

令和 5 年 5 月 9 日現在

機関番号：32643

研究種目：若手研究

研究期間：2020～2022

課題番号：20K16230

研究課題名（和文）抗がん剤抵抗性細胞群のシングルセル解析による休止型大腸がん幹細胞の同定

研究課題名（英文）Identification of slow-cycling colon cancer stem cells by single cell gene expression analysis of chemoresistant cells

研究代表者

神田 裕介（Kanda, Yusuke）

帝京大学・先端総合研究機構・研究員

研究者番号：80803949

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）：少数の休止型がん細胞群が抗がん剤抵抗性を持つ事が近年明らかになってきたが、大腸がんでは不明である。そこで、休止型大腸がん幹細胞の存在を解明する目的で、誘導型H2B-EGFPを導入した大腸がん患者由来オルガノイド培養系を確立した。H2B-EGFP発現細胞は抗がん剤抵抗性を示した。シングルセル解析からH2B-EGFP発現細胞は、特徴的な遺伝子発現を示した。遺伝子をKOするための実験系も確立した。次に、移植腫瘍内に休止型がん細胞が存在するかについて検討した。オルガノイドを移植後、H2B-EGFPを一定期間発現させた後、抗がん剤を投与した。その結果、H2B-EGFP陽性がん細胞が残存する事を見出した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

休止型がん幹細胞は、抗がん剤抵抗性の要因であると考えられている。本研究で得られた成果は、ヒト大腸がん組織内に休止型がん幹細胞を見出したものであり、今後、休止型大腸がん幹細胞を標的とした治療法の開発が期待される。

研究成果の概要（英文）：Recently, a small group of slow-cycling cancer cells has been reported to be resistant to anticancer drugs, but the presence of the population in colon cancer is unknown. To prove the existence of slow-cycling cancer stem cells in colon cancer, we introduced induced H2B-EGFP into organoids established from colon cancer patients. We found that H2B-EGFP-positive cells are chemoresistant and that signature genes of H2B-EGFP-positive cells. In vitro system for gene KO was established. Next, we examined the presence of dormant cancer cells in the xenograft tumor. Colon cancer organoids were transplanted into immunodeficient mice, and H2B-EGFP expression was induced for a certain period, followed by administration of Irinotecan. As a result, we found that H2B-EGFP-positive cancer cells remained.

研究分野：がん

キーワード：抗がん剤抵抗性 大腸がん

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

従来の抗がん剤治療は、がん細胞はクローナルな集団であるという前提に基づき、最大許容量の多剤併用療法を行い、可能な限り腫瘍体積を減らす事を目指してきた。近年では、分子生物学の進歩により、がん細胞の増殖や生存を司る遺伝子が次々と発見され、それぞれに対する分子標的薬も登場し、標準治療として用いられている。分子標的薬により腫瘍は劇的に縮小し一定の延命が得られているが、ほとんどの症例は獲得耐性により再発し、根治に至らない事が深刻な問題となっている。実際に、集学的治療の発展にも関わらず、本邦での大腸がん患者の死亡数は増加し続けている。

近年、がん細胞は不均一な集団であり、がん細胞全体の僅か数%程度の細胞が治療抵抗性を持つ事が明らかになってきた。この難治性を規定する少数の細胞群は、細胞周期を休止した幹細胞性を持つ事が慢性骨髄性白血病で報告された。イマチニブ投与により、末梢血から白血病細胞が消失し見かけ上寛解するが、休止型がん幹細胞までは殺傷できず、半数以上の患者が投薬中止と共に再発する。一方、休止型がん幹細胞と抗がん剤抵抗性との関係性が報告されている固形がんは一部に限られており、大腸がんを含む殆どの固形がんでは、休止型がん幹細胞の存在は不明である。

そこで、大腸がんにおける休止型がん幹細胞の存在と治療抵抗性への役割を解明する研究に着手した。実験には、所属研究室で大腸がん手術検体から樹立され、がん幹細胞と分化したがん細胞を安定的に維持できるオルガノイド培養系を使用した。休止型細胞の同定にはヒストン 2B(H2B)-GFP 融合タンパクを用いた。H2B-EGFP を一過的に発現させた細胞は、分裂毎にEGFP が希釈され蛍光強度が低下するため、分裂回数の少ない細胞をEGFP ラベル保持細胞として標識できる。そこで、Doxycycline により発現誘導可能な H2B-EGFP をレンチウイルスにより導入し、一過性に発現させた H2B-EGFP を長期間維持する細胞を同定する事で、休止型細胞と増殖細胞を区別する実験系を考案、構築した。

