

令和 5 年 5 月 19 日現在

機関番号：32666

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2020～2022

課題番号：20K08698

研究課題名(和文) シングルセル解析による有棘細胞がんの腫瘍内不均一性の起源の探索

研究課題名(英文) Exploration of the origin of intratumoral heterogeneity in squamous cell carcinoma by single-cell analysis

研究代表者

佐伯 秀久 (Saeki, Hidehisa)

日本医科大学・大学院医学研究科・大学院教授

研究者番号：80235093

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,300,000円

研究成果の概要(和文)：皮膚有棘細胞がん(cSCC)の腫瘍内不均一性の発生メカニズムを調べる目的で、私たちは培養cSCC細胞(2次元)を同種同系のマウスに皮下注射してcSCC組織(3次元)を形成させ、がん微小環境を再現する実験系を確立した。私たちは次に、培養cSCC細胞とcSCC組織で発現している遺伝子を、RNA-Seq法で網羅的に解析して比較した。その結果cSCC組織で有意に発現量が増減していた遺伝子1488個のパスウェイ解析を行ったところ、炎症促進、細胞免疫応答、細胞接着に關与するシグナル経路が、非常に活性化されていることが判明した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

2次元の培養細胞を用いたがん研究は、シグナル伝達経路の解明をはじめ、がん研究を大きく発展させてきたが、3次元組織でのがん細胞の振る舞いを必ずしも反映しているとは言えなかった。本研究は、この2次元と3次元のギャップを埋め、がん微小環境が生じるメカニズムの解明を目指した研究で、3次元のがん組織で活性化している複数のシグナル経路を見出した。本研究の成果は、がんの腫瘍内不均一性の解明と、高齢者に増加している有棘細胞がんの新たな治療法の開発につながることで期待される。

研究成果の概要(英文)：To investigate the mechanism of intratumor heterogeneity in cutaneous squamous cell carcinoma (cSCC), we established an experimental system in which cultured cSCC cells (2D) were subcutaneously injected into mice of the same strain to form cSCC tissues (3D), thus reproducing the cancer microenvironment. We then compared the genes expressed in cultured cSCC cells and cSCC tissues by comprehensive RNA-Seq analysis. Pathway analysis of 1488 genes whose expression levels were significantly up- or down-regulated in cSCC tissues revealed that pathways involved in promoting inflammation, cellular immune response, and cell adhesion were highly activated.

研究分野：皮膚科学

キーワード：有棘細胞がん 腫瘍内不均一性 微小環境 RNA-Seq シグナル伝達 3次元構造

科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属します。

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

(1) 皮膚有棘細胞がん (cutaneous squamous cell carcinoma, 以下 cSCC) は高齢者の露光部に好発し、その発症には紫外線曝露が大きく関与する。そのため、cSCC は体細胞変異の頻度が非常に高いことが報告されている。この遺伝子変異率が高いことが、cSCC の腫瘍内不均一性 (intratumoral heterogeneity) を生む分子基盤になっていると考えられ、臨床の現場では、治療抵抗性、再発・転移、病理学的多様性として現れる。

(2) 腫瘍内不均一性を生む原因として、遺伝子異常の蓄積の他に、最近がん微小環境が注目されている。がん微小環境は、がんの周囲を取り巻く免疫細胞、線維芽細胞、血管内皮細胞などから構成され、がん細胞の生存、進展に有利に働くと考えられる。これまで培養がん細胞は、がん細胞のシグナル伝達、動態、薬剤感受性などの研究に大きな役割を果たしてきたが、培養がん細胞を用いた研究に決定的に欠けているのは、このがん微小環境の研究ができないことである。しかし、cSCC における微小環境の影響を解析する方法はまだ確立していない。さらに、がん微小環境は複数の細胞の相互作用で構築されるので、従来のがん組織を集団 (バルク) として捉える研究手法ではなく、個別の細胞ごとに解析する必要がある。すなわち、シングルセル解析の手法を用いて、cSCC の微小環境を解析する手法の確立が求められている。微小環境の理解は、cSCC の腫瘍内不均一性の解明、そして不均一性を考慮した新しい治療法の創出につながると考えられる。

