

令和 4 年 5 月 24 日現在

機関番号：12601

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2019～2021

課題番号：19K08435

研究課題名(和文) 膵癌の包括的理解を目指した細胞間ネットワーク解析

研究課題名(英文) Comprehensive biological network analysis of pancreatic cancer

研究代表者

立石 敬介 (TATEISHI, KEISUKE)

東京大学・医学部附属病院・講師

研究者番号：20396948

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,300,000円

研究成果の概要(和文)：15例の患者由来膵癌オルガノイド培養系を樹立し、1細胞RNAシーケンスのデータから構成細胞群を発現プロファイルによる10種類のクラスターに層別化した。各膵癌オルガノイドはサブタイプごとに明らかな増殖速度の違いは示さなかったものの、マウスにおける移植効率の違いを示した。また幹細胞マーカーの発現プロファイル上でも異なるパターンを示すことが明らかになった。ゲノム変異のパターンでは一定のオーバーラップが見られた。さらにはエピゲノム解析によりクロマチンの立体構造のパターンやそれに伴う転写制御のプロファイルにおいても異なるパターンを示すことが示された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

塩基配列変化を伴わずに遺伝子転写を制御するDNAメチル化やヒストン修飾などのエピゲノム制御は、多彩な機序で癌の性質に影響を及ぼしうると考えられる。癌細胞同士や間質細胞などから構成される独自の微小環境から慢性的な刺激を受ける過程で、その外部刺激を生存・増殖に適応させ、癌細胞がaddictする特異的なエピゲノム変化を誘導している可能性がある。本研究では膵癌において、エピゲノムに基づくサブタイプが存在することを明らかにした。

研究成果の概要(英文)：This research proposed a significance of epigenetic regulation in the subtype determination of pancreatic cancers. Human derived pancreatic cancer organoids were useful for the molecular and phenotypic analyses. ATAC-seq and ChIP-seq as well as RNA-seq indicated the subtype-specific profiles, which emphasized a pivotal role of epigenome status for the biological features in pancreatic cancers. This research offered a clue that epigenome is a novel target against pancreatic cancers.

研究分野：消化器内科学、膵臓病学

キーワード：膵癌 エピゲノム クロマチン

1. 研究開始当初の背景

解析技術の進歩に伴い、1細胞レベルでのシーケンス・発現解析すら可能となり、例えばヒトの各臓器構成細胞の遺伝子発現による分子学的特徴や加齢など様々な条件下における体細胞の遺伝子発現の不安定化や変異の蓄積についても解析が可能となった。一方、癌細胞においても腫瘍内癌細胞の不均一性について1細胞毎の情報が集積され、種々のドライバー遺伝子の変異プロファイルから見た癌細胞のクローン進化機序も解明されつつある。癌細胞に対する分子標的薬の有効性は、その癌細胞が依存する癌遺伝子変異の働き(いわゆる "oncogene addiction")などを阻害することに他ならないため、これらの知見は治療反応性についての予測にも直結すると期待される。

一方で塩基配列変化を伴わずに遺伝子転写を制御するDNAメチル化やヒストン修飾などのエピゲノム制御については、癌細胞が特異的にaddictする機構が存在するかは未だ明らかでない。エピゲノム修飾は細胞分化、代謝状態や免疫応答と相互に関連し合うことから、多彩な機序で癌の性質に影響を及ぼしうると考えられる。癌細胞も癌細胞同士や間質細胞などから構成される独自の微小環境から慢性的な刺激を受ける過程で、その外部刺激を生存・増殖に適応させ、癌細胞がaddictする特異的なエピゲノム変化を