この誘導型 H2B-EGFP 導入大腸がんオルガノイドに Irinotecan 等の抗がん剤を添加すると休止型細胞の割合が増加した。さらに、休止型細胞は、がん幹細胞マーカーの LGR5 を発現する等のがん幹細胞としての特性を持ち、抗がん剤処理後の再増殖活性が高い事が観察された。

2. 研究の目的

単一細胞レベルの発現解析を行い、休止型がん幹細胞に特徴的な発現プロファイルを明らかにする。次に、休止型がん幹細胞に抗がん剤抵抗性を与える遺伝子を決定する。以上により、大腸がんの抗がん剤抵抗性を改善させる治療法開発の新たな観点として、休止型がん幹細胞が標的となる事を提示する。

3. 研究の方法

(1) 休止型がん幹細胞に特異的に発現する遺伝子群の特定

3×10⁵ 個の大腸がんオルガノイドを 6 穴プレートに播種後、Doxycycline を添加する事で一過的な H2B-EGFP 発現を誘導した。

抗がん剤 (Irinotecan) を添加し 7 日間培養した。EGFP 高発現群と低発現群の単一細胞をフローサイトメトリーにより 1 条件につき 96 個回収した。

幹細胞と増殖細胞に特異的な遺伝子および薬剤標的となる遺伝子を主とした 96 種類の遺伝子のシングルセル qPCR (Biomark HD, Fluidigm) を行った。得られた単一細胞毎の発現データから統計解析ソフトウェア R を用いてクラスタリング解析と主成分分析等の統計解析を実施した。休止型がん幹細胞(LGR5 陽性、EGFP 陽性)の発現プロファイルを取得し、増殖細胞と休止型細胞の比較から特異的な遺伝子群を特定した。また、抗がん剤処理後に残存した

休止型がん幹細胞が非添加のものと同じであるか否かを発現プロファイルの比較により解析した。

(2) 遺伝子ノックアウトの実験系の構築

大腸がんオルガノイドでの遺伝子ノックアウトを効率的に行う手法を確立した。具体的には Cas9 タンパクと該当する候補遺伝子の sgRNA を、電気パルスを用いたエレクトロポレーション法で導入できる方法を確立した。

(3) PDX モデルの作製

大腸がんオルガノイドの PDX 腫瘍内に休止型がん幹細胞が存在するか否かを検討した。誘導型 H2B-EGFP 導入ヒト大腸がんオルガノイド 1×10^4 個を免疫不全 NOG マウス皮下に移植した。移植日から DOX を 7 日間飲水投与した後に、抗がん剤の Irinotecan または PBS を週 2 回腹腔内投与した。計 4 回の腹腔内投与が終了後、皮下腫瘍を摘出し固定した。固定後は組織切片を作製し、免疫染色を実施した。

4. 研究成果

(1) 休止型がん幹細胞の同定

誘導型 H2B-EGFP ヒト大腸がんオルガノイドへ DOX を添加し一過性に H2B-EGFP を発現させた。DOX 除去し、Irinotecan を 7 日間処理した。この誘導型 H2B-EGFP ヒト大腸がんオルガノイドからフローサイトメトリーを用いて EGFP 高発現細胞群と低発現細胞群に分け、それぞれ単一細胞を取得した。シングルセル qPCR 解析を行った結果、H2B-EGFP を高発現する細胞群は、大腸のがん幹細胞マーカーの LGR5 および休止型がん幹細胞で発現すると報告されている遺伝子群を発現していたため、本系において休止型がん幹細胞を同定した。

(2) 遺伝子ノックアウトの実験系の構築

休止型がん幹細胞に特徴的な遺伝子群の中で、どの遺伝子が抗がん剤抵抗性を担っているのかを決定するために、遺伝子ノックアウトの手法を確立した。候補遺伝子の sgRNA と Cas9 タンパクを混合し、同時にエレクトロポレーションを行うと効率良く目的遺伝子をノックアウトする事ができた。

(3) PDX モデルの組織標本の免疫染色

今後、遺伝子をノックアウトした大腸がんオルガノイドを NOG マウスに移植するにあたり、事前にヒト大腸がんオルガノイドの移植腫瘍内に休止型がん細胞が存在するか否かについて検討した。誘導型 H2B-EGFP 導入大腸がんオルガノイドを移植後、休止型細胞をマーキングするために DOX を一定期間飲水投与した。その後に Irinotecan または PBS の腹腔内投与を行った。