2. 研究の目的

(1) 培養がん細胞を用いた研究に欠けている、がん微小環境を研究する実験系を確立する。

(2) 2次元の培養 cSCC 細胞から3次元の cSCC 組織ができる時に、遺伝子発現にどのような違いがみられるのかをシングルセル・レベルで比較し、がん微小環境により cSCC 内に不均一性が生じるメカニズムを明らかにする。

3. 研究の方法

(1) がん感受性マウス由来培養 cSCC 細胞の樹立

マウスは遺伝的バックグラウンドにより DMBA (イニシエーター) と TPA (プロモーター) を用いる2段階化学発がんに対する感受性が異なる。化学発がん感受性の高い FVB/N マウス由来の cSCC 細胞株を樹立する。

(2) 同種同系 (isogenic) 細胞移植モデルの構築

cSCC 細胞をマウスに接種する際に、異種、あるいは同種でも異系統の細胞を用いると、拒絶反応が起き、がん微小環境を正確に評価することができなくなる。そこで、この拒絶反応を回避するために、(1) で確立した培養 cSCC 細胞を、遺伝的バックグラウンドが同じ FVB/N マウスの背中に注射して腫瘍を形成させる。

(3) RNA-Seq 法による遺伝子発現解析

培養 cSCC 細胞とそれを皮下に注射してできた cSCC 組織からそれぞれ RNA を抽出し、RNA-Seq 解析を行う。得られた DEG (Differentially Expressed Gene) データをもとに、本学で利用可能な解析ソフトウェア IPA (Ingenuity Pathway Analysis) を用いてパスウェイ解析を行い、3次元の cSCC 組織で活性化、あるいは抑制されるシグナル経路を探索する。

4. 研究成果

(1) FVB/N マウスの背中の皮膚に DMBA と TPA を塗布して cSCC を作製した。できた cSCC を表皮細胞用無血清培地で培養し、継代を繰り返すことで培養 cSCC 細胞株を樹立した。樹立した細胞株は上皮マーカーである E-cadherin 陽性で、線維芽細胞の混入はないことを確認した。

(2) (1) で樹立した培養 cSCC 細胞を、同種同系の FVB/N マウスの背中の皮下に $1 \times 10^6 \sim 10^7$ 個注射することで、再現性良く cSCC 組織を作製する系を構築した (図1)。こうしてできた cSCC を病理組織学的に検討すると、腫瘍組織には、注射した cSCC 細胞に由来する上皮成分だけでなく、紡錘形をした間葉成分も含まれていることがわかった。各成分は、上皮マーカーである E-cadherin と間葉マーカーである vimentin でそれぞれ染色され、しかもその染色性には濃淡があることがわかった。

また、腫瘍の周囲にはリンパ球を主体とする炎症細胞の浸潤がみられ、注射した cSCC 細胞に対して免疫反応が起きていた。

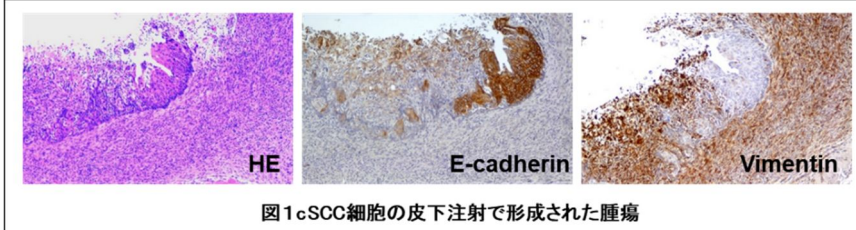


図1 cSCC細胞の皮下注射で形成された腫瘍

(3)本研究は当初、上述の解析を、シングルセル・レベルで行うことを目標としていた。しかし、シングルセルにするためには、がん組織を長時間酵素処理する必要があり、その時点で3次元構築に関わる遺伝子の発現がダウンレギュレーションする可能性があること、cSCC組織は表皮細胞間の接着が強く、完全にシングルセルにすることが困難であったことなどから、まず、培養cSCC細胞(2次元)とそれをマウスに皮下注射してできたからcSCC組織(3次元)の遺伝子発現を、集団(バルク)として解析することにした。

