

令和 6 年 5 月 31 日現在

機関番号：14401

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2021～2023

課題番号：21K08777

研究課題名(和文) 臨床検体のシングルセル解析による大腸癌幹細胞の代謝機構の解明

研究課題名(英文) Elucidation of metabolic machinery of cancer stem cell by investigating clinical samples with single cell analysis.

研究代表者

板倉 弘明 (Itakura, Hiroaki)

大阪大学・大学院医学系研究科・招へい教員

研究者番号：90850313

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)：癌幹細胞を治療標的とするために、本研究では癌幹細胞の代謝機構に着目した。大腸癌患者由来の正常大腸粘膜、癌組織、PDX、PDX由来スフェロイドを各2サンプルずつRNA seqに提出して解析した。解糖系、酸化的リン酸化、オートファジーなどの代謝関連分子のうち、PDX、スフェロイドで正常粘膜や癌組織と比して有意に亢進または低下している遺伝子を複数同定することができた。また、癌幹細胞を模倣する低代謝細胞の遺伝子プロファイルとステム性が高いPDX由来のスフェロイドの遺伝子プロファイルとを比較して、共通した遺伝子セットを見出すことができ、これらは癌幹細胞における新規の代謝関連遺伝子となる可能性がある。

研究成果の学術的意義や社会的意義

癌幹細胞とは、自己複製能、多分化能、造腫瘍能を有する少数の癌細胞集団で、治療抵抗性を示し再発や転移の原因となるため、癌幹細胞を治療標的とする研究が数多くなされてきた。しかし、大腸癌の癌幹細胞マーカーであるLGR5を標的とした治療は新たな癌幹細胞の新生に繋がるという報告がなされ、その攻略は容易ではない。そこで本研究では、癌幹細胞の代謝機構に着目し、臨床検体の中でも幹細胞性の高い細胞群や、癌幹細胞性の高い低代謝癌幹細胞モデルの解析を通じて複数の癌幹細胞の代謝に関連する候補遺伝子を抽出することができた。これらの成果は、癌幹細胞に対する創薬に繋がる可能性があり、その医学的、社会的意義は大きい。

研究成果の概要(英文)：In this study, we focused on the metabolic machinery of cancer stem cells to overcome them. After intense analyses using normal colonic mucosa, colon tumor tissues, PDX (patient derived xenograft) and spheroids derived from PDX, we identified several up-regulated or down-regulated genes in PDX and spheroid groups. Moreover, through comparison gene expression profile between spheroids and low proteasome activity cells (LPACs) mimicking cancer stem cell properties, we identified several gene sets which may lead to novel strategy to suppress cancer stem cells.

研究分野：医学、消化器外科学

キーワード：癌幹細胞 癌代謝 臨床サンプル

## 様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

### 1. 研究開始当初の背景

癌幹細胞とは、自己複製能、多分化能、造腫瘍能を有する少数の癌細胞集団で、治療抵抗性を示し、再発や転移の原因となるため、癌幹細胞を治療標的とする研究が数多くなされてきた(Reya T et al, Nature 2001)。しかしながら、大腸癌の癌幹細胞マーカーである LGR5 を標的とした治療は新たな癌幹細胞の新生に繋がるという報告がなされ (Shimokawa M et al. Nature 2017)、新たな戦略が必要である。そこで本研究では、癌幹細胞の代謝機構に注目した。

正常組織と比較し、癌組織は血流の不均衡が大きく、糖や酸素などの供給が不足することが多いが、その増殖や分化は迅速かつ多くのエネルギーを必要とする。そのため多くの癌細胞は酸化的リン酸化よりも解糖系により ATP を産生するようになる。一方、癌幹細胞は正常組織における幹細胞と同様、解糖系よりも酸化的リン酸化による ATP 産生が亢進しているとの報告があるが、逆に解糖系が亢進しているという報告もあり、一貫していない (Patricia Sancho, et, al. Brit. J. Cancer 2016)。その原因として、これまでの報告では間質を含まない条件で長期培養された細胞株を用いた報告が大多数であり、既に本来の代謝特性を失った細胞で検討されている可能性がある。さらに、癌幹細胞の絞り込みの方法も研究により様々であり、研究によって異なる細胞集団を捉えている可能性がある。

