

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：20K17622

研究課題名（和文）遺伝子発現マッピングとメタボロミクスマッピング統合による膵癌組織微小環境の解明

研究課題名（英文）Discovery of pancreatic cancer microenvironments by gene expression mapping and metabolome mapping.

研究代表者

寅田 信博（TORATA, Nobuhiro）

九州大学・大学病院・臨床検査技師

研究者番号：00398075

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）：組織微小環境の解明のため、コンポーネントの1つである癌関連線維芽細胞量と膵癌分化度の関連を調べたところ、ヒト膵癌オルガノイドを用いた実験で、腫瘍分化度が高いほど周囲のCAFが多いことを確認し、微小環境因子を介した癌の増殖に寄与している可能性を示唆する結果を得た。網羅的遺伝子発現解析で、分化度が高いほどmevalonate経路を中心としたcholesterol synthesis関連遺伝子の発現が増加していた。分化度が異なる膵癌オルガノイドにHMG-CoA還元酵素阻害剤であるsimvastatinを投与すると、高分化膵癌オルガノイドにおいて低分化より有意に増殖能が抑制することを確認した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

膵癌は癌の中でもっとも予後不良な癌の一つで、その特徴の一つにdesmoplasiaと呼ばれる豊富な間質増生があり、治療抵抗性や、薬剤送達率低下への関与が明らかにされている。本研究結果は、細胞の相互作用を再現したヒト膵癌オルガノイドを用い、腫瘍微小環境における、腫瘍分化度と癌間質量の関連性を明らかにするだけでなく、cholesterol synthesis関連遺伝子の発現が増加していることを明らかにし、治療ターゲットとしての可能性を見出した点で学術的、社会的意義が高い。

研究成果の概要（英文）：To discover of pancreatic cancer microenvironments, correlation between amount of cancer associated fibroblasts(CAF) and pancreatic cancer cell differentiation are analyzed. Positive correlation between cancer cell differentiation and amount of CAF, in which has a potential of cancer cells proliferation, is detected by using human pancreatic cancer organoid assay. Positive correlation between cancer cell differentiation and expression of cholesterol synthesis related genes, especially mevalonate pathway, is also detected by comprehensive gene expression analysis. Additionally, well differentiate pancreatic organoid indicated significant growth suppression by medication of simvastatin which is an inhibitor of HMG-CoA reductase in comparison with poorly differentiated one.

研究分野：医歯薬学

キーワード：遺伝子発現マッピング メタボロミクスマッピング

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

これまで手術切除標本を用いた研究が数多く行われ、莫大なゲノム解析や RNA や蛋白など網羅的なデータを得ることができているが、その多くでは組織微小環境での位置情報は失われている。現在、腫瘍微小環境やその腫瘍内でのがん細胞だけでなく、免疫細胞やその他の間質細胞の不均一性が、腫瘍の特性や治療抵抗性に深く関連することが注目されてきており、局在データの必要性が高まっている。応募者は、これまでに、乳がん組織を用いて、質量分析イメージング (MALDI-IMS) の手法を用い、腫瘍部において Energy Charge 値が高いことを可視化し論文化している。本研究では、RNA をスライドガラス上で捕捉し、組織中の位置情報を持った遺伝子発現解析を実現する 10XGENOMICS 社の Spatial Transcriptomics 技術を用いて、遺伝子発現マッピングを行い、メタボロミクスマッピングと組み合わせることによって、多面的な膵癌組織微小環境の解明を目指し、その制御による新規治療法の開発を目指す。膵癌は癌の中でもっとも予後不良な疾患の一つであり、5 年生存率はわずか 8% である。唯一の根治治療は外科切除であるが、切除例においても 5 年生存率は 15% に満たず、膵癌に対する有効な新規治療法の開発は、緊急の課題であり、社会的要求度が高い。膵癌組織微小環境の特徴には、desmoplasia と呼ばれる豊富な間質増生があるが、膵星細胞が中心的な役割を果たしており、我々はこれまでに治療抵抗性や、薬剤送達率低下に対する関与について報告している。(Ohuchida, Cancer Research, 2004; Ikenaga, Gastroenterology, 2010; Kozono, Cancer Research, 2013; Endo, Gastroenterology, 2017)。

