

令和 5 年 5 月 31 日現在

機関番号：32612

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2020～2022

課題番号：20K09549

研究課題名(和文) シングルセルシーケンスを用いたBCG不応性膀胱癌の解明

研究課題名(英文) Single-cell RNA-seq reveals details of BCG-refractory bladder cancer

研究代表者

丹羽 直也 (Niwa, Naoya)

慶應義塾大学・医学部(信濃町)・訪問研究員

研究者番号：40626743

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,700,000円

研究成果の概要(和文)：マウス膀胱癌細胞株MBT-2に緑色蛍光タンパク質GFPを遺伝子導入してMBT-2GFP+細胞を樹立、マウス膀胱に移植して正所性膀胱がんモデルマウスを作製した。モデルマウスにBCGを投与し、GFPで標識されたがん細胞を回収、シングルセルRNAシーケンスを行った。バイオインフォマティクス解析では、BCG投与により細胞増殖を促進するKRASシグナル伝達関連遺伝子の発現が上昇する細胞集団が誘導される可能性が示された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

現在確立された治療がないBCG(ウシ型弱毒結核菌、表在性膀胱がんに対する標準薬)抵抗性膀胱がんに対する新規治療法の開発を目指して、新しい膀胱がんマウスモデルを開発した。このマウスに対してBCGを投与、投与後に生存しているがん細胞を生きたまま1細胞ずつ回収し、RNAシーケンス(遺伝子の発現量を解析する手法)を行った。その結果、BCG投与後では細胞増殖に関する遺伝子群の発現が上昇する細胞群が増加する傾向が見られた。これらの細胞はBCG抵抗性と関連し、治療標的となる可能性が示唆された。

研究成果の概要(英文)：The green fluorescent protein (GFP) gene was introduced into mouse bladder cancer cells MBT-2, and MBT-2GFP+ cells were established. The MBT-2GFP+ cells were orthotopically implanted into the urinary bladder of C3H/H3 mice to create an orthotopic bladder cancer mouse model.

The mice were given BCG through the urethra, the bladders of the mice with tumors were extirpated, then suspended in single cell solution. The GFP-recombinant tumor cells were sorted using fluorescence-activated cell sorting, then single-cell RNA-sequencing was performed using iCell18. Bioinformatics analysis suggested that a specific tumor cell subpopulation with elevated transcriptomes associated with the KRAS signaling pathway are induced after BCG therapy.

研究分野：尿路悪性腫瘍、がん免疫療法、シングルセル解析

キーワード：膀胱がん シングルセル解析 BCG がん免疫療法

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

膀胱がんは9割以上が膀胱内腔を覆う尿路上皮から発生する尿路上皮がんである。膀胱壁は内腔側から尿路上皮、粘膜下層、筋層、漿膜(および膀胱周囲脂肪組織)が重なった層構造をなしている。尿路上皮がんの4分の3は診断時にがんが尿路上皮もしくは粘膜下層に留まるいわゆる早期がんであり、筋層非浸潤性尿路上皮がん(non-muscle invasive bladder cancer; NMIBC)と呼称され、通常は経尿道的切除術によって切除する。膀胱がんの臨床的問題点はその高い再発率であり、経尿道的に切除するが、術後高い頻度で再発する。再発した癌でも、再発時に尿路上皮および粘膜下層に留まる NMIBC であれば再度の切除が可能だが、一定の頻度で再発時にがんが筋層にまでおよぶ筋層浸潤がん(muscle invasive bladder cancer; MIBC)へ進展する。MIBC に対しては膀胱に限局している場合には膀胱全摘術が、転移症例に対しては全身化学療法、免疫療法を含む集学的治療が行われるが予後はよくない。従って、NMIBC においては、がんの再発および進展を防ぐことが非常に重要である。

現在、再発・進展リスクが中～高程度の NMIBC に対する標準治療は、カテーテルを用いて膀胱内に bacillus Calmette-Guérin (BCG) を注入する経尿道的 BCG 療法である。BCG 療法は40年前から行われており、NMIBC の再発および進展を抑制する効果が示されているが、それでも BCG 治療後は半数以上の症例でがんの再発もしくは進展を来す。MIBC に進展した場合には前述の通りの治療となる。NMIBC として再発した場合には再度の切除が可能であるが、初発の NMIBC と比較してその後の再発、進展率は高く、この BCG 治療後に再発したいわゆる BCG 抵抗性膀胱がんに対してその後の再発、進展を予防する確立した治療法は存在しない。

2. 研究の目的

BCG 療法は膀胱内に BCG を注入することで、膀胱局所に免疫細胞が誘導され抗腫瘍効果を呈する、いわゆる免疫療法の1つであるが、BCG が膀胱局所の免疫細胞を誘導する詳細な分子機序は未だ明らかではなく、このことが BCG 抵抗性膀胱がんの新規治療開発を妨げる一因となっている。

次世代シーケンシング技術の発展に伴い細胞集団のゲノム、エピゲノム、およびトランスクリプトームの網羅的な解析が可能となった。その結果、従来は均一な細胞集団で構成されると考えられていた腫瘍組織だが、実はその内部では細胞形質を変化させる新たな遺伝子変異や、酸化ストレスや低酸素刺激といったがん微小環境が促すエピジェネティック変化が不均一に生み出されることが明らかとなった。このがん組織の生物学的多様性は、治療抵抗性を生み出す一因である腫瘍内不均一性(intratumor heterogeneity, ITH)として注目されている。

