

科学研究費助成事業 研究成果報告書

令和 5 年 5 月 18 日現在

機関番号：72602

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2020～2022

課題番号：20K07603

研究課題名(和文) 消化管腫瘍の細胞多様性と微小環境相互作用の解明

研究課題名(英文) Study of intestinal tumor based on the interaction of cellular diversity with tumor microenvironment

研究代表者

坂原 瑞穂 (SAKAHARA, Mizuho)

公益財団法人がん研究会・がん研究所 細胞生物部・博士研究員

研究者番号：00572314

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,400,000円

研究成果の概要(和文)：大腸がんの治療抵抗性の一因として、遺伝子変異を伴う細胞多様性と、その結果生じる腫瘍微小環境への影響が挙げられる。本研究では、RAS変異と細胞多様性の機能的関連性を明らかにするため、マウス消化管組織由来オルガノイドを用いた一細胞遺伝子発現解析を行い、Kras変異により生じる液性因子と細胞種の変化を同定した。さらに、消化管腫瘍モデルマウスへの薬理的介入を通して、Kras変異に伴う細胞多様性の変化は、液性因子を介して腫瘍微小環境への免疫細胞動員を変化させることを明らかにした。以上の結果から、RAS変異に伴う細胞多様性の機能的意義が明らかとなった。

研究成果の学術的意義や社会的意義

大腸がんは様々な遺伝子変異の蓄積によって悪性化する。本研究では、「Kras変異による細胞多様性の変化」とそれに伴う腫瘍微小環境中の液性因子分泌量の変動、さらにその結果生じる免疫微小環境への影響を明らかにした。

腫瘍関連分子の研究は、それら分子の転写調節やシグナル伝達経路に着目したものが多く、本研究成果は、従来の「Rasシグナル活性化」による腫瘍細胞自身の形質転換に加え、「腫瘍組織の細胞多様性」および「腫瘍微小環境の免疫系変化」の機能的相関を示しており、RASによる免疫回避の新たな概念の提示と治療法開発につながることを期待される。

研究成果の概要(英文)：Cell diversity and tumor microenvironment is considered to be the causes of treatment-resistant in colorectal cancer. To investigate the functional interaction of RAS mutation with cellular diversity, we performed single-cell RNA sequencing (scRNA-seq) analysis using genetically modified mice and their organoid. Through scRNA-seq analysis, we found that tumor cells with Kras mutation secreted humoral factor with or without alteration of cellular diversity. We focused on humoral factor which is reported to be associated with recruitment of immune cells in tumor microenvironment. Using pharmacological intervention, we found that humoral factor plays an important role in the interaction of tumor cells with immune cells in Apc/Kras intestinal tumor mice.

These observations suggest that cellular diversity is induced by Kras mutation modulate the immune microenvironment in intestinal tumor.

研究分野：細胞生物学

キーワード：消化管腫瘍 細胞多様性 腫瘍微小環境 発がんモデルマウス

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

大腸がんは、正常消化管細胞に生じた APC 遺伝子変異により初期の良性腫瘍が形成され、その後、RAS や TP53 などの遺伝子変異が段階的に蓄積することで悪性化する。生じたがん組織は、「増殖能や分化形質の異なる様々な細胞種で構成される」という細胞多様性を示す。そのため、化学療法等に抵抗性を示す細胞が選択的に増殖することが、治療抵抗性の一因と考えられるが、「変異遺伝子の機能」と「変異に伴う細胞多様性」との相関関係については不明な点が多い。悪性化に関わる遺伝子変異のうち、RAS 変異を有する大腸がんは抗 EGFR 抗体の適応とはならず、免疫チェックポイント阻害薬に対する感受性も低い。これらのことから、RAS 変異に伴う腫瘍微小環境を含めた腫瘍組織の変化を明らかにすることは、有効な治療法が確立していない RAS 変異陽性大腸がん患者に対する新たな治療法開発における学術的基盤につながると期待された。

2. 研究の目的

本研究課題では、大腸がんの発生・進展・悪性化に重要な役割を果たす APC と RAS の遺伝子変異に伴う細胞多様性に焦点を絞り、以下の3点を明らかにする。

(1) マウス消化管組織由来オルガノイドの遺伝子発現解析を行い、RAS 変異と相関する分子等を同定する。

(2) 同定した分子等について、マウス消化管組織での発現等を検証する。

(3) 消化管腫瘍モデルマウスを用いて、同定した分子等の腫瘍形成等への機能的相関を明らかにする。

生体組織の細胞多様性を模倣しているオルガノイドの発現解析と、腫瘍発生過程や腫瘍微小環境を含めたがん組織を再現している消化管腫瘍モデルマウスの実証を通して、「RAS 変異による細胞多様性」と「RAS 変異に伴う腫瘍微小環境の変化」の機能的相関を明らかにすることを目指す。

