

令和 6 年 5 月 22 日現在

機関番号：17102

研究種目：若手研究

研究期間：2022～2023

課題番号：22K16447

研究課題名（和文）Dysbiosisと分子異常に着目した大腸de novo発癌の解明と治療への応用

研究課題名（英文）Elucidation of carcinogenesis and application to therapeutics for de novo colon cancer focusing on dysbiosis and molecular abnormalities

研究代表者

田村 公二（TAMURA, Koji）

九州大学・大学病院・助教

研究者番号：90909582

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）：臨床的にde novo癌の確定診断が困難な場合が多く検体の蓄積が進まなかったため、当初の予定通り一旦方向転換しFAP由来大腸癌や炎症性腸疾患（IBD）患者における発癌経路解明へ計画を変更した。すでにmicrobiome解析に提出しているde novo癌、FAP、IBD由来癌サンプルについては、現時点で臨床的因子含めて解析を行っている。FAP患者における発癌過程における、癌微少環境・免疫細胞のシングルセルRNA解析を行い、学会発表および関連論文を報告した（Cancer Lett 2024）。現在、患者糞便・組織検体を用いたmicrobiome解析も進めている。

研究成果の学術的意義や社会的意義

de novo癌、FAP、colitic cancerを含む大腸癌の発癌メカニズム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刷新的であり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解析などマスタータを含むもので、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）：Because of the difficulty in clinically confirming the diagnosis of de novo cancer and the slow accumulation of clinical samples, the initial plan was redirected as scheduled towards elucidating the carcinogenesis pathways in patients with FAP and inflammatory bowel disease (IBD)-derived colorectal cancer. Samples from de novo cancer, FAP, and IBD-derived cancer, for which microbiome analysis has already been submitted, are currently being analyzed, including clinical factors. For single-cell RNA analysis, analysis of the cancer microenvironment and immune cells in the carcinogenesis process in FAP patients was conducted and presented at conferences, with related papers reported in 2024 (Cancer Lett 2024). Currently, microbiome analysis using patient feces and tissue samples is also underway. Further investigation into de novo cancer is ongoing using separate research funds.

研究分野：医歯薬学

キーワード：大腸癌 de novo癌 腸内細菌叢 家族性大腸線種症 炎症性腸疾患

様式 C-19、F-19-1 (共通)

1. 研究開始当初の背景

大腸癌スクリーニング検査の推進や各種画像検査によって早期診断が可能となり、大腸癌の罹患数は年々増え続けるのと同時に、手術手技や手術成績は向上し有効な薬物療法の開発も進んでいる。それでもなお死亡者数は肺癌に次いで第2位で、高い致死率を示している。いわゆる adenoma-carcinoma sequence (ACS) における腺腫が大腸癌早期発見・治療の標的病変となり、大腸癌患者数の減少が期待されたが、正常大腸から直接発生する陥凹型の de novo 癌の存在が明らかとなり、早期発見が困難で悪性度も高いことが分かってきた。これら de novo 癌については様々な研究がなされ、若年発症で組織学的悪性度が高く右側結腸に多く KRAS 野生型が多い、などの特徴を持つが、その発癌・進展様式は未だ解明されていない。最近の癌研究では、大腸癌をはじめとする消化器癌において腸内細菌叢の組成が発癌に関与するという報告が散見される。しかしながら、現在まで de novo 大腸癌患者に着目して microbiome を解析・検討した報告はない。腸内細菌叢は癌細胞同様に、それ自体の不均一性が高い集団であることもよく知られている。癌微小環境である線維芽細胞や免疫、炎症細胞においても不均一性を認めており、当研究室では癌微小環境に着目してこれまで様々な研究・報告をしてきた。腸内細菌叢のみならず癌とその微小環境における microbiome が ACS 経路の大腸癌とどのように異なり、さらにはその発癌や進展にどのように関与しているかを明らかにすることで、特定の microbiome を標的とした治療法の開発や発癌自体の予防につながると考えた。

2. 研究の目的

本研究は、腸内細菌叢だけでなく de novo 大腸癌の発癌や進展様式、さらには浸潤・転移に関わる腫瘍内や微小環境の microbiome を網羅的に解析し、新たな治療法の開発や発癌予防法の解明につなげることを目的とした。de novo 発癌メカニズム解明にあたり、腸内環境のみならず、癌腫自体と癌微小環境における microbiome、さらにはその不均一性に着目する。de novo 大腸癌発癌経路の解明によって、新規治療薬の開発さらには発癌の予防を最終的な目標とした。

