

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 6 月 16 日現在

機関番号：82606

研究種目：基盤研究(B) (一般)

研究期間：2014～2016

課題番号：26293073

研究課題名(和文) シングルセル発現解析による難治がんの抗がん剤耐性メカニズムの解明

研究課題名(英文) Elucidation of chemoresistance of refractory cancer by single-cell gene expression analyses

研究代表者

岡本 康司 (Okamoto, Koji)

国立研究開発法人国立がん研究センター・その他部局等・その他

研究者番号：80342913

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 11,400,000円

研究成果の概要(和文)：がんの治療抵抗性はがんを構成する一部の細胞により担われると考えられるため、がん組織の多様性を理解する事はがんの治療抵抗性を克服する上で重要な問題である。そこで、インビトロで培養した大腸がん幹細胞のマウス移植によりがん組織を再構成し、形成した腫瘍のシングルセル発現解析により、がん組織の多様性解明を試みた。移植腫瘍の担がんマウスの抗がん剤治療前後において、シングルセル解析を行うことにより、Lgr5幹細胞マーカー陽性の治療抵抗性と相関する細胞群を同定した。さらに同様のシングルセル解析を大腸炎症発がんモデルで行い、発がんに伴い発生する造腫瘍性を有する幹細胞集団を同定した。

研究成果の概要(英文)：It is likely that cancer chemoresistance is attributed to a subset of chemoresistant cells in cancer tissues. Therefore, it will be important to understand cancer heterogeneity to overcome cancer chemoresistance and cure refractory cancer. We aimed to elucidate cancer heterogeneity by examining mouse xenograft tumors derived from in-vitro cultivated human colon cancer stem cells. By performing single-cell gene expression analyses of the tumors, we demonstrated that a subset of Lgr5-positive stem-like cells are associated with chemoresistance. We also performed single-cell analyses in a mouse model of colon carcinogenesis and identified a stem cell group that is responsible for tumorigenicity of colon tumors.

研究分野：分子腫瘍学

キーワード：癌

### 1. 研究開始当初の背景

研究代表者らのグループでは、近年ヒト難治固形がん(大腸がん、卵巣がん)の手術検体より、無血清培地を用いたスフェロイド培養法により、がん幹細胞の特質を有する細胞の樹立に成功している。申請者らが樹立したヒトがん幹細胞は、免疫不全マウスに皮下移植する事により、原発がんと同様の病理像を呈する腫瘍を、再現性よく再構成する事ができる。このようにして樹立した担がんマウスの各種抗がん剤処理を行った所、移植腫瘍の抗がん剤感受性は大きく異なり、スフェロイドが由来した原発腫瘍の抗がん剤感受性を反映している事が示唆されている。従って、抗がん剤に抵抗性を示す移植腫瘍に特有な遺伝子発現プロファイルの解析を行えば、抗がん剤抵抗性を担う遺伝子群を明らかにする事ができるはずであると考えられる。

しかしながら、腫瘍の抗がん剤抵抗性の解析を行う上で、組織多様性の問題が大きく立ちまわると危惧される。つまり、実際の腫瘍組織はがん細胞株と違い、多様な細胞から成り立っており、抗がん剤に対する抵抗性も各構成細胞により違いがある。とりわけ最近の研究により、がん組織中で幹細胞性を有した細胞が、がんの造腫瘍性の根源であり、しかも高い治療抵抗性を示す事が提唱されているが、そのような治療抵抗性「がん幹細胞」は多くの場合、腫瘍組織の一部を構成するにすぎない。従って、腫瘍全体を発現解析に用いた場合、治療抵抗性細胞の発現プロファイルは明らかにする事は困難を伴うと予想される。そこで、移植腫瘍組織の細胞多様性を明らかにし、腫瘍組織中の抗がん剤抵抗性細胞の特質を抽出する方法論が必要である。