3. 研究の方法

本研究では、APC 遺伝子変異によって生じた腫瘍における RAS 変異の機能的意義を明らかにするため、タモキシフェン投与により、時期特異的かつ消化管幹細胞 (Lgr5) 特異的に Apc 遺伝子欠損 (Apc 変異) かつ KrasG12D 発現 (Kras 変異) を誘導できる消化管腫瘍モデルマウスを用いた。

(1) 遺伝子発現解析

Apc 変異・Kras 変異・Apc/Kras 二重変異を持つ各マウス消化管組織から樹立したオルガノイドを用いて、遺伝子発現解析 (バルク解析) および一細胞遺伝子発現解析を行い、正常オルガノイドとの発現を比較した。

(2) *in vivo* 解析

Kras 変異に伴う腫瘍組織および腫瘍微小環境の変化を明らかにするため、消化管腫瘍モデルマウスの腫瘍組織を用いた FACS 解析や免疫組織化学染色を行った。また、Kras 変異に伴う腫瘍組織の変化が機能的意義を有するのかを明らかにするため、Apc/Kras 二重変異消化管腫瘍モデルマウスに -セクレターゼ阻害剤 DBZ を投与し、Notch シグナル阻害による分泌系細胞への分化誘導実験を行った。

Kras 変異と相関する分子に関して、中和抗体・阻害剤等の投与実験を行い、腫瘍形成や腫瘍微小環境変化について検討した。

なお、生じた腫瘍組織の大きさの比較には、免疫組織化学染色による -カテニンの蓄積を指標に腫瘍面積を数値化する画像処理システムを用いた。

4. 研究成果

(1) Kras 変異に伴う腫瘍組織の変化

オルガノイドの遺伝子発現解析 (バルク解析) から、Kras 変異では分泌系細胞を含む様々な分化細胞マーカー遺伝子の発現上昇が明らかとなった。また、消化管腫瘍モデルマウスの腫瘍組織を構成する細胞種の中でも、分泌系細胞の一種である杯細胞の増加が Apc/Kras 二重変異マウスで認められた (図 1)。

Apc 変異マウスの消化管腫瘍形成は、Kras 変異追加によって促進することが明らかとなった。この現象は、Apc によって生じる腫瘍組織は、Kras 変異に伴って、腫瘍細胞が増殖しやすい環境に変化した可能性を示している。

正常消化管組織の分泌系細胞は、粘液産生に加え、サイトカイン産生や抗原提示を介して免疫応答に関与している。

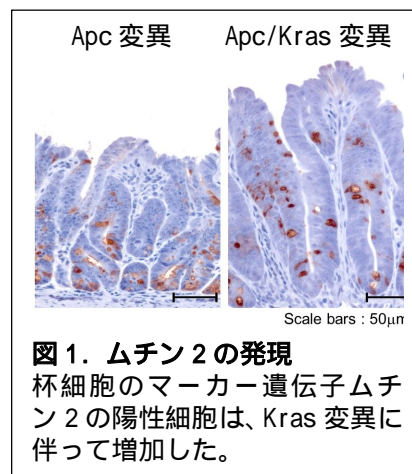


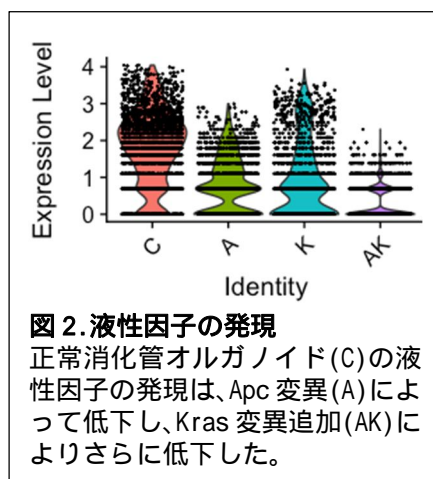
図 1. ムチン 2 の発現

杯細胞のマーカー遺伝子ムチン 2 の陽性細胞は、Kras 変異に伴って増加した。

このことから、腫瘍組織においても分泌系細胞と免疫細胞の相互作用が示唆される。Apc/Kras 二重変異マウスに生じた腫瘍組織の蛍光多重免疫組織染色および FACS 解析を行った結果、予想通り、一部の免疫細胞について、Apc 変異マウスと比較して腫瘍微小環境での増減が認められた。これらの結果は、Kras 遺伝子の活性化変異が、腫瘍細胞自体の増殖能亢進に加え、「腫瘍組織の細胞多様性」と「腫瘍微小環境の変化」を引き起こす可能性を示唆している。Kras 変異に伴って増加した分泌系細胞が、腫瘍微小環境の変化を誘発しているのかを検証するため、消化管細胞の運命決定に関与する Notch シグナルを阻害することにより、マウス個体レベルで細胞分化の方向性を人為的に変えた。腫瘍がある程度の大きさになった時期に、Apc/Kras 二重変異マウスに DBZ 投与を行うと、腫瘍組織の杯細胞が増加しただけでなく、腫瘍形成の亢進および腫瘍微小環境への免疫細胞動員が変化することを見出した。細胞多様性を模倣したこの実験から、Kras 変異に伴う細胞分化の方向性変化が、腫瘍微小環境の変化と機能的に相関していることが明らかになった。

