

令和 元年 8 月 30 日現在

機関番号：22701

研究種目：国際共同研究加速基金（国際共同研究強化）

研究期間：2016～2018

課題番号：15KK0314

研究課題名（和文）1細胞レベルでの膵癌幹細胞の特性変化の細胞系譜的解析（国際共同研究強化）

研究課題名（英文）Cell lineage analysis of changes in characteristics of pancreatic cancer cells at single cell level (Fostering Joint International Research)

研究代表者

関根 圭輔 (Sekine, Keisuke)

横浜市立大学・医学部・講師

研究者番号：00323569

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 11,000,000円

渡航期間： 6ヶ月

研究成果の概要（和文）：本研究では、独・マックスプランク研究所Treutlein博士の元でCamp博士らとともにヒト立体臓器のシングルセルRNAシーケンス解析を実施した。構成細胞をそれぞれ別々に培養した際と、複数の細胞種が混ぜ合わされ立体的な組織が構成される際に初めて発現が見られる分子を詳細に解析することにより、細胞間相互作用に関わるシグナル候補を明らかにした。このシグナル候補分子の情報を元に機能解析を実施し、実際に複数のシグナル候補が立体的な細胞間相互作用に寄与することを明らかにした（Camp JG, Sekine K et al, Nature 2017）。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究によって、生体内で見られる複数の細胞種により構成される立体的な組織における細胞間相互作用の一旦を明らかにし、従来の平面培養における課題を明らかにした。また、本手法によって立体的な細胞間相互作用の新たな解析手法を提示することが出来た。これらの成果は、幹細胞生物学を背景に立体臓器の再構成技術をもつ日本側研究者とシングルセルRNAシーケンス解析の先駆者であるドイツ側研究者の国際共同研究によってはじめて成しえた成果と言える。

研究成果の概要（英文）：In this study, single-cell RNA sequencing of human three-dimensional organs was carried out with Dr. Camp and Dr. Treutlein others under at Max Planck Institute, Germany. We identified molecules whose expression could only be seen when multiple cell types were mixed together to generate organoid. By analyzing in detail, we identified signal candidates involved in cell-cell interactions. We performed functional analysis based on the information of this signal candidate molecule and revealed that multiple signal candidates actually contribute to steric intercellular interaction (Camp JG, Sekine K et al, Nature 2017).

研究分野：幹細胞生物学

キーワード：オルガノイド

様式 F-19-2

1. 研究開始当初の背景

これまでに、ヒト組織を構成する複数の細胞間の立体的な相互作用を再現することで機能臓器の創出技術を開発してきた。すなわち、ヒト iPS 細胞由来肝内胚葉、血管内皮細胞、間葉系細胞を一定の条件で共培養することにより自律的な細胞凝集が生じ、肝臓原基 (iPSC 肝芽) が誘導されることを明らかにした (Takebe T, Sekine K et al, Nature, 2013)。

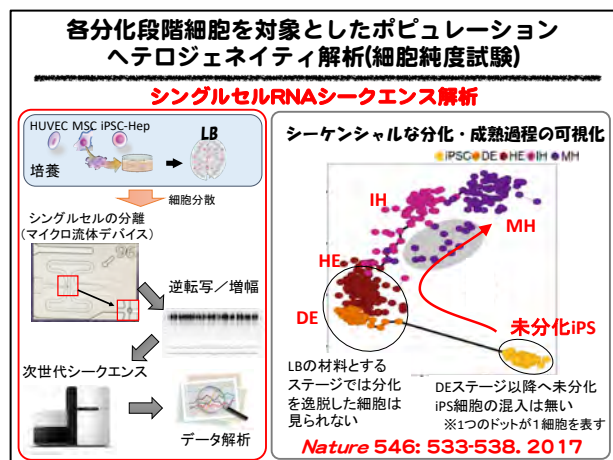
そこでこの技術を立体的ながん組織の人為的な再構成に応用し、患者由来プライマリ膵癌細胞より間質を含むヒト膵癌組織 (膵癌オルガノイド) を再構成することに成功した (「腫瘍再構成法」特願 2016-053074)。