そこで、本研究では、臨床検体から直接培養した PDX モデルを使用することとした。PDX モデルは間質成分も含んでおり、体内での腫瘍微小環境を再現しているため、微小環境からの影響が大きい代謝機構を評価するのに最も適したモデルの一つであると考えられる。

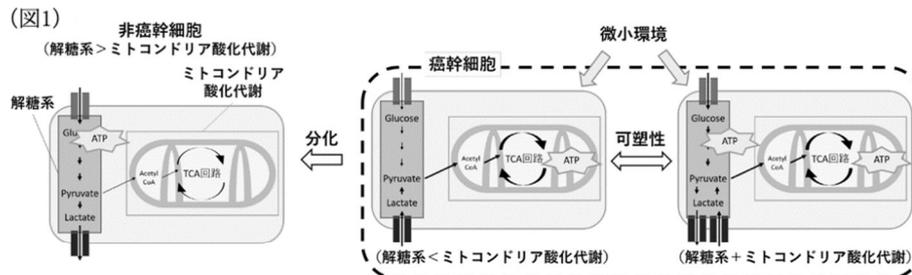
### 2. 研究の目的

患者体内での癌幹細胞の代謝機構を正確に反映させるために PDX モデルを使用し、治療標的となり得る癌幹細胞に特徴的な代謝機構を同定することを目的とした。

### 3. 研究の方法

従来の研究では、主に大腸癌細胞株を用いて癌幹細胞の代謝について検討されてきた。しかしながら解糖系と酸化的リン酸化に注目した研究においては、研究間で結果が一貫していない。その原因の一つとして、癌幹細胞の代謝は腫瘍微小環境により変化する、すなわち可塑性があること、が挙げられる(図1)。つまり、細胞株を用いた研究では、癌幹細胞が患者内で有していた代謝機構が培養環境に合わせて変化しており、さらに継代による新たな遺伝子変異の蓄積も加わり、本来の特徴を反映できていない可能性がある。

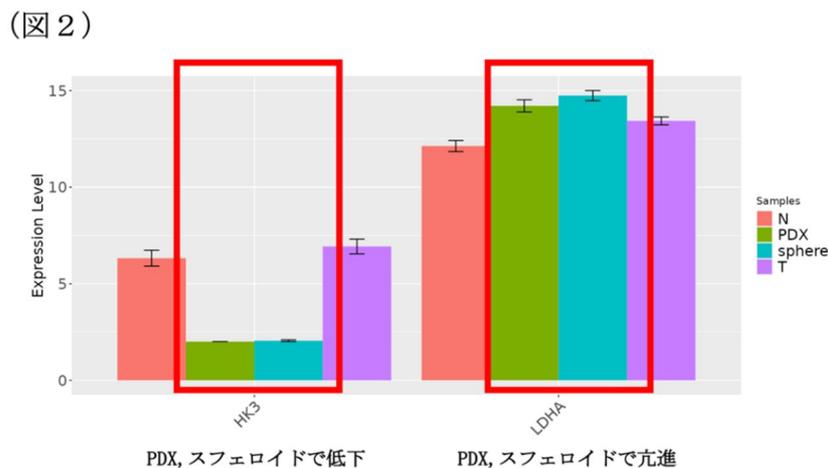
一方、大腸癌の臨床検体から作成した PDX は、間質細胞がマウス由来であるにも関わらず、患者由来の癌細胞から教育を受け代謝の表現型が保たれることが明らかにされた (Arnaud Blomme, et al. Oncogene 2018)。このことから、PDX を用いることで癌幹細胞の本来の代謝的特徴を明らかにできると考えた。さらに、癌幹細胞の絞り込みのため、マウスにできたヒトの腫瘍から安定してスフェロイドを作成することに成功した。大腸癌患者由来の正常大腸粘膜、癌組織、PDX、スフェロイドにおける代謝関連遺伝子の発現様式を RNA-sequence に提出、解析することで比較することで、癌幹細胞における特徴的な代謝機構を明らかにする。