最近、ヘテロな細胞集団を個々の細胞に分離し、単一細胞レベルでの多遺伝子発現解析を行なう試みが、米国の研究者を中心として、さかんになりつつある。その理由は、先述した「がん幹細胞」の場合と同様に、多くの生物学的現象においては、組織を構成する細胞中でわずかな割合を占める細胞が重要な役割を果たしているからである(例えば、免疫系で特異的な機能を果たす細胞群、発生段階における幹細胞、発がん過程やiPS細胞の発生における形質転換など)。従来の生化学的な解析方法、すなわち細胞集団をプールして解析する方法では、真に解析したい細胞の振る舞いは、他の細胞の平均値の中に埋没してしまい、捉えることができない。このような問題を解決する為の既存の方法論として、免疫組織学的手法又はフローサイトメトリーによる解析があるが、その場合可能なのはせいぜい数個の関連因子の半定量的な解析であり、細胞の生物学的特性を詳細に解析するのは困難であった。そこで、そのような集団中のごく微量に存在する細胞群の特性を解析するために、各細胞の多遺伝子発現解析を行なう手法の開発が必須である。

このような背景のもと、発生学や免疫学

においてシングルセル発現解析を用いた研究が続々報告されており、この分野は急速な発展をとげつつある。

### 2. 研究の目的

本研究は、研究代表者らが樹立した難治がん移植腫瘍の解析にシングルセル遺伝子解析法を応用し、難治がんの組織多様性を明らかにし、それを元に細胞の抗がん剤治療抵抗性を与える遺伝子群を解明する事を目的としたものである。このような方法により、治療標的となりうる分子の検索を行なう事を通じて、抗がん剤抵抗性細胞の撲滅に向けた研究の礎となる事を期待する。さらに、シングルセル発現解析法を用いて、難治固形がんの組織多様性を明らかにし、抗がん剤治療抵抗性細胞の特性解明をめざす。

### 3. 研究の方法

(1) マウス移植腫瘍由来の細胞のフローサイトメトリーによる単離を行う。国立がん研究センター中央病院の大腸外科、婦人腫瘍科、及び病理科の協力により、ヒト大腸がん、漿液性卵巣がん症例より、がん部組織を摘出し、これらの組織より、スフェロイド形成法によるがん幹細胞の *in vitro* 培養法を確立しているが(Ohata et al, Cancer Res, 2012)、これらの方法を用い、抗がん剤に感受性、及び抵抗性を示すそれぞれの症例より、がん幹細胞の培養系を確立する。このようにして樹立したヒト難治がん幹細胞を免疫不全マウス(NOG マウス)に皮下移植を行なうと、原発がんと同様の病理像を呈する移植腫瘍を形成する。移植に使用するがん幹細胞には、レンチウイルスベクターを用いて、マウス由来の細胞をヒトがん細胞から区別する目的で GFP 遺伝子が、抗がん剤の効果判定を目的として luciferase 遺伝子が、あらかじめ導入してある。それぞれのマウス移植腫瘍を摘出し、酵素処理等により、単一細胞に分離した後、GFP 陽性の各腫瘍細胞は、フローサイトメトリーにより、細胞ごとに 96 well plate に回収する(FacsAria、Becton Dickinson)。

(2) 移植腫瘍細胞のシングルセル遺伝子発現解析を行う。上述の方法論により単離された各細胞において、幹細胞及び分化細胞(enterocyte、goblet cells等)に特異的発現を示す遺伝子群を中心とした、48 遺伝子の定量 PCR を行う(Biomark HD、Fluidigm)。数百個の単離細胞より、RT-qPCR を行い、それぞれの単離細胞の発現プロファイルの Heat map を作製する。作製した Heat map の統計解析、及び主成分解析により、解析した細胞のクラスタリングを行う。抗がん剤に抵抗性、感受性腫瘍のクラスタリングを比較する事により、抵抗性腫瘍に特有な細胞群を同定できれば、抗がん剤抵抗性の根源である細胞群である可能性は高いと期待された。