得られた移植腫瘍内に休止型細胞が存在するか否かを調べるために、H2B-EGFP 発現がん細胞を認識する抗 GFP 抗体による免疫組織化学染色を実施した。その結果、PBS を投与したがん組織では、H2B-EGFP 陽性がん細胞が散見される程度であったが、Irinotecan を投与した組織では、多数の H2B-EGFP 陽性がん細胞が認められた。

今後は、確立された遺伝子ノックアウト手法を用いて、抗がん剤抵抗遺伝子のノックアウトを行う。さらに、PDX モデルで休止型がん細胞の存在を確認できたので、当モデルを用いて、in vivo での抗がん剤抵抗性に関わる候補遺伝子の絞り込みを行う。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計4件（うち査読付論文 4件/うち国際共著 1件/うちオープンアクセス 1件）

1. 著者名 Kaoru Yamawaki, Yutaro Mori, Hiroaki Sakai, Yusuke Kanda, Daisuke Shiokawa, Haruka Ueda, Tatsuya Ishiguro, Kosuke Yoshihara, Kazunori Nagasaka, Takashi Onda, Tomoyasu Kato, Tadashi Kondo, Takayuki Enomoto, Koji Okamoto	4. 巻 521
2. 論文標題 Integrative analyses of gene expression and chemosensitivity of patient-derived ovarian cancer spheroids link G6PD-driven redox metabolism to cisplatin chemoresistance	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Cancer Letters	6. 最初と最後の頁 29-38
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.canlet.2021.08.018	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 Yusuke Kanda, Hirokazu Ohata, Toshiaki Miyazaki, Hiroaki Sakai, Yutaro Mori, Daisuke Shiokawa, Akira Yokoi, Takashi Owa, Atsushi Ochiai, Koji Okamoto	4. 巻 586
2. 論文標題 NF- B suppression synergizes with E7386, an inhibitor of CBP/ -catenin interaction, to block proliferation of patient-derived colon cancer spheroids	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Biochemical and Biophysical Research Communications	6. 最初と最後の頁 93-99
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.bbrc.2021.11.063	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 Daisuke Shiokawa, Hiroaki Sakai, Hirokazu Ohata, Toshiaki Miyazaki, Yusuke Kanda, Shigeki Sekine, Daichi Narushima, Masahito Hosokawa, Mamoru Kato, Yutaka Suzuki, Haruko Takeyama, Hideki Kambara, Hitoshi Nakagama, Koji Okamoto	4. 巻 80
2. 論文標題 Slow-cycling cancer stem cells regulate progression and chemoresistance in colon cancer	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Cancer Research	6. 最初と最後の頁 4451-4464
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1158/0008-5472.CAN-20-0378	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 Mami Sato, Kunishige Onuma, Mio Domon, Shun Hasegawa, Ami Suzuki, Ryosuke Kusumi, Remi Hino, Nahoko Kakiyama, Yusuke Kanda, Mitsuhiko Osaki, Junichi Hamada, Shiro Bannai, Regina Feederle, Katalin Buday, Jose Pedro Friedmann Angeli, Bettina Proneth, Marcus Conrad, Futoshi Okada, Hideyo Sato	4. 巻 147
2. 論文標題 Loss of the cystine/glutamate antiporter in melanoma abrogates tumor metastasis and markedly increases survival rates of mice	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 International Journal of Cancer	6. 最初と最後の頁 3224-3235
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1002/ijc.33262	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 該当する

〔学会発表〕 計3件（うち招待講演 1件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 神田 裕介、塩川 大介、岡本 康司
2. 発表標題 抗がん剤抵抗性の休止型大腸がん幹細胞を標的とした光免疫療法の構築
3. 学会等名 第79回日本癌学会学術総会（招待講演）
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 森 裕太郎、山脇 芳、石黒 竜也、吉原 弘祐、神田 裕介、塩川 大介、榎本 隆之、岡本 康司
2. 発表標題 凍結がん検体の1 細胞核解析による卵巣明細胞癌の治療抵抗性細胞ネットワークの同定
3. 学会等名 第79回日本癌学会学術総会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 森 裕太郎、岡本 康司、神田 裕介、石黒 竜也、吉原 弘祐、榎本 隆之、山脇 芳、大畑 広和、塩川 大介
2. 発表標題 シングルセル解析と空間的トランスクリプトーム解析による卵巣明細胞腺癌の治療抵抗性ニッチの解明
3. 学会等名 第81回日本癌学会学術集会
4. 発表年 2022年

〔図書〕 計1件

1. 著者名 神田 裕介・塩川 大介・岡本 康司	4. 発行年 2021年
2. 出版社 北隆館	5. 総ページ数 4
3. 書名 Precision Medicine 2021年7月臨時増刊号	

〔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
---------	---------