(図1) 癌幹細胞の代謝には可塑性があり、周囲の微小環境により変化する可能性がある。非癌幹細胞では解糖系を中心にATPを産生する(左)。一方、癌幹細胞ではミトコンドリア酸化代謝を中心にATPを産生する(中央)という報告と、解糖系とミトコンドリア酸化代謝の両方でATPを産生する(右)という報告があり、同一の癌腫においても報告に矛盾がある。原因として癌幹細胞の代謝は周囲微小環境により変化するという「可塑性」が報告されている。

#### 4. 研究成果

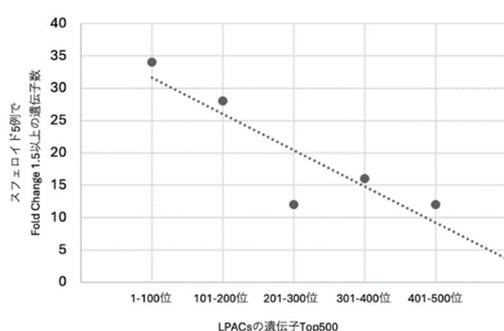
(1) 大腸癌患者由来の正常大腸粘膜、癌組織、PDX、PDX 由来スフェロイドを各2サンプルずつ RNA-seq に提出して解析した。解糖系、酸化的リン酸化、オートファジーなどの代謝関連分子のうち、PDX、スフェロイドで正常粘膜や癌組織と比して有意に亢進または低下している遺伝子として HK3、LDHA などを同定することができた(図2)。今後はそれらの遺伝子が治療対象になるか、セルライン、PDX、スフェロイドを用いて検討する予定である。



(2) 低代謝細胞は癌幹細胞性質を模倣することが数多く報告されている。そこで別の角度から癌幹細胞の代謝に関連する分子群を同定することを試みた。大腸癌細胞株 HCT116 に ODC (ornithine decarboxylase) -Zs green degron を導入・培養して作製した Low proteasome activity cells (LPACs) を FACS にて収集した後に RNA-seq 解析を行い、LPACs における高発現遺伝子 top 500 を得た。一方、大腸癌患者5例から、マウス腫瘍を作製し、そこから培養して得たスフェロイドにおける高発現遺伝子を比較した。小林らの報告ではマウス腫瘍から作製したスフェロイドは癌幹細胞性が4-5倍上昇する (Kobayashi S, et al. Stem Cells; 30(12), 2631-

2644, 2012)。原発巣と比較して、これらのスフェロイドで1.5倍以上増加している遺伝子群をピックアップし、先のLPACsでのtop 500遺伝子と照合した結果、スフェロイドで高発現を示した遺伝子セットは、LPACsで発現上位の遺伝子群において高い割合で存在し、LPACsでの順位が下がるに従いスフェロイド高発現遺伝子は減少した。すなわち、LPACsの1-100位に34個、101-200位に28個、201-300位に16個、301-400位に16個、401-500位に12個のスフェロイド高発現遺伝子が含まれ図3に示すように、強い相関関係を示す結果となった(相関係数-0.88,  $P=1.49 \times 10^{-12}$ )。このことから、LPACの癌細胞性を一層強く支持するものであり、LPACとスフェロイドの両者で共通となる遺伝子群に着目することで、癌幹細胞性の代謝に関わる新規の知見が得られる可能性があり、今後の展開が期待される。

(図3)



(図3)LPACsの発現上位の遺伝子群はスフェロイドで高発現する(対原発 >1.5倍)遺伝子が高頻度にヒットする。

相関係数	p値
-0.8819171	1.49014E-12

(3) シングルセル解析装置 C1 では、解析に用いることのできる細胞数が多くても 500 細胞程度であり、クラスタリングの精度が下がることが問題となり、有用な結果が得られていない。今後はより多くの細胞を一度に解析可能な 10x を用いたシングルセル解析を計画している。すなわち、PDX やスフェロイドから得られるフレッシュなサンプルを用い、10x によるシングルセル解析をする事で、幹細胞性の高いクラスタリングにおける代謝関連遺伝子の発現様式を評価する予定である。

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
研究分担者	奥崎 大介  (Okuzaki Daisuke)  (00346131)	大阪大学・免疫学フロンティア研究センター・特任准教授 (常勤)  (14401)	
研究分担者	山本 浩文  (Yamamoto Hirofumi)  (30322184)	大阪大学・大学院医学系研究科・教授  (14401)	

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