

令和 6 年 5 月 18 日現在

機関番号：32612

研究種目：若手研究

研究期間：2022～2023

課題番号：22K16028

研究課題名（和文）胃がん浸潤における時空間的ダイナミクスの解明

研究課題名（英文）Spatiotemporal Dynamics in Gastric Cancer Invasion

研究代表者

戸ヶ崎 和博（Togasaki, Kazuhiro）

慶應義塾大学・医学部（信濃町）・助教

研究者番号：50936408

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,600,000円

研究成果の概要（和文）：本研究では、患者由来びまん性胃がんオルガノイドのマウスへの同所移植モデルを用いて浸潤を担う腫瘍細胞の機能性と動態について明らかにすることを目的とした。同所移植で形成した腫瘍についてシングルセルmRNAシーケンス解析を実施し、既報において腫瘍浸潤先端部において多く発現が認められることが報告されている遺伝子が高発現するクラスターを同定した。TCGAのコホートデータを用いた生存解析から、このクラスターの細胞が腫瘍の悪性度と関連していることが示唆された。またこのマーカー遺伝子を用いて、in vivoでの細胞の蛍光可視化を行うと、移植後1週間で蛍光細胞が、浸潤先端部に集積するダイナミクスが確認された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

これまでヒト腫瘍の浸潤メカニズムについて、1細胞レベルでの時空間的情報を付加した機能解析を行なった報告はない。本研究で得られる成果は、浸潤というがんの悪性化における初期にして最も重要なステップについての理解を深め、進行がんの根元治療の開発につながると考えられる。

研究成果の概要（英文）：In this study, we aimed to elucidate the functionality and dynamics of tumor cells responsible for invasion using an orthotopic transplantation model of patient-derived diffuse gastric cancer organoids. We performed single-cell mRNA sequencing of orthotopically transplanted tumors and identified clusters with genes previously reported to be highly expressed at invasive fronts. Survival analysis using TCGA cohort data showed that genes in these clusters are associated with poor prognosis. In vivo fluorescence visualization of cells using these marker genes showed dynamics of accumulation of fluorescent cells at invasion fronts one week after transplantation.

研究分野：消化器病学

キーワード：胃がん 浸潤 シングルセル ライブイメージング オルガノイド

1. 研究開始当初の背景

びまん性胃癌は高い浸潤能・播種性を特徴とする極めて悪性度の高い疾患である。外科治療や放射線治療、化学療法の発展により患者の生命予後は改善しつつあるが、根本的な治療法は未だ確立されていない。

びまん性胃癌の特性は高い浸潤能であることから、浸潤のメカニズムを理解することは腫瘍の進行を防ぐ治療開発に肝要である。浸潤のメカニズムに関する研究は、ヒト臨床検体や動物モデルを用いた研究が展開され、腫瘍辺縁には浸潤に寄与する特異的な役割を担う細胞が混在しているとの仮説が立てられている。

このような腫瘍浸潤のメカニズムについての分子遺伝学的な洞察は、これまでヒト臨床検体の組織解析や動物モデルによってなされてきた。しかしながら適切な疾患モデルの欠如のため、ヒトにおける腫瘍浸潤のメカニズムを前向きに検証している研究はなく、その理解は未だ不十分である。

申請者はびまん性胃癌患者からオルガノイドを樹立し、マウス腸管へ移植することで、これまで困難であったびまん性胃癌のヒト疾患モデルを確立した。マウスに移植されたオルガノイドは患者検体に類似した組織を形成した。びまん性胃癌の特徴である印環細胞がんと低分化腺がんで構成される腫瘍内不均一性及び、高い浸潤性が in vivo で忠実に再現された (図1) (Togasaki et al. Gastroenterology 2021)。しかしこの先行研究では、組織内の腫瘍細胞の分子生物学的特性やダイナミクスを捕捉できず、腫瘍浸潤のメカニズムは依然として明らかでない。