2. 研究の目的

上記の背景に加え、基課題として H27 年度より基盤研究(B)により「1 細胞レベルでの膵癌幹細胞の特性変化の細胞系譜的解析」の研究を進め、これまでの研究から応募者らは最初に癌ができる元 (cell-of-origin) となる癌幹細胞の同定に成功している。そこで、シングルセル RNA シークエンス解析の高い技術を有する独・マックスプランク研究所 Treutlein 博士、Camp 博士らの元で、解析技術を習得し、人為的に創出したヒト膵癌組織 (膵癌オルガノイド) に特徴的な遺伝子発現を明らかにする。

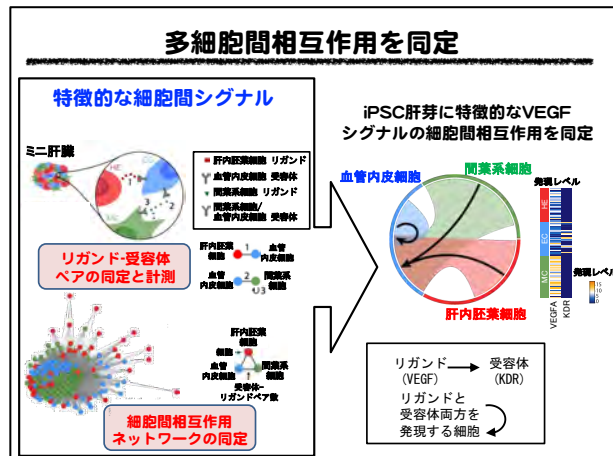
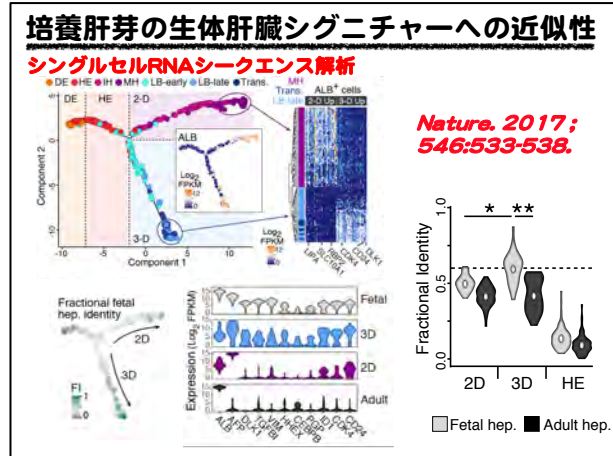
3. 研究の方法

再構成組織およびそれぞれの細胞材料について、酵素処理によりシングルセル懸濁液を調整した。マイクロフルイディクスを用いたシングルセル単離装置を用いてシングルセルを単離し、逆転写、cDNA 合成および増幅して作製した次世代シークエンス用ライブラリをイルミナ社次世代シークエンス装置を用いてシークエンスを決定した。既知のゲノム配列にアライメント後、R を用いた情報解析を行った。解析から得られたシグナル分子について、実際の細胞で当該シグナルが重要か否か明らかにするため、シグナル阻害剤あるいは siRNA を用いたノックダウンを行った。



