

令和 4 年 5 月 26 日現在

機関番号：17102

研究種目：若手研究

研究期間：2020～2021

課題番号：20K17621

研究課題名（和文）scRNAseqと腸内細菌叢解析を用いた大腸癌微小環境の発癌に関わる機序の解明

研究課題名（英文）Elucidation of the mechanism by which the colorectal cancer microenvironment is involved in carcinogenesis using scRNAseq and gut microbiota analysis

研究代表者

水内 祐介（MIZUUCHI, Yusuke）

九州大学・大学病院・助教

研究者番号：20849088

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,200,000円

研究成果の概要（和文）：大腸癌患者より糞便採取を行い、データベースを作成した。また、大腸癌を含む50例以上の固形癌でシングルセルRNAライブラリー作成を行い、NGSで解析した。NGS解析後のデータは、Rパッケージ Seuratを用いて、機能に着目したクラスタリング解析、疑似系譜解析、細胞間相互作用の解析等を行った。また、外科切除したヒト膵癌組織を使用し、超免疫不全マウスへの皮下移植を行ったところ、6例の膵癌患者より採取した腫瘍組織片を用いたPDXモデルの樹立が完了した。さらに二次移植を行ったところ、4例の二次移植が可能であった。同様の手法を用いて大腸癌患者のPDXモデル作製を試みたが、樹立には至っていない。

研究成果の学術的意義や社会的意義

大腸癌の発癌メカニズム及び治療抵抗性を腸内細菌叢及び腫瘍微小環境の不均一性という側面から検討することは、大腸癌治療開発において全く新たな切り口でもあり、罹患者及び死亡者の数の多さから特に社会的な要請の強い大腸癌の治療開発に飛躍的な進歩をもたらすと期待される。また、本成果は、scRNAseq解析やMicrobiome解析などNGS解析の膨大なデータを含むもので、そのインパクトは大きく、癌研究だけでなく、生物学や細菌学など学術的にも広範な波及効果が期待される。

研究成果の概要（英文）：Fecal samples were collected from patients with colorectal cancer, and a database was created. At the same time, we collected samples from gastrointestinal cancers, including colorectal cancer, and processed them for single cell analysis. The data after NGS analysis were analyzed using the R package Seurat, focusing on the characteristics and functions of the cell population from the expression of RNA derived from single cells, and the analysis of pseudo genealogical data to determine the direction of differentiation of the cells. We have not yet been able to compare the data with the results of bacterial flora analysis, PDX mouse model, or establishment of colon cancer organoids.

研究分野：医歯薬学

キーワード：scRNAseq 大腸がん 腸内細菌叢 微小環境

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

近年、大腸癌(結腸癌、直腸癌)に対する効果的な薬物療法が創出され、生存率は改善しつつあるが、2017年の大腸癌死亡者数は肺癌に次いで第2位となっており依然予後不良な疾患である。大腸癌を含む消化器癌は腫瘍微小環境中に heterogeneity といわれる高度な不均一性をもっており、その不均一性は、癌細胞だけでなく微小環境を形成する免疫細胞などの間質細胞にも観察される。腫瘍の不均一性が腫瘍の生物像を決定しており、治療抵抗性に関わっていると考えられている。また、最近の研究で腸内細菌叢が大腸癌発癌に関与していることが報告されておりこの Microbiome 自体も非常に不均一な集団であることがわかってきている。このように Microbiome の不均一性と癌微小環境の不均一性を同時に解析し、発癌や治療抵抗性機序への関与を検討した報告はなく、社会的要請度・貢献度・緊急性が高いと考えられた。

2. 研究の目的

Drop-Seq 技術を基盤とした scRNAseq 解析及び Microbiome 解析を用いて大腸癌組織での細菌叢も含めた周囲微小環境の機能的な heterogeneity を明らかにすることで、これまで見出せなかった発癌・治療抵抗性に関わる新規の細胞集団や微小環境中の相互作用を同定する。さらにその機序に基づく新たな治療法の開発につなげ、最終的には大腸癌患者の予後改善を目的とする。