近年のさらなる次世代シーケンシング技術の向上により、1細胞毎ごとのゲノム、エピゲノム、およびトランスクリプトームを網羅的に解析できる技術が発展している。シングルセル RNA シークエンスは、単一細胞に含まれるメッセンジャー RNA に1細胞毎に異なるバーコードでタグ付けを行ったのち、相補的 DNA に逆転写、増殖し、次世代シーケンサーを用いて解読を行う。解読された1細胞毎の遺伝子発現情報を元に細胞集団を新たに分類し、分類された各々の細胞集団に特徴的な遺伝子発現情報を得ることができる。このシングルセル解析では従来の RNA シークエンスでは検出が難しかった希少な細胞における遺伝子発現変化も検出可能である。本研究ではこの革新的な技術を BCG 抵抗性膀胱癌に適用する。BCG 治療前後でシングルセル RNA シークエンスを行い BCG 治療で変化する ITH を明らかにし、BCG 抵抗性膀胱癌の分子基盤を確立することを目的とする。

3. 研究の方法

R2 年度：マウス膀胱癌細胞株を移植する同種移植に基づく正所性膀胱がんモデルマウスの作成を試みた。腫瘍が生着したマウス膀胱から腫瘍細胞および免疫細胞を1細胞毎に効率よく回収するプロトコルを検討した。

R3 年度：確立されたプロトコルを元に、正所性膀胱癌モデルマウス BCG 投与群と非投与群から腫瘍細胞および免疫細胞を回収し、シングルセル RNA シークエンスを試みた。

R4 年度：得られたシークエンスデータを用いてバイオインフォマティクス解析を行い、BCG 投与によって変化する ITH を検討した。

4. 研究成果

R2 年度：緑色蛍光タンパク質 GFP を腫瘍細胞を識別できるマーカーとすべく、マウス膀胱がん細胞株 MBT-2 に GFP 遺伝子を導入した MBT-2GFP+細胞を樹立した。この MBT-2GFP+細胞を C3H/H3 マウスの膀胱内へ正所性に移植し、正所性膀胱癌モデルマウスを作製した。

この確立したマウスモデルから腫瘍が生着した膀胱を採取し、シングルセル懸濁液を調整、fluorescence-activated cell sorting (FACS) を用いて GFP で標識された腫瘍細胞のみを生きのまま1細胞毎に回収するプロトコルを確立した。同シングルセル懸濁液から CD3, CD4, CD8 で蛍光標識を行い免疫細胞も1細胞毎に回収することも可能であった。このプロトコルは他の担がんモデルマウスへの応用が可能であり、今後のがん研究への波及効果が期待できる。

R3 年度：R2 年度に確立したプロトコルを用い、正所性膀胱癌モデルマウスに対して臨床に準じて経尿道的に BCG を投与した群およびコントロールとして生理食塩水を投与した非投与群でそれぞれ GFP で標識した腫瘍細胞および CD3, CD4, CD8 で標識した免疫細胞を 1 細胞毎に回収、最新の iCell8 を用いてシングルセル RNA シークエンスを行った。

R4 年度：前年度に行った BCG 投与群と非投与群の腫瘍細胞および免疫細胞のシングルセル RNA シークエンスから得られたデータを元にバイオインフォマティクス解析を行った。免疫細胞では、成熟リンパ球で発現が高く免疫微小環境の形成に関わる Cd52 の発現が低下している T 細胞が BCG 投与後に誘導される傾向が見られた。腫瘍細胞では Gene Set Enrichment Analysis において BCG 治療後には K-ras シグナル伝達が亢進している細胞が誘導される傾向が見られ、BCG 治療性抵抗がんの新たな治療標的となる可能性が示唆された。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計1件（うち査読付論文 1件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 0件）

1. 著者名 Iwasawa Tomohiro, Niwa Naoya, Matsumoto Kazuhiro, Komatsuda Akari, ide Hiroki, Oya Mototsugu	4. 巻 27
2. 論文標題 Reduced recurrence of low risk non muscle invasive bladder cancer is associated with low urine specific gravity	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 International Journal of Urology	6. 最初と最後の頁 1019 ~ 1023
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1111/iju.14351	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 -

〔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 田中伸之、丹羽直也、梅田浩太、村上哲史、案納忠譜、安水洋太、武田利和、松本一宏、森田伸也、小坂威雄、浅沼宏、水野隆一、大家基嗣
2. 発表標題 膀胱上皮内癌の不均一性：がん免疫ゲノミクスと1細胞解析によるBCG不応性の解明
3. 学会等名 第110回日本泌尿器科学会総会
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	大家 基嗣 (Oya Mototsugu) (00213885)	慶應義塾大学・医学部（信濃町）・教授 (32612)	
研究分担者	三上 修治 (Mikami Syuji) (20338180)	慶應義塾大学・医学部（信濃町）・講師（非常勤） (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)	

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
研究協力者	垣見 和宏 (Kakimi Kazuhiro) (80273358)		

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