4. 研究成果

本研究では、独・マックスプランク研究所 Treutlein 博士の元で Camp 博士らとともにヒト立体臓器のシングルセル RNA シークエンス解析を実施した。構成細胞と様々な培養期間の立体臓器のシングルセル RNA シークエンスデータを取得し、細胞の分化・成熟過程を明らかにした。さらに、平面培養した細胞に比べ、人為的に創出した立体臓器ではより生体組織の細胞に類似した遺伝子発現プロファイルを示すことを明らかにした。構成細胞をそれぞれ別々に培養した際と、複数の細胞種が混ぜ合わされ立体的な組織が構成される際に初めて発現が見られる分子を見出し、細胞間相互作用に関わるシグナル候補を明らかにした。このシグナル候補分子の情報を元に機能解析を実施し、実際に複数のシグナル候補が立体的な細胞間相互作用に寄与することを明らかにした (Camp JG, Sekine K et al, Nature 2017)。更に、ここで得られた複数細胞間で見られる立体的な相互作用をより詳細に解析する目的で、相互作用に関わる分子の機能解析に向け、遺伝子改変技術を用いた網羅的スクリーニング手法の確立へ向けた共同研究に着手し、基礎的な検討を実施した。また、ここで得られた情報をもとに立体臓器の安定性の



評価指標の抽出や成熟度評価指標の抽出に成功した。これらの成果は、幹細胞生物学を背景に立
体臓器の再構成技術をもつ日本側研究者とシングルセル RNA シークエンス解析の先駆者である
ドイツ側研究者の国際共同研究によってはじめて成しえた成果と言える。

5. 主な発表論文等
(研究代表者は下線)

[雑誌論文] (計 5 件)

1. Takahashi Y, Sekine K, Kin T, Takebe T, Taniguchi H
Self-Condensation Culture Enables Vascularization Of Tissue Fragments For Efficient
Therapeutic Transplantation
Cell Reports. 23:1620-1629. (2018) 査読有り
2. Nie YZ, Zheng YW, Miyakawa K, Murata S, Zhang RR, Sekine K, Ueno Y, Takebe T,
Wakita T, Ryo A, Taniguchi H.
Recapitulation of hepatitis B virus-host interactions in liver organoids from human induced
pluripotent stem cells.
EBioMedicine. 35: 114-123. (2018) 査読有り
3. Ayabe H, Anada T, Kaomoya T, Sato T, Kimura M, Yoshizawa E, Kikuchi S, Ueno Y,
Sekine K, Camp JG, Treutlein B, Ferguson A, Suzuki O, Takebe T, Taniguchi H.
Optimal Hypoxia Regulates Human iPSC-Derived Liver Bud Differentiation Through
Intercellular TGF β Signaling.
Stem Cell Reports. 11(2):306-316.(2018) 査読有り
4. Zhang RR, Koido M, Tadokoro T, Ouchi R, Matsuno T, Ueno Y, Sekine K, Takebe T,
Taniguchi H.
Human iPSC-Derived Posterior Gut Progenitors Are Expandable and Capable of Forming
Gut and Liver Organoids.
Stem Cell Reports.;10(3):780-793.(2018) 査読有り
5. †*Sekine K, †Camp JG, Gerber T, Loeffler-Wirth H, Binder H, Gac M, Kanton S,
Kageyama J, Damm G, Seehofer D, Belicova L, Bickle M, Barsacchi R, Okuda R,
Yoshizawa E, Kimura M, Ayabe H, Taniguchi H, *Takebe T, *Treutlein B † equal
contribution., * corresponding authors.
Multilineage communication regulates human liver bud development from pluripotency
Nature. 546:533-538. (2017) 査読有り

[日本語総説等]

1. 関根圭輔、武部貴則：臓器形成を可視化するシングルセル解析
細胞 49 (6) 23~26, (2017)

[学会発表] (計 12 件)

1. Keisuke Sekine
Asia-Pacific Scientific Workshop
「Generation of three-dimensional cancer tissue using patient-derived pancreatic cancer
cells」2019年3月4日~5日 シンガポール、海外
2. 関根圭輔
幹細胞の培養法・培養工学のためのコンソーシアム 第三回シンポジウム
「再生医療応用へ向けた iPSC 肝芽製造技術の開発」 2018年10月13日 大阪、国内
3. 関根圭輔
第1回 がん三次元培養研究会
「ヒト組織三次元的再構成技術を用いた膵癌の人為創出」2018年11月27日 東京、国内
4. 関根圭輔
第11回 Symphony
「ヒト組織三次元的再構成技術を用いたヒューマンバイオロジーの解析」 2018年9月1日~9
月2日 東京、国内
5. 関根圭輔
講演会：新しい治療法を開発を目指す患者由来がんモデル 2018年6月27日~6月28日