* 研究開始にあたり、臨床的に de novo 癌の確定診断が困難な場合が多く検体の蓄積が進まなかったため、当初の予定通り一旦方向転換し FAP 由来大腸癌や潰瘍性大腸炎 (UC) 患者における発癌経路解明へまずは計画を変更した。

3. 研究の方法

A. 患者由来消化器癌組織の Drop-seq 技術によるシングルセル発現解析

10XGENOMICS 社の Chromium シングルセルコントローラーを使用した。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解析を行った。この解析では腫瘍組織を十分に single cell まで分離することが重要である。Single cell 浮遊液とした検体は、随時 Chromium single cell コントローラーを用いて単一細胞ごとにコードされた RNA として抽出し、NGS 解析を行う。材料となる組織は、切除直後の新鮮組織を用いる。

B. シングルセル発現解析による新たな細胞集団の機能的分類の構築

上述の解析で得られたデータをもとに細胞集団をクラスタリングする。癌微小環境中には上皮系の癌細胞集団だけでなく、間葉系の線維芽細胞集団さらにはリンパ管/血管内皮細胞、各種免疫細胞など複数の細胞集団が存在する。初期クラスタリングとして、遺伝子発現データからこれらの細胞集団のクラスタリングを行う。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進める。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た。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なかった機能別の細胞集団を同定し、機能的な heterogeneity を明らかにすることにした。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。

C. シングルセル網羅的発現解析により同定された細胞集団の機能的解析

上記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。これらのマーカーが他の細胞集団に発現し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、in vitro(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する。

D. 患者由来癌組織および背景正常組織中の細菌叢の microbiome 解析

ヒトの切除大腸癌組織や転移巣(リンパ節・肝・肺・播種巣など)切除組織を用いて、細菌叢

解析を行う。抽出した gDNA を 16s rRNA 領域プライマーを用いて PCR 増幅後、次世代シーケンサー (NGS) および解析ソフトを用いて塩基配列を決定する。ゲノムアセンブリ、遺伝子予測を行い、細菌系統組成を明らかにして公開されている細菌遺伝子データベースを用いて検索することで、微生物リストの作成を試みる。その結果、発癌や進展、転移や播種に関わる microbiome の候補を同定する。

腸内細菌叢だけでなく癌自体や癌微小環境における microbiome、さらにはその不均一性 (heterogeneity) が発癌・進展や治療抵抗性などに関与している可能性がある。発癌メカニズム解明にあたり、腸内細菌叢のみならず、癌腫自体と癌微小環境における microbiome、さらにはその不均一性に着目する。

4. 研究成果

* 上記研究計画・研究方法のうちまだ未着手の部分もあり、今後も継続予定である。

A. FAP 由来癌

FAP 由来大腸癌に対し手術を行った 4 人の患者の正常部、腺腫部、癌部より 13 検体採取し、scRNA-seq を施行した(図 1)。

クラスタリングの結果、腺腫部、癌部と発癌が進行するに従って、myeloid cell の割合が増加した。癌部で stromal cell の割合が増加していた。Myeloid cell においては 7 個のサブクラスターが得られ、PMN-MDSC の割合は腺腫部でわずかに、癌部で著明に増加していた。詳細は論文報告済であるが、Fibroblast (図 2)、Tcell についても詳細に検討した。腺腫において MDSC や Treg が増加はしており、発癌前段階から免疫回避が始まっている可能性が示唆された。

通常型大腸癌との比較も行った。FAP 由来大腸癌の免疫抑制的微小環境は、より MDSC や fibroblast に依存していることが明らかとなった。FAP 由来癌の微小環境では、各細胞型の組成と機能に差異があることが、散発性大腸癌の微小環境と比較して明らかになった。

また、FAP 由来大腸癌と通常型大腸癌では、微小環境の構成が異なっており、違いの一部に APC 遺伝子の生殖細胞系列変異が関与している可能性がある (Cancer Lett, 2024)。現在、患者糞便・組織検体を用いた microbiome 解析も進めている