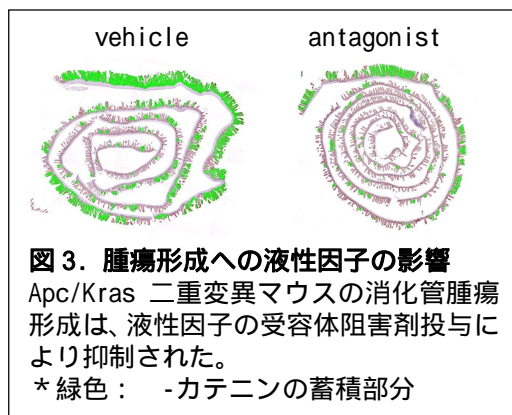
(2) Kras 変異に伴う細胞多様性に相関する分子の同定

オルガノイドの一細胞遺伝子発現解析から、消化管組織の代表的な液性因子について、Apc/Kras 二重変異に伴う発現低下を見出した(図2)。クラスター解析により、幹細胞・TA 細胞・吸収上皮細胞・分泌系細胞などのクラスターに分類した結果、バルク解析結果と同様に、杯細胞を含む分泌系細胞の細胞集団が増加していることが明らかになった。これらの細胞集団特異的に、一部の液性因子の発現増加が認められた。この中には、腫瘍微小環境への免疫細胞動員に関与する液性因子も含まれていた。マウス正常消化管組織および腫瘍組織の免疫組織化学染色から、Kras 変異との相関が示された一部の液性因子の発現が杯細胞に認められることを明らかにした。これらの結果から、オルガノイド遺伝子発現解析で認められた「Kras 変異に伴う液性因子の発現上昇」は、液性因子を分泌する杯細胞自体の増加に起因すると考えられる。



(3) 腫瘍形成における液性因子の関与

腫瘍形成における液性因子の関与を明らかにするため、Apc/Kras 二重変異マウスへ中和抗体投与を短期間行った結果、腫瘍微小環境への免疫細胞動員が変化した。さらに、Apc/Kras 二重変異マウスに液性因子の受容体阻害剤を投与すると、腫瘍微小環境の免疫細胞増減に加え、腫瘍形成の抑制が認められた(図3)。受容体阻害剤による腫瘍形成の抑制効果は、MEK 阻害剤との併用投与によって相乗効果が認められた。これらの結果から、Apc/Kras 二重変異マウスの腫瘍形成には、液性因子が重要な役割を担っていることが明らかになった。



以上の結果から、Kras 変異による RAS シグナル活性化は、これまで知られていた Kras 変異腫瘍細胞自体の増殖亢進に加え、腫瘍組織の細胞分化を制御することが示された。本研究成果は、消化管腫瘍組織における Kras 変異に伴う分泌系細胞への分化亢進は、液性因子を分泌する細胞自体の増加を引き起こし、その結果、液性因子の分泌量増加を介して腫瘍微小環境の免疫系が変化する可能性を示唆している。腫瘍組織の液性因子は種類が多く、本研究で着目した分子を含め、腫瘍微小環境の免疫細胞や間質など、多様な腫瘍関連分子との機能的相関のさらなる研究により、液性因子を介した腫瘍細胞と腫瘍微小環境の相互作用解明に基づいた、RAS 変異大腸がんに対する治療標的分子の同定が期待される。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計3件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 坂原 瑞穂、八尾 良司
2. 発表標題 消化管腫瘍の細胞多様性と微小環境
3. 学会等名 新学術領域研究「細胞ダイバース」第3回若手ワークショップ
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 坂原 瑞穂、高野 洋志、八尾 良司
2. 発表標題 消化管腫瘍の細胞多様性と微小環境 消化管腫瘍モデルマウスを用いて
3. 学会等名 新学術領域研究「先端モデル動物支援プラットフォーム」2020年度若手支援技術講習会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 坂原 瑞穂、八尾 良司
2. 発表標題 Kras変異に伴う消化管腫瘍組織の変化
3. 学会等名 新学術領域研究「先端モデル動物支援プラットフォーム」2021年度若手支援技術講習会
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
---------	---------