(3) 担がんマウスの抗がん剤投与による生

存腫瘍細胞の特性解析を行う。上述の抗がん剤抵抗性腫瘍担がんマウスに対し、Irinotecan, oxaliplatin, 5-FU(大腸がん)又は Paclitaxel, Cisplatin(卵巣がん)の腹腔内投与による抗がん剤治療を行う。動物実験、とりわけ担がんマウスの抗がん剤治療に関しては、連携研究者である当研究所の中釜研究所長の助言のもと行う。治療効果の判定を目的として、Luciferin 腹腔内注入後の腫瘍内 luciferase 活性定量により、腫瘍の縮小度は非侵襲的に定量化される。治療抵抗性症例由来の移植腫瘍は、抵抗性細胞が残存する事が予想されるが、このような抵抗性腫瘍の治療前後において、シングルセル遺伝子発現解析を行い、治療抵抗性細胞が治療前のどのクラスターに相当するか明らかにする。とりわけ、治療抵抗性細胞群が、感受性腫瘍に存在しない細胞群であれば、これらの細胞が、治療抵抗性を担う細胞である可能性がより高いと考えられる。

(4) 抗がん剤抵抗性細胞に特徴的な遺伝子群の同定を行う。そのために、まず抗がん剤抵抗性と関連する遺伝子群の探索を行う。まず、抗がん剤投与前の多様な細胞群と抗がん剤抵抗性細胞の発現パターンを比較して、抵抗性細胞の遺伝子発現 signature を解明する。解析法としては、各細胞の遺伝子発現データを標準化し、主成分分析、系統樹分析を行って、各細胞の分類および多様度の評価を行う。抗がん剤による淘汰の前後で遺伝子発現量を比べ、統計的に有意に変化のあった遺伝子を同定する。さらに、これらの抗がん剤抵抗性遺伝子が、感受性腫瘍の各細胞群では上昇が見られない事を検証する。このような方法論により、抗がん剤耐性に重要な遺伝子として、抗がん剤による淘汰の前後で発現変化のあった遺伝子および遺伝子パスウェイを明らかにする。

(5) 抗がん剤抵抗性遺伝子のノックダウンによる機能的解析を行う。上述の実験結果に基づき、抗がん剤抵抗性に対する治療標的となりうる分子の検索を行なう。抗がん剤耐性に重要と考えられる遺伝子の shRNA をレンチウイルスベクターを用いて、抗がん剤抵抗性腫瘍由来のがん幹細胞に導入する。これらの候補遺伝子を抑制したがん幹細胞を免疫不全マウスに移植し、担がんマウスの抗がん剤治療により、抗がん剤に対する感受性が亢進しているか検討する。shRNA による遺伝子抑制実験を各候補遺伝子に対し行い、抗がん剤に対する抵抗性を与える遺伝子を同定する。同定遺伝子産物の機能抑制に働く化合物がマウスに投与可能な場合は、これらの薬剤処理と抗がん剤の併用により、難治がん抑制の相乗効果が得られるか、検討する。これらの実験により、治療抵抗性難治がんの新たな治療戦略の礎とする。

#### 4. 研究成果

(1) In vitro 培養がん幹細胞のマウス移植

腫瘍を対象とし、シングルセル遺伝子発現解析を行う事により、腫瘍を構成する細胞群に細分した。Irinotecan 治療抵抗性腫瘍にのみ存在する細胞、及び抗がん剤投与後に残存する細胞を解析する事により、治療抵抗性と関連する Lgr5 陽性の細胞群を同定し、そのような細胞群に特徴的な遺伝子発現プロファイルを明らかにした。

(2) 上述した解析に合わせて、最近我々が他グループの共同研究でその効能を示した TNIK 阻害剤 (Masuda et al, Nature Comm, 2016) に関しても同様なシングルセル解析が進行中である。

(3) ApcMin マウスを用いた炎症大腸発がんモデルにおいてシングルセル解析を行い、発がんに伴い発生する幹細胞集団を同定した。さらにこれらの細胞集団が造腫瘍性を有する事、これらの細胞において、一群の Wnt ターゲット遺伝子の選択的な発現上昇が起きている事、これらの遺伝子の中で、Tcf1 の long isoform ががん幹細胞としての特異性を決定する事を示した (Shiokawa et al, Cell Reports, 2017)。

