

令和 4 年 6 月 20 日現在

機関番号：24601

研究種目：若手研究

研究期間：2020～2021

課題番号：20K17700

研究課題名（和文）消化器癌進展におけるCBLC発現の包括的解明

研究課題名（英文）Comprehensive elucidation of CBLC expression in gastrointestinal cancer progression

研究代表者

宮尾 晋太郎（Miyao, Shintaro）

奈良県立医科大学・医学部附属病院・研究員

研究者番号：00833708

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）：本研究では、胃癌、食道癌などの消化器癌を対象として、ユビキチン修飾系異常を介した癌の進展機序を包括的解明を目的とする。食道癌細胞株(TE-6, TE-8)における遺伝子発現を確認したところ、細胞株間でもheterogeneityが非常に大きいことが確認された。そのため当初予定していたbulkでの解析から、単一細胞由来の遺伝子発現解析に基づいた機序解明が必要と考えた。既存のsingle cell RNA-seqの工程に、タンパク質分解およびなり、cDNA合成が可能となることが確認できた。

研究成果の学術的意義や社会的意義

当初の目的とは異なる結果となったが、FFPE標本からの微量解析が可能となる兆候が発見されたことは非常に社会的意義のあることと考える。本手法を本格的に検討することで、あらゆる疾患分野で画期的なブレイクスルーが得られる可能性や、従来の固定標本からの検査の精度をさらに上昇させることも可能と考える。

研究成果の概要（英文）：The purpose of this study is to comprehensively elucidate the mechanism of cancer progression mediated by ubiquitin modification system abnormalities in gastrointestinal cancers such as gastric cancer and esophageal cancer. First, esophageal cancer cell lines (TE-6, TE-8) when the gene expression in 8) was confirmed, it was confirmed that the heterogeneity was very large even among the cell lines. Therefore, the mechanism elucidated based on the gene expression analysis derived from a single cell from the originally planned analysis in bulk. It was confirmed that nucleic acid solubilization becomes possible and cDNA synthesis becomes possible by introducing dissociation of methylene cross-linking by proteolysis and heat treatment into the existing single cell RNA-seq process.

研究分野：上部消化器癌

キーワード：食道がん ユビキチン

1. 研究開始当初の背景

近年新規抗癌剤や分子標的治療の開発などにより癌治療は飛躍的な進歩を遂げている。その中において消化器癌においては外科治療が治療の根幹をなしているが、胃癌をはじめとする消化器癌においては切除不能進行症例が存在する。また切除後の再発も一定の割合で存在し、一度再発をきたした場合には治療抵抗性であり、治療限界が存在する。したがってこれらの癌腫の大幅な予後改善のために、あらたな観点からの癌の進展機序を解明と、新規癌治療法の開発が必要不可欠である。

2. 研究の目的

本研究ではこれまで当施設で行ってきたユビキチン系を標的とした研究成果を応用・発展させ、主に胃癌・食道癌を対象とし、臨床検体を用いた研究、RNAを利用した種々の *in vitro* 実験、*in vivo* 実験を行う。今回応募者は、RING finger family に属する Casitas B-lineage lymphoma proto-oncogene C (CBLC) に注目し、CBLC の発現と癌の進展機序ならびに治療抵抗性獲得機序について解明することで、臨床応用可能な画期的な治療法開発、新規バイオマーカー開発し、新規癌治療の基礎を築くことを目的とする。

3. 研究の方法

本研究では、胃癌、食道癌などの消化器癌を対象として、ユビキチン修飾系異常を介した癌の進展機序を包括的に解明し、新規癌治療法としての有用性・安全性を検証し、臨床導入の早期実現を目的とする。まず食道癌細胞株(TE-6, TE-8)における遺伝子発現を確認したところ、細胞集団と単一細胞の間に大きな差が存在し、細胞間のheterogeneityが非常に大きいことが確認された。そのため当初予定していたbulkでの解析から、単一細胞由来の遺伝子発現解析に基づいた機序解明が必要と考えた。細胞株に関しては、親株を限りなく単一クローン由来となるように作出し、同様の手法で化学療法耐性株も準備した。培養細胞だけではなく組織標本における微小領域からの遺伝子発現解析も必要であり、そのライブラリー作成のためのcDNA合成法の確率にも着手した。ホルマリン固定した培養細胞に対しては既存のsingle cell RNA-seqの工程に、クロスリンクされた核酸-タンパク質間のタンパク質分解および熱処理によるmethylene架橋の解離を導入した。

4. 研究成果

まず食道癌細胞株(TE-6, TE-8)における遺伝子発現を確認したところ、細胞集団と単一細胞の間に大きな差が存在し、細胞間のheterogeneityが非常に大きいことが確認された。そのため当初予定していたbulkでの解析から、単一細胞由来の遺伝子発現解析に基づいた機序解明が必要と考えた。細胞株に関しては、親株を限りなく単一クローン由来となるように作出し、同様の手法で化学療法耐性株も準備した。それらを利用してbulkでの次世代シーケンス解析を行ったところ細胞株間や培養実験回によってもCBLCを含めて遺伝子変異のばらつきが非常に大きかった。

応募者の所属する教室では、cDNAの3'末端近傍を次世代シーケンス解析に適用する手法を開発し、単一細胞遺伝子発現解析の定量性や費用対効果を向上させた(SC3-seq法)(NAR, 2015)。この手法はcDNAの一部だけを解析する特性から、RNA分解の影響を受けにくいことが期待される。そのためRNAに影響の大きいFFPE標本に対しても有用な方法と考え、この手法を改変して方法論を構築することとした。そしてホルマリン固定された細胞を可溶化し、RNAからcDNAを合

成するには、従来の方法論にタンパク質分解と脱架橋を最適な条件で併せた。2時間程のホルマリン固定された細胞に対しては、未固定に近いレベルでのcDNA合成が可能であった。

24時間固定の細胞に対しても新手法を用いることでcDNA増幅効率に改善したが、満足なレベルであるとは言えず、house keeping gene以外の発現量が低い遺伝子に関しては定量の精度は低いものであった。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計0件

〔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
---------	---------