RNA-Seq解析では、培養cSCC細胞群(3検体)と3次元cSCC組織群(3検体)で、低発現量の遺伝子を除外した、15,877遺伝子の発現量を比較した。その結果、発現量が増加した遺伝子が4,328、発現量が低下した遺伝子が4,312見つかった。さらに、統計的有意性が高く、発現量の増減の大きい遺伝子を絞り込み、最終的に1488遺伝子(増加1152遺伝子、減少336遺伝子)を解析した。

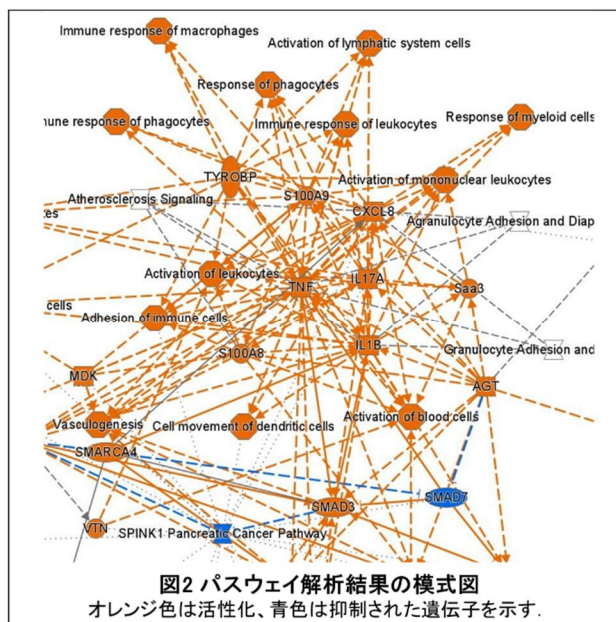


図2 パスウェイ解析結果の模式図
オレンジ色は活性化、青色は抑制された遺伝子を示す。

(4) 発現が増加した遺伝子について、パスウェイ解析を行ったところ、炎症誘発や細胞間シグナル(Pathogen induced cytokine storm signaling pathway)細胞免疫応答(Phagosome formation, S100 family signaling pathway, Dendritic cell maturation)細胞接着(FAK signaling)に関わる経路が非常に活性化しているが判明した(表1)。細胞間シグナルや細胞接着に関わる経路の活性化は、シングルセルでは観察できなかった可能性がある。

表1 統計的有意性が高く、増減量の多い遺伝子を多く含んだ経路と主な遺伝子

発現は優位に上昇したシグナル経路	主な遺伝子
Pathogen induced cytokine storm signaling	IL33, IL1B, TGFB, CCL2, CCL8, CXCL12, MAPK13
Phagosome formation	MSR1, RAC2, CCR2, CARD9, ITGAM, ADGRE1, ITGB2
S100 family signaling	S100A9, S100A3, MMP2, MMP9, S100A14, CCR2
Dendritic cell maturation	TYROBP, IL33, CLO3A, IRF8, IL1B, MAPK13
FAK signaling	MMP2, MMP9, PDGFRB, IL33, ITGAM, CCR2, ADGRE1
発現が有意に減少した経路	
LXR/RXR activation	LYZ, APOE, CCL2, MMP9, MSR1
SPINK1 pancreatic cancer	KLK7, KLK6, KLK5, KLK10, CPM, CELA1

考察

(1) パスウェイ解析の結果、炎症誘発性のシグナル経路が最も活性化していることがわかった。接種後に形成された腫瘍は、接種後3週間後に摘出している。今回は isograft モデルを用いていることから、炎症誘発性シグナル経路の活性化は、接種した腫瘍細胞に対する拒絶反応というより、慢性炎症が惹起された結果と考えられる。慢性炎症は発がんと密接に関係していることから、接種した細胞は、炎症反応を惹起することで、がんの微小環境を変化させたと考えられる。