また、癌間質相互作用は、浸潤能・転移能獲得促進への関与も指摘されており、我々も同様の報告を行っている (Ikenaga N, Gastroenterology, 2010)。癌間質相互作用については、接着因子および液性因子、細胞外基質に関する報告がなされているが、近年、腫瘍間質から放出される乳酸、ピルビン酸、アラニンといった代謝産物が、放出した細胞以外の細胞のエネルギーとして活用されていることを示唆する報告がなされている。(Pavlidis S Cell Cycle 2009, Sousa Nature 2016) 我々も、MALDI-IMS の手法を用い、腫瘍部において正常部よりも ATP、ADP の割合 (Energy Charge 値) が高いことを可視化し、メタボロミクスマッピングの有用性を報告した (Torata N, Anticancer Res, 2018)。一方、生体由来腫瘍サンプルの遺伝子発現解析は、これまで、主に Whole cell lysate が用いられており細胞の位置情報が失われていた。位置情報を補完する方法として、Microdissection や In situ hybridization などがあるが、手技が煩雑で広範囲かつ網羅的な解析は適しておらず、位置情報もった遺伝子発現解析はこれまで困難であった。しかしながら、近年新しく開発された 10XGENOMICS 社の Spatial Transcriptomics 技術によって、遺伝子発現マッピングを得ることができるようになった。

これら 2 つのマッピング技術を組み合わせ、発現遺伝子によって引き起こされる代謝産物同時に可視化することができれば、膵癌組織微小環境解明に多くの新しい知見を与えることが期待できる。

2. 研究の目的

本研究の目的：生体由来サンプル等を用いて遺伝子発現と発現した遺伝子の物質的最終表現型である代謝産物のマッピングを行い、それらに組織像および免疫染色などの情報を統合することによって、遺伝子発現レベルと関連する代謝産物レベルを数細胞の解像度ですり合わせ、その合致・相違などの情報を評価することによって、発現レベル間の矛盾 (例：遺伝子発現レベル的に高い代謝産物レベルを期待するケースで、実際はそうではない場合など) からこれまで説明不可能であった現象の機序を解明し、膵癌組織微小環境における癌間質相互作用の理解を深化し、癌微小環境の制御のためのターゲットを発見し、新たな診断・治療法開発につなげることが本研究の主な目的である。

本研究では、癌細胞だけでなく膵癌組織微小環境に特徴的な desmoplasia 内に存在する特殊な癌細胞集団や膵星細胞や腫瘍関連の免疫細胞などの間質細胞の不均一性をも複数のマッピング技術を組み合わせ視覚的にとらえる。この試みは、応募者の論文発表実績を発展させたもので、遺伝子発現マッピングという新しい技術を積極的に取り入れた実現可能なアイデアであり、独自性が高く、そこから得られるデータはこれまでにないもので創造的であるといえる。また、癌間質はほとんどすべての癌で共通して認められるため、膵癌だけでなく他癌腫にも応用可能であり、癌治療研究全体に大きなインパクトを与える可能性を持っており、広範な学術的波及効果が期待できる。

3. 研究の方法

(1) 代謝産物マッピング/遺伝子発現マッピングによる腫瘍部/正常部/間質部の網羅的解析
膵癌組織の凍結切片を用い、MALDI-IMS の手法で代謝産物のマッピングを行う。腫瘍部、正常部を HE 染色で確認し、それぞれの局在毎にシグナルの抽出を行い、細胞数十個レベルの解像度で有意差のある代謝産物をピックアップする。

遺伝子発現マッピングでは、10XGENOMICS 社の Spatial Transcriptomics 技術による Visium Spatial gene Expression キットを用いて、膵凍結サンプルにて、発現遺伝子マッピングを行う。