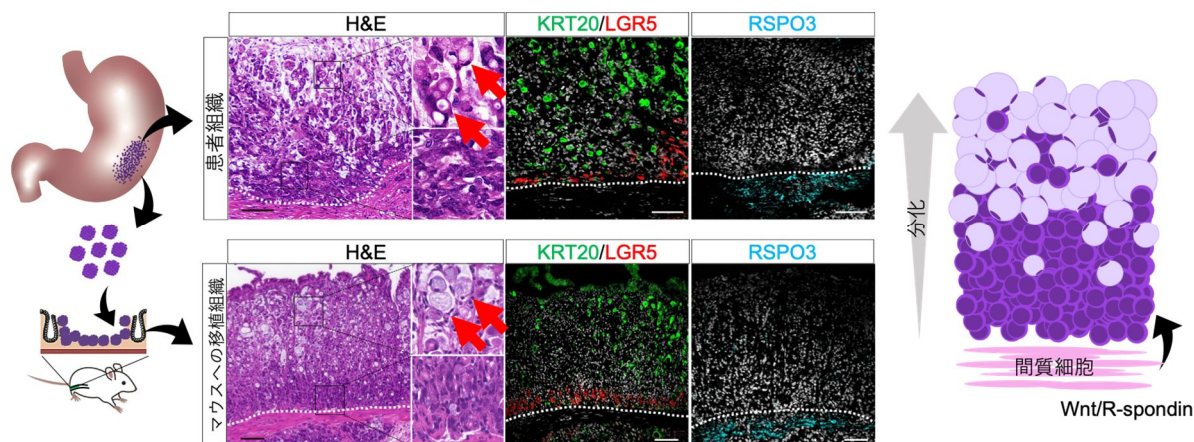


図1: オルガノイドの異種移植技術を利用したびまん性胃癌の浸潤モデル

2. 研究の目的

本研究では、びまん性胃癌において腫瘍浸潤に寄与する特異的な役割を担う細胞が存在するという仮説のもと、びまん性胃癌オルガノイドを用いて、浸潤を担う腫瘍細胞の機能性と動態について明らかにする。

3. 研究の方法

患者由来びまん性胃癌オルガノイドをマウスの胃に同所移植し、浸潤モデルを作成する。移植した腫瘍についてシングルセル mRNA シークエンス解析及び、Visium (10x Genomics) を用いた空間的発現解析を行い、腫瘍浸潤の先端部に位置し、浸潤に寄与すると考えられる集団を同定する。患者組織においてもシングルセル・空間的発現解析を行うことで、上記の仮説がヒト生体内において一般化されることを確認する。

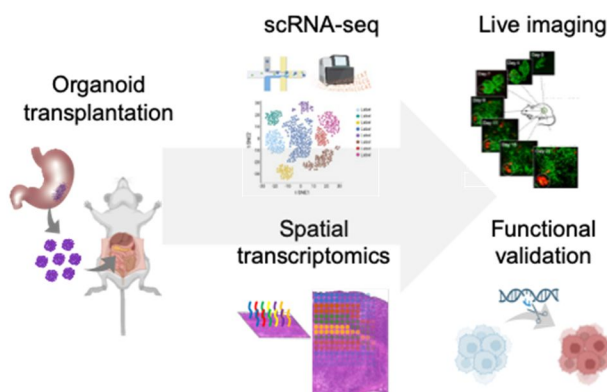


図2: 本研究の概要

また、この集団のマーカー遺伝子で蛍光可視化した腫瘍細胞をリアルタイム in vivo イメージングによって1細胞レベルで動的解析を行い、腫瘍細胞の浸潤における挙動を追跡する。これらの結果から浸潤において機能性を有する遺伝子の候補を選定し、CRISPR/Cas9 システムを用いてノックアウトすることによって、腫瘍浸潤が抑制されるかを前向きに検証し、治療標的となる可能性を探索する (図2)。