(2) 今回注射したcSCC細胞の周囲には、紡錘形の線維芽細胞様の細胞集団がみられた。この細胞集団の由来には2つの可能性がある。マウスDMBA/TPAモデルでは、cSCCは上皮間葉転換(epithelial-mesenchymal transition, EMT)により、aggressiveな紡錘形の細胞に変化する(Cold Spring Harb Perspect Med 2014;4:a013623)ことから、cSCC細胞が変化した可能性がある。一方、cSCC周囲の線維芽細胞は、炎症シグナルを受けてcancer-associated fibroblast(CAF)に変化したものである可能性がある。実際、今回の解析で最も活性化していたPathogen induced cytokine storm signalingで、発現が上昇していた遺伝子には、IL-1, TGF, CCL2などが含まれていたが、これらのサイトカインおよびケモカインは、通常の線維芽細胞をCAFに変化させることが報告されている(Nature Reviews Cancer 20, 174-186, 2020)。

cSCC周囲の線維芽細胞様細胞が、注射したcSCC細胞由来のものか、炎症性サイトカインにより誘導されたものかをはっきりさせるには、cSCC細胞を注射する際に、マーカー遺伝子をこ見込んでおけば解決できたかもしれず、今後の課題である。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計5件（うち査読付論文 5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 Kato N, Ohya Y, Ikeda M, Ebihara T, Katayama I, Saeki H, Shimojo N, Tanaka A, Nakahara T, Nagao M, Hide M, Fujita Y, Fujisawa T, Futamura M, Masuda K, Murota H, Yamamoto-Hanada K	4. 巻 69
2. 論文標題 Japanese guidelines for atopic dermatitis 2020	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Allergol Int	6. 最初と最後の頁 356-369
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.alit.2020.02.006	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 Watanabe M, Kosumi H, Osada S-I, Takashima S, Wang Y, Nishie W, Oikawa T, Hirose T, Shimizu H, Natsuga K	4. 巻 48
2. 論文標題 Type XVII collagen interacts with the aPKC PAR complex and maintains epidermal cell polarity	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Exp Dermatol	6. 最初と最後の頁 62-67
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1111/exd.14196	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 Saeki Hidehisa, Ishii Kanako, Joshi Avani, Bensimon Arielle G., Yang Hongbo, Kawaguchi Isao	4. 巻 33
2. 論文標題 An economic evaluation of risankizumab versus other biologic treatments of moderate to severe plaque psoriasis in Japan	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Journal of Dermatological Treatment	6. 最初と最後の頁 229 ~ 239
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1080/09546634.2020.1744505	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 Hoashi Toshihiko, Kanda Naoko, Saeki Hidehisa	4. 巻 23
2. 論文標題 Molecular Mechanisms and Targeted Therapies of Advanced Basal Cell Carcinoma	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 International Journal of Molecular Sciences	6. 最初と最後の頁 11968 ~ 11968
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3390/ijms231911968	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 Blauvelt Andrew, Langley Richard G., Lacour Jean-Philippe, Toth Darryl, Laquer Vivian, Beissert Stefan, Wollenberg Andreas, Herranz Pedro, Pink Andrew E., Peris Ketty, Fangel Stine, Gjerum Le, Corriveau Joshua, Saeki Hidehisa, Warren Richard B., Simpson Eric, Reich Kristian	4. 巻 87
2. 論文標題 Long-term 2-year safety and efficacy of tralokinumab in adults with moderate-to-severe atopic dermatitis: Interim analysis of the ECZTEND open-label extension trial	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Journal of the American Academy of Dermatology	6. 最初と最後の頁 815 ~ 824
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.jaad.2022.07.019	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

〔学会発表〕 計2件 (うち招待講演 0件 / うち国際学会 2件)

1. 発表者名 Katoh N, Saeki H, Kataoka Y, Etoh T, Teramukai S, Takagi H, Fujita H, Levit NA, Rizova E, Arima K
2. 発表標題 Evaluation of standard treatments for managing Japanese adult patients with moderate-to-severe atopic dermatitis: 2-year data from the ADDRESS-J disease registry.
3. 学会等名 The 29th Congress of the European Academy of Dermatology and Venereology (EADV 2020) (国際学会)
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 Toyoshima A, Noguchi N, Sasaki J, Sasaki T, Manabe M, Osada S-I
2. 発表標題 Selective blockade of phosphatidylinositol-3 kinase suppresses the development of cutaneous squamous cell carcinoma
3. 学会等名 International Societies for Investigative Dermatology 2023 (ISID 2023) (国際学会)
4. 発表年 2023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	長田 真一 (Osada Shin-Ichi) (00244484)	日本医科大学・医学部・准教授 (32666)	

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	平谷 伊智朗 (Hiratani Ichiro) (40583753)	国立研究開発法人理化学研究所・生命機能科学研究セン ター・チームリーダー (82401)	

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