「患者由来膵癌細胞を用いた三次元的癌組織の人為的創出」 東京、国内

6. 関根 圭輔、奥田 諒、金子 千夏、井上 達也、碓井 彩華、上野 康晴、谷口 英樹

第 77 回日本癌学会学術総会

「微小環境をともなう三次元的癌組織の人為的創出」 2018 年 9 月 28 日 神奈川、国内

7. 関根 圭輔、奥田 諒、井上 達也、金子 千夏、碓井 彩華、上野 康晴、谷口 英樹

第 76 回日本癌学会学術総会

「腫瘍微小環境を模倣するヒト膵癌オルガノイドは薬剤耐性を示す」 2017 年 9 月 29 日 神奈川、国内

8. 奥田 諒、関根 圭輔、上野康晴 康晴、佐藤 準也、高橋 正希、井上 達也、金子 千夏、碓井 彩華、谷口 英樹

第 76 回日本癌学会学術総会

「癌微小環境を模倣した患者由来ヒト膵がんオルガノイドの創出」 2017 年 9 月 29 日 神奈川、国内

9. 碓井 彩華、奥田 諒、関根 圭輔、上野 康晴、佐藤 準也、高橋 正希、井上 達也、金子 千夏、谷口 英樹

第 76 回日本癌学会学術総会

「腫瘍微小環境を伴う膵癌オルガノイドは薬剤耐性を示す」 2017 年 9 月 29 日 神奈川、国内

10. 金子 千夏、奥田 諒、関根 圭輔、上野 康晴、佐藤 準也、高橋 正希、井上 達也、碓井 彩華、谷口 英樹

第 76 回日本癌学会学術総会

「腫瘍微小環境を伴う膵癌オルガノイドは in vitro で治療抵抗性を示す」 2017 年 9 月 29 日 神奈川、国内

11. 上野 康晴、奥田 諒、金子 千夏、碓井 彩華、関根 圭輔、谷口 英樹

第 76 回日本癌学会学術総会

「微小環境を伴うヒト膵癌オルガノイドの再構成に基づく新規膵癌薬剤評価系の構築」 2017 年 9 月 29 日 神奈川、国内

12. 濱田 侑希、関根 圭輔、都築 周作、小林 達也、上野 康晴、武部 貴則、谷口 英樹

第 17 回日本再生医療学会総会

「ヒト iPSC 肝芽の臨床応用に向けた安全性評価手法の確立」 2018 年 3 月 23 日 神奈川、国内

〔産業財産権〕

○出願状況（計 2 件）

名称：未分化細胞検出法

発明者：関根圭輔、谷口英樹

権利者：公立大学法人 横浜市立大学

種類：特願

番号：2018-115025

出願年：2018 年

国内外の別： 国内

名称：未分化細胞の分化抵抗性評価法

発明者：関根圭輔、谷口英樹

権利者：公立大学法人 横浜市立大学

種類：特願

番号：2019-5892

出願年：2019 年

国内外の別： 国内

6. 研究組織

研究協力者

〔主たる渡航先の主たる海外共同研究者〕

研究協力者氏名：J.Gray CAMP

ローマ字氏名：CAMP, J.Gray

所属研究機関名：Max Planck Institute for Evolutionary Anthropology

部局名：Department of Evolutionary Genetics

職名：Group leader

研究協力者氏名：Barbara TREUTLEIN

ローマ字氏名：TREUTLEIN, Barbara

所属研究機関名：Max Planck Institute for Evolutionary Anthropology

部局名：Max Planck Research Group on Single Cell Genomics

職名：Group leader and Assistant Professor at TU Munich

※科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属されます。