4. 研究成果

まず患者由来びまん性胃癌オルガノイド 3 ラインを、遺伝的に均一な状態にクローニングした上でマウスの胃に同所移植し、腫瘍形成を確認した。この腫瘍についてシングルセル mRNA シークエンス解析を実施し、遺伝子異常によらない腫瘍内の heterogeneity を解析した。ヒト及びマウス由来の細胞がシークエンス解析され、ヒト由来の腫瘍細胞のみをフィルタリングした後、サンプル間の heterogeneity を補正し統合した上で、教師なしクラスタリングによって細胞集団を分類した。既報において腫瘍浸潤先端部において多く発現が認められることが報告されている遺伝子が高発現するクラスターを同定した。移植組織および患者検体にて、このクラスターの遺伝子マーカーの免疫染色から、浸潤先端部や tumor budding において、発現が上昇していることが見出され、腫瘍浸潤に寄与している可能性が示唆された。さらに、TCGA のコホートデータを用いた生存解析から、このクラスターに特徴的に発現している遺伝子群は、予後不良因子であることが明らかとなった。このことから、このクラスターの細胞が腫瘍の悪性度と関連していることが示唆された。

次にこのマーカー遺伝子を用いて、細胞の蛍光可視化および遺伝学的系譜解析を行った。蛍光可視化した細胞をマウスの胃壁に移植した後、胃を腹壁まで挙上して生体窓デバイスを取り付け、長波長多光子顕微鏡を用いて移植細胞の動態を経時的に観察した。すると移植直後はびまん性に分布していた蛍光細胞が、移植後 1 週間で浸潤先端部に集積するダイナミクスが確認された。またマーカー遺伝子を蛍光可視化したオルガノイドを利用し、in vitro で浸潤関連マーカーの発現が上昇する条件を同定した。コラーゲンと線維芽細胞を使用した二次元培養アッセイから、浸潤関連マーカーの発現を上昇させる培地にて、in vitro 系で浸潤能が上昇することを見出した。

今後はライブイメージング技術を利用し遺伝学的系譜解析を行い、より詳細なダイナミクスと機能について解析し、新規治療開発への応用を目指す。

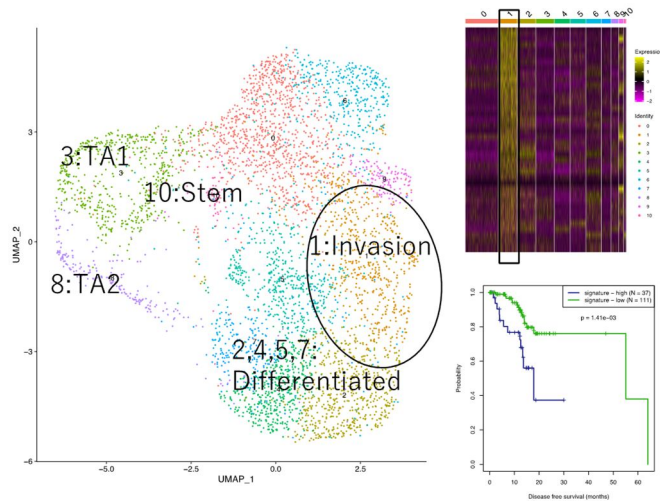


図 3: びまん性胃癌の浸潤モデルのシングルセル発現解析

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計1件（うち査読付論文 1件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 1件）

1. 著者名 Ebisudani Toshiki, Hamamoto Junko, Togasaki Kazuhiro, et al.	4. 巻 42
2. 論文標題 Genotype-phenotype mapping of a patient-derived lung cancer organoid biobank identifies NKX2-1-defined Wnt dependency in lung adenocarcinoma	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 Cell Reports	6. 最初と最後の頁 112212 ~ 112212
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.celrep.2023.112212	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 -

〔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 戸ヶ崎和博、佐藤俊朗、金井隆典
2. 発表標題 びまん性胃がんの腫瘍内不均一性モデルの作成
3. 学会等名 第95回日本胃癌学会総会
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 戸ヶ崎和博、佐藤俊朗
2. 発表標題 ゲノムを超える!生きた癌細胞を使った未来のプレジジョンメディシン 胃がんオルガノイドを用いた腫瘍浸潤モデルの作成
3. 学会等名 日本癌治療学会
4. 発表年 2023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
---------	---------