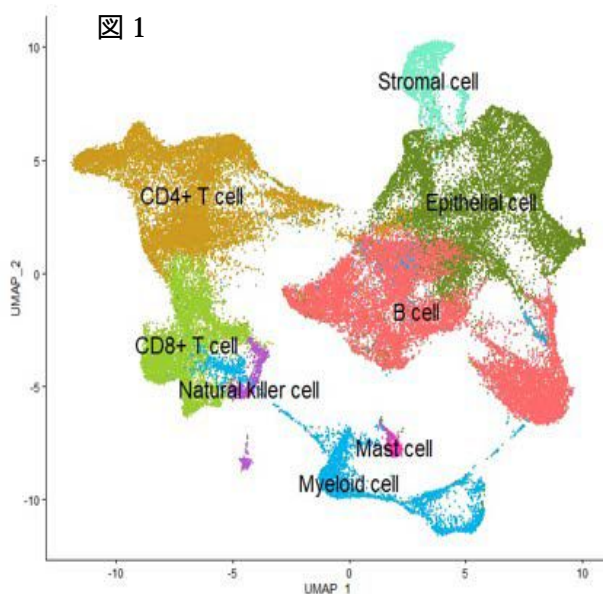


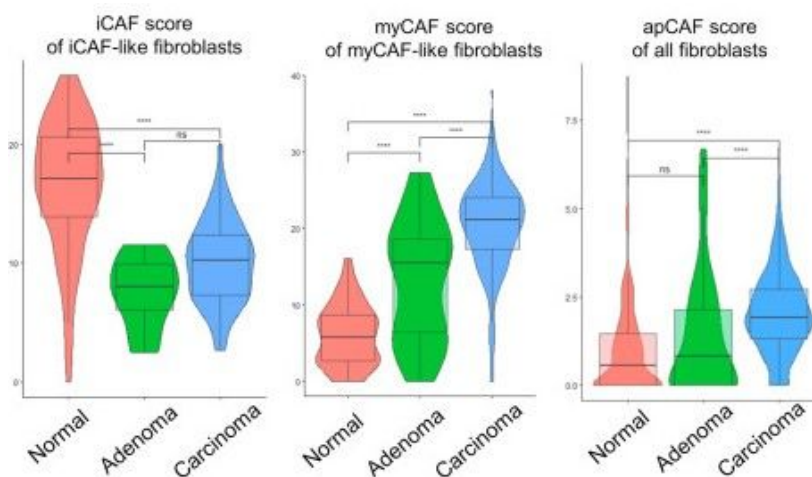
図 2

B. UC 由来癌

UC 由来大腸癌に対し大腸全摘術を行った患者の正常部、炎症部、高度異形成部、癌部の 4 箇所より検体採取し、scRNA-seq を施行した。14936 個の細胞の遺伝子発現データが得られ、クラスタリングにより 19 個の細胞集団が同定された。既

知のマーカー遺伝子を用いて cell type を同定した。腫瘍微小環境のうち特に fibroblast に着目し、fibroblast 408 細胞を抽出した。

今後、過去に報告のある myCAF、iCAF、apCAF 関連遺伝子をスコア化し、検体採取部位別に比較する。また、それらを public data を用いて通常型大腸癌と比較していく予定である。



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 0件）

1. 著者名 Hisano Kyoko, Mizuuchi Yusuke, Ohuchida Kenoki, Kawata Jun, Torata Nobuhiro, Zhang Jinghui, Katayama Naoki, Tsutsumi Chikanori, Nakamura Shoichi, Okuda Sho, Otsubo Yoshiki, Tamura Koji, Nagayoshi Kinuko, Ikenaga Naoki, Shindo Koji, Nakata Kohei, Oda Yoshinao, Nakamura Masafumi	4. 巻 589
2. 論文標題 Microenvironmental changes in familial adenomatous polyposis during colorectal cancer carcinogenesis	5. 発行年 2024年
3. 雑誌名 Cancer Letters	6. 最初と最後の頁 216822
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.canlet.2024.216822	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

〔学会発表〕 計3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、孫起和、片山直樹、堤親範、寅田信博、藤本崇聡、田村公二、永吉絹子、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各発癌段階のmyeloid cellの比較
3. 学会等名 第44回癌免疫外科研究会
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 久野恭子、水内祐介、大内田研宙、片山直樹、堤親範、中村祥一、奥田翔、大坪慶志輝、寅田信博、佐田政史、田村公二、永吉絹子、中村雅史
2. 発表標題 FAP発癌過程におけるTregの免疫抑制能の変化
3. 学会等名 第123回日本外科学会定期学術学会
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 久野恭子、水内祐介、大内田研宙、堤親範、中村祥一、奥田翔、大坪慶志輝、寅田信博、佐田政史、田村公二、永吉絹子、進藤幸治、仲田興平、森山大樹、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各発がん段階のCD4+ Tcellの比較
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 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
研究協力者	久野 恭子 (HISANO Kyoko)		

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
---------	---------