリプトームの可視化

空間的遺伝子発現解析システムにおいて、生検検体と手術検体の切片の解析を対象とする際には、検体の質と解析対象とする場所の選定が解析の精度を担保するために重要である。検体採取の方法や保存法によって、RNA の質にも相違があることが明らかになった。そこで、質が保たれ、解析可能な 8 症例における全トランスクリプトームを空間的な位置情報を保ったままマッピングすることで、組織切片上で活性化している遺伝子の地図を得ることができた。

病理学的に NEPC と診断されていても、アンドロゲン受容体が発現が残存し、その下流の PSA を含む AR 標的因子の発現の差も不均一であることが明らかになった。また AR 陰性で NEPC マーカー陰性の部分も不均一に存在しておりそれらの解析から、有望な分子マーカー候補を抽出できた。今後、引き続き機能解析を含めて研究を進めていく。

CTC のシングルセル解析も併せて解析できた症例においては、空間的遺伝子発現解析システムによる全トランスクリプトーム発現と、その CTC の由来との位置関係の解析も併せて継続して進めている。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計10件（うち査読付論文 10件／うち国際共著 1件／うちオープンアクセス 10件）

1. 著者名 Shojo Kazunori, Kosaka Takeo, Nakamura Kohei, Hongo Hiroshi, Kobayashi Hiroaki, Mikami Shuji, Nishihara Hiroshi, Oya Mototsugu	4. 巻 4
2. 論文標題 First case of ductal adenocarcinoma of the prostate with MAP3K1 homozygous deletion	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 IJU Case Reports	6. 最初と最後の頁 176 ~ 179
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1002/iju5.12274	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 Matsumoto Kazuhiro, Kosaka Takeo, Nakamura Kohei, Nishihara Hiroshi, Oya Mototsugu	4. 巻 10(3)
2. 論文標題 A first Japanese case of BRCA2 and RB1 co-loss organ-confined prostate cancer successfully treated by radical prostatectomy	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 International Cancer Conference Journal	6. 最初と最後の頁 170-173
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1007/s13691-021-00469-z	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 Daimon Tatsuaki, Kosaka Takeo, Hongo Hiroshi, Aimon Eriko, Nakamura Kohei, Mikami Shuji, Nishihara Hiroshi, Oya Mototsugu	4. 巻 4
2. 論文標題 Prominent response to platinum based chemotherapy in a patient with BRCA2 mutant neuroendocrine prostate cancer and MDM2 amplification	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 IJU Case Reports	6. 最初と最後の頁 216 ~ 219
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1002/iju5.12287	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 Kosaka Takeo, Hongo Hiroshi, Hayashi Hideyuki, Nakamura Kohei, Nishihara Hiroshi, Mikami Shuji, Beltran Himisha, Oya Mototsugu	4. 巻 24
2. 論文標題 Germline BRCA2 mutation in a case of aggressive prostate cancer accompanied by spinal bulbar muscular atrophy	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Asian Journal of Andrology	6. 最初と最後の頁 116 ~ 116
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.4103/aja.aja_37_21	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 該当する

1. 著者名 Yanai Yoshinori, Kosaka Takeo, Mikami Shuji, Hongo Hiroshi, Yasumizu Yota, Takeda Toshikazu, Matsumoto Kazuhiro, Miyauchi Jun, Kitano Shigehisa, Oya Mototsugu	4. 巻 11
2. 論文標題 CD8-positive T cells and CD204-positive M2-like macrophages predict postoperative prognosis of very high-risk prostate cancer	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Scientific Reports	6. 最初と最後の頁 1-7
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1038/s41598-021-01900-4	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 Hongo Hiroshi, Kosaka Takeo, Nakatsuka Seishi, Oya Mototsugu	4. 巻 10(3)
2. 論文標題 A long-term survivor of metastatic neuroendocrine prostate cancer treated with multimodal therapy: genetic consideration from next-generation sequencing	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 International Cancer Conference Journal	6. 最初と最後の頁 174-180
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1007/s13691-021-00482-2	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 Takayama Ken-ichi, Kosaka Takeo, Suzuki Takashi, Hongo Hiroshi, Oya Mototsugu, Fujimura Tetsuya, Suzuki Yutaka, Inoue Satoshi	4. 巻 12
2. 論文標題 Subtype-specific collaborative transcription factor networks are promoted by OCT4 in the progression of prostate cancer	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Nature Communications	6. 最初と最後の頁 1-14
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1038/s41467-021-23974-4	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 Hongo Hiroshi, Kosaka Takeo, Suzuki Yoko, Mikami Shuji, Fukada Junichi, Oya Mototsugu	4. 巻 11
2. 論文標題 Topoisomerase II alpha inhibition can overcome taxane-resistant prostate cancer through DNA repair pathways	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Scientific Reports	6. 最初と最後の頁 1-10
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1038/s41598-021-01697-2	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 Izawa Mizuki, Kosaka Takeo, Nakamura Kohei, Oba Junna, Hishida Tomoyuki, Hongo Hiroshi, Mikami Shuji, Nishihara Hiroshi, Oya Mototsugu	4. 巻 4
2. 論文標題 Pulmonary metastasis secondary to abiraterone resistant prostate cancer with homozygous deletions of BRCA2: First Japanese case	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 IJU Case Reports	6. 最初と最後の頁 14~17
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1002/iju5.12224	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 Yanai Yoshinori, Kosaka Takeo, Nakamura Kohei, Aimono Eriko, Matsumoto Kazuhiro, Morita Shinya, Mikami Shuji, Nishihara Hiroshi, Oya Mototsugu	4. 巻 111
2. 論文標題 CDK12 and HER2 coamplification in two urothelial carcinomas with rapid and aggressive clinical progression	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Cancer Science	6. 最初と最後の頁 4652~4655
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1111/cas.14672	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 4件 / うち国際学会 0件)

1. 発表者名 小坂威雄
2. 発表標題 もつ知らないとは言わせないIHBOC 前立腺癌
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

1. 発表者名 小坂威雄
2. 発表標題 進行性去勢感受性前立腺癌の治療戦略: ドセタキセル
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

1. 発表者名 小坂威雄、大家基嗣
2. 発表標題 進行性去勢感受性前立腺癌の治療戦略：ドセタキセル
3. 学会等名 第58回日本癌治療学会学術集会（招待講演）
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 小坂威雄
2. 発表標題 mCRPCの未来予想図：タキサン系抗がん剤の位置づけを再考する
3. 学会等名 第6回日本泌尿器腫瘍学会学術集会（招待講演）
4. 発表年 2020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 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 (Oya Mototsugu) (00213885)	慶應義塾大学・医学部（信濃町）・教授 (32612)	

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	植田 幸嗣 (Ueda Koji) (10509110)	公益財団法人がん研究会・がんプレジジョン医療研究センター がんオーダーメイド医療開発プロジェクト・プロジェクトリーダー (72602)	
研究分担者	三上 修治 (Mikami Shuji) (20338180)	独立行政法人国立病院機構埼玉病院（臨床研究部）・診療部・病理診断部長 (82408)	
研究分担者	西原 広史 (Nishihara Hiroshi) (50322805)	慶應義塾大学・医学部（信濃町）・教授 (32612)	
研究分担者	田中 伸之 (Tanaka Nobuyuki) (60445244)	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