#### 5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文](計5件)

1. Tumor-derived spheroids: Relevance to cancer stem cells and clinical applications. Ishiguro T, Ohata H, Sato A, Yamawaki K, Enomoto T, Okamoto K. Cancer Sci. doi: 10.1111/cas.13155. (2017) 査読有
2. 月刊「細胞」3月号特集：がん幹細胞の鍵シグナル、「卵巣がん幹細胞の鍵シグナル」岡本康司:(ニューサイエンス社) 49(3), 108-111 (2017) 査読無
3. Establishment and characterization of an *in vitro* model of ovarian cancer stem-like cells with an enhanced proliferative capacity. Ishiguro T, Sato A, Ohata H, Ikarashi Y, Takahashi R, Ochiya T, Yoshida M, Tsuda H, Onda T, Kato T, Kasamatsu T, Enomoto T, Tanaka K, Nakagama H, Okamoto K. Cancer Res. 76, 150-160 doi: 10.1158/0008-5472.CAN-15-0361 (2016) 査読有
4. TNIK inhibition abrogates colorectal cancer stemness. Masuda M, Uno Y, Ohbayashi N, Ohata H, Mimata A, Kukimoto-Niino M, Moriyama H, Kashimoto S, Inoue T, Goto N, Okamoto K, Shirouzu M, Sawa M, Yamada T. Nature Commun. 7, 12586, DOI: 10.1038/ncomms12586 (2016) 査読有
5. 日本臨床 第73巻第5号(平成27年5月号)特集:がん幹細胞、「がん根治への道程」、

861-865、岡本康司、中釜齊 (2015) 査読無

〔学会発表〕(計8件)

- 1.岡本康司、スフェロイド形成による難治がん由来がん幹細胞の培養と特性解析、第39回日本分子生物学会年会シンポジウム、2016/12/2、パシフィコ横浜(横浜)
- 2.大畑 広和、塩川 大介、岡本 康司、NADPH oxidase と mTOR Complex 1 のフィードバックループ制御は大腸がん幹細胞性の維持に寄与する、第75回日本癌学会、2016/11/6、パシフィコ横浜(横浜)
- 3.塩川 大介、大畑 広和、岡本 康司、シングルセル遺伝子発現解析により示された Lgr5 陽性大腸がん幹細胞の多様性と Wnt ターゲット遺伝子の発現変化、第75回日本癌学会、016/11/6、パシフィコ横浜(横浜)
- 4.岡本康司、ヒトがん幹細胞の *invitro* 培養系を用いたがん転移制御機構の解析、第4回がん代謝研究会、2016/7/7、鹿児島県民交流センター(鹿児島)
- 5.塩川 大介、大畑 広和、岡本 康司、単一細胞レベルの遺伝子発現解析により示された Lgr5 陽性大腸がん幹細胞の多様性、平成27年度「個体レベルでのがん研究支援活動」ワークショップ、2016/2/4、琵琶湖ホテル(大津市)
- 6.岡本康司、単一細胞レベルの遺伝子発現解析による大腸がんの造腫瘍性細胞群及び治療抵抗性細胞群の同定、第38回日本分子生物学会年会、2015/12/1、神戸ポートアイランド(神戸)
- 7.大畑 広和、塩川 大介、岡本 康司、NADPH oxidase activates mTORC1 and maintains the properties of colon cancer stem cells、第74回日本癌学会、2015/10/8、名古屋国際会議場(名古屋)
- 8.岡本康司、単一細胞レベルの発現解析による難治性固形がんの発がんメカニズムの解析、第37回日本分子生物学会年会シンポジウム、2016/12/2、パシフィコ横浜(横浜)

〔図書〕(計0件)

〔産業財産権〕

出願状況(計0件)

名称：  
発明者：  
権利者：  
種類：  
番号：  
出願年月日：  
国内外の別：

取得状況(計0件)

名称：  
発明者：

権利者：  
種類：  
番号：  
取得年月日：  
国内外の別：

〔その他〕  
ホームページ等  
<http://www.nccri.ncc.go.jp/s007/>

6. 研究組織

(1)研究代表者

岡本 康司 (OKAMOTO, Koji)  
国立がん研究センター研究所・がん分化制御解析分野・分野長  
研究者番号：80342913

(3)連携研究者

中釜 齊 (NAKAGAMA, Hitoshi)  
国立がん研究センター・理事長  
研究者番号：30198030

加藤 護 (KATO, Mamoru)  
国立がん研究センター研究所・基盤的臨床開発研究コアセンター・バイオインフォマティクス部門・部門長  
研究者番号：40391916