得られた画像を、MALDI-IMS と同様の手順でシグナル抽出・比較を行い、10 の個々の細胞集団レベルの解像度でその局在毎に有意差のある発現遺伝子を選択する。

(2) 有意代謝産物発現遺伝子の局在毎の付き合いとデータベースによる機能予測

(1)により、局在毎の細胞集団に応じて絞り込んだ代謝産物および発現遺伝子について、文献および KEGG PATHWAY Database 等で、機能および発現意義を検討し、実際のその局在に存在する癌細胞や免疫細胞など間質細胞の機能やその増殖、浸潤、治療抵抗性といった特性に関わる機序を同定する。また、その機序に関連する因子の発現状態を In situ Hybridization、免疫染色等で確認し、当該代謝産物・遺伝子発現を検証する。

(3) 微小環境モデルを用いた同定代謝産物のおよび関連因子の機能解析

応募者が所属する研究室で独自に確立した微小環境モデル(患者由来オルガノイドと間質細胞からなるモデル)を用いて、上記 1. で絞り込んだ代謝産物について分析を行う。2. で選定した癌の悪性度と直接関連する因子について、遺伝子発現から代謝産物レベルまで明らかにする。絞り込んだ関連分子に対して、RNA 干渉もしくは、阻害剤添加等による発現制御を行い、代謝産物発現量の変化を調べるとともに、増殖・浸潤能など細胞特性との関連について機能的な検討を行う。個別化治療のマーカーとなりうる特徴的な代謝産物、発現遺伝子については、末梢血や尿液を対象とした膀胱癌診断マーカーや治療効果、予後予測指標としての有用性評価を行う。

4. 研究成果

膀胱癌において、腫瘍微小環境のコンポーネントの 1 つである癌関連線維芽細胞量と膀胱癌分化度の関連を調べたところ、ヒト膀胱癌オルガノイドを用いた実験で、腫瘍分化度が高いほど周囲の CAF が多い傾向があり(図 1)、網羅的遺伝子発現解析で、分化度が高いほど mevalonate 経路を中心とした cholesterol synthesis 関連遺伝子の発現が増加していた。分化度が異なる膀胱癌オルガノイドに HMG-CoA 還元酵素阻害剤である simvastatin を投与すると、高分化膀胱癌オルガノイドにおいて低分化より有意に増殖能が抑制することが確認できた(図 2)。