3. 研究の方法

応募者らは H30 年度に、最新の Drop-seq 技術を基盤として開発された 10XGENOMICS 社の Chromium シングルセルコントローラーを購入している。このシステムにより効率的に単一細胞を droplet に封入しその内部で RNA を抽出、細胞(droplet)ごとに特異的な配列をもつオリゴバーコードで標識する。さらにこの標識された RNA は細胞ごとにコードされ、10000 細胞由来の RNA をまとめて 1 回の NGS で解析可能でコストも抑えられる。本研究では、患者由来手術切除標本を用いて上記の解析を行う。まず、初期クラスタリングとして、既知の細胞種別の遺伝子発現データから細胞集団のクラスタリングをおこなう。この初期クラスタリングの後に分類された癌細胞集団の中で deep なクラスタリングをすすめていく。これにより癌細胞集団の中でも EMT の特性が高い細胞集団や増殖能力が高い細胞集団、治療抵抗性の遺伝子プロファイリングを示す細胞集団などこれまでの独自の発現解析データをもとに機能別にクラスタリングしていく。さらには様々な pathway やシグナル、あるいは特徴的な遺伝子発現プロファイルを新たに同定し、それによるクラスタリングを行いこれまでに分類されたことがない機能別の細胞集団を同定し、機能的な heterogeneity を明らかにする。同定された細胞集団の網羅的遺伝子発現プロファイルからその細胞集団のマーカーとなる分子や制御するための標的となりうる分子をリストアップする。また、シングルセル解析で用いた患者由来大腸癌組織を用いて同標本中の細菌を解析する。標本中に含まれる細菌数は少ないことが予測されるため、DNA を 16S rRNA 領域プライマーを用いて PCR 増幅を行った後に、NGS により塩基配列を決定する。アセンブリ、遺伝子予測を行ったうえで、得られた配列断片からそこに含まれる細菌系統組成を明らかにして細菌遺伝子データベースを用いて検索することにより微生物リストを作成する。これによって同一癌組織における腸内細菌叢組成及び免疫細胞をはじめとする癌微小環境を単一細菌、単一細胞レベルで明らかにすることが可能になる。得られた Microbiome 情報をシングルセル解析で得られた遺伝子発現プロファイルと比較検討する。これらの解析により同定した細胞集団をソートして分取するために特定の表面マーカーを複数選択する。その際には Microbiome 解析で得られた結果を重視して、細菌などの微生物と特異的に Interact するような表面マーカーを選択する。これらのマーカーが他の細胞集団に発現がないことを確認後に、実際に手術切除サンプルからのこれら特定の細胞集団の分取を進める。さらに分取した細胞集団のオルガノイドや PDX マウスモデルを作成し、invitro(2D, 3D), in vivo で増殖や、浸潤、転移、癌間質相互作用など様々な細胞特性を検討していく。また免疫反応に関する検討は、APC 遺伝子変異マウスモデルなどの大腸癌自然発生マウスモデルを用いて Microbiome 解析で候補に挙げられた細菌を切除標本から培養してそれらをマウス腸内に移植することによって免疫反応の変化などを検討し、大腸癌の発癌における Microbiome も含めた腫瘍周囲微小環境の関与を明らかにする。

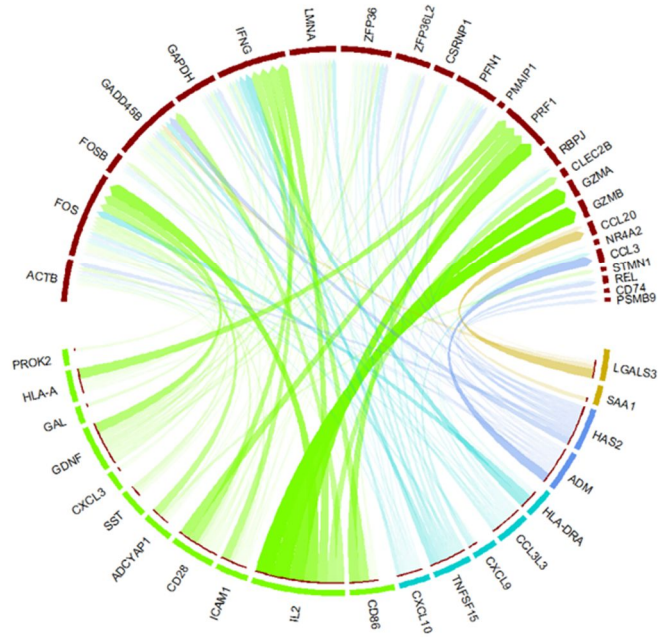
4. 研究成果

大腸癌患者より糞便採取を行い、データベースを作成した。抗菌薬使用などで腸内細菌叢の変化が疑われる患者は除外し、サンプル採取に適正と思われる患者からのみ糞便採取を行っている。また、同時に大腸癌を含む消化器癌より検体採取し、シングルセル解析に必要なサンプル処理を施行した。現在単一細胞懸濁液作成の主義は安定しており、大腸がんを含む消化器がん 50 例以上のサンプル採取・処理および NGS 解析を行った。NGS 解析後のデータは、R パッケージ Seurat を用いて、単一細胞由来の RNA 発現からその細胞集団の特徴や機能に着目した解析、細胞の分化の方向性をみる疑似系譜解析、細胞間相互作用の解析等を行った(下図)。

また、これまで、外科切除したヒト膵癌組織を使用し、超免疫不全マウスへの皮下移植を行ったところ、6 例の膵癌患者より採取した腫瘍組織片を用いた PDX モデルの樹立が完了した。さら

に、二次移植を行ったところ、4例の二次移植が可能であった。以上により PDX モデル作製に関するプロトコル・手法が確立できた。膵癌と同様の手法を用いて、大腸癌患者の PDX モデル作製を試みたが、樹立には至っていない。

大腸癌患者のCD8+Tcellとその他の細胞種の細胞間相互作用の解析結果



5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計2件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 久野恭子、水内祐介、大内田研宙、中村祥一、奥田翔、大坪慶志輝、佐田政史、永吉絹子、寅田信博、進藤幸治、仲田興平、森山大樹、永井俊太郎、中村雅史
2. 発表標題 Single cell RNA sequenceを用いた家族性大腸腺腫症におけるmacrophageのheterogeneityの解明
3. 学会等名 第29回日本消化器関連学会週間（JDDW 2021）
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 久野恭子、水内祐介、大内田研宙、中村祥一、奥田翔、大坪慶志輝、進藤幸治、仲田興平、森山大樹、永井俊太郎、中村雅史
2. 発表標題 scRNA-seqを用いたFAPにおける発がん過程の観察
3. 学会等名 第57回九州外科学会
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
---------	---------