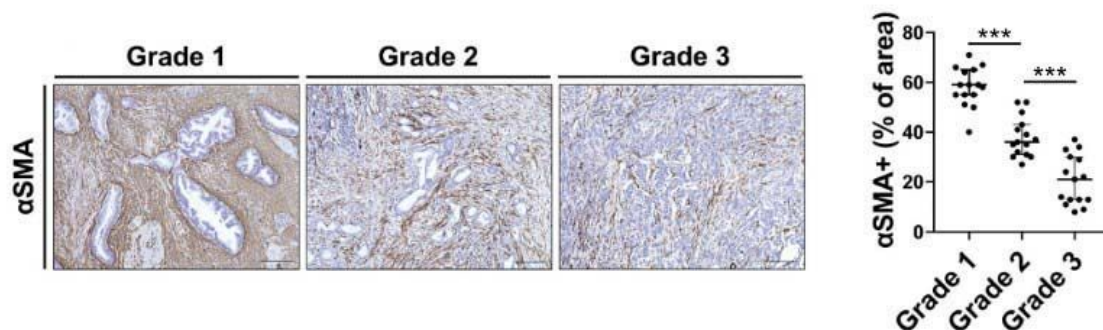


図 1

癌関連線維芽細胞量と膀胱癌分化度の関連

高分化型(Grade1)のほうが、低分化型(Grade3)よりも CAF が多い傾向があった。

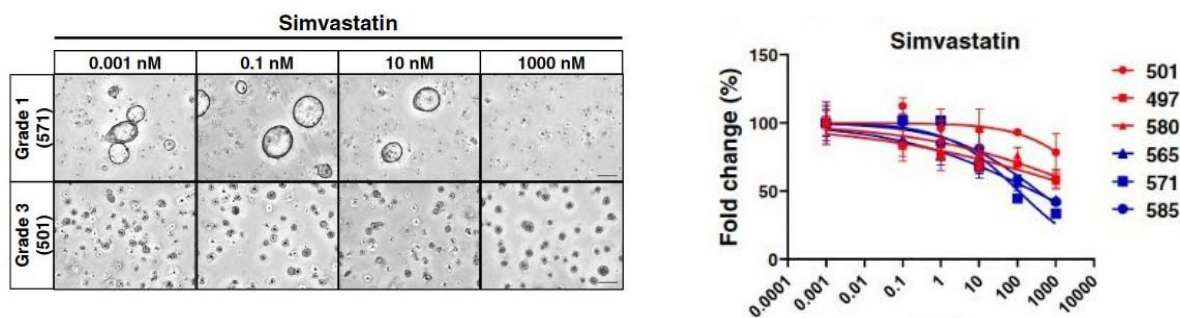


図 2

Simvastatin による膀胱癌オルガノイド増殖抑制効果

HMG-CoA 還元酵素阻害剤である simvastatin を投与すると、高分化膀胱癌オルガノイドにおいて低分化(Grade1)で有意に増殖能が抑制することが確認できた。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計9件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 寅田信博、水内祐介、大内田研宙、久保真、仲田興平、永井俊太郎、三好圭、岡部安博、小田義直、中村雅史
2. 発表標題 正規表現によるパターンマッチを利用した病理レポート癌取扱い規約因子のデータベース登録
3. 学会等名 第121回日本外科学会定期学術集会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 奥田翔、大内田研宙、大坪慶志輝、寅田信博、進藤幸治、森山大樹、水内祐介、仲田興平、永井俊太郎、中村雅史
2. 発表標題 scRNA-seqを用いた食道扁平上皮癌におけるCD8+ T細胞をとりまく免疫微小環境の解明
3. 学会等名 第76回日本消化器外科学会総会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 久野恭子、水内祐介、大内田研宙、奥田翔、大坪慶志輝、寅田信博、永吉絹子、仲田興平、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fibroblastのheterogeneityの解明
3. 学会等名 第76回日本消化器外科学会総会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 中村祥一、大内田研宙、久野恭子、持田郁己、奥田翔、大坪慶志輝、水内祐介、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 シングルセル解析による食道扁平上皮癌内腫瘍浸潤リンパ球の評価
3. 学会等名 第76回日本消化器外科学会総会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 寅田信博、大内田研宙、諸岡健一、永井俊太郎、水内祐介、河田純、小田義直、中村雅史
2. 発表標題 画像認識による未固定大腸癌切除標本中の病変部検出と腫瘍正常識別および深達度予測
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、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 奥田翔、大内田研宙、大坪慶志輝、中村祥一、久野恭子、持田郁己、新川智彦、寅田信博、水内祐介、進藤幸治、森山大樹、仲田興平、中村雅史
2. 発表標題 Single-cell RNA-sequenceを用いた食道扁平上皮癌の免疫環境についての解析
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 中村祥一、大内田研宙、奥田翔、大坪慶志輝、寅田信博、水内祐介、進藤幸治、仲田興平、森山大樹、中村雅史
2. 発表標題 シングルセル解析による食道癌内の腫瘍浸潤マクロファージの食作用の評価
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 堤親範、大内田研宙、中村祥一、奥田翔、久野恭子、大坪慶志輝、寅田信博、進藤幸治、森山大樹、水内祐介、仲田興平、中村雅史
2. 発表標題 Single cell RNA sequenceを用いたpor2胃癌におけるcancer associated fibroblastのheterogeneityの解明
3. 学会等名 第94回日本胃癌学会総会
4. 発表年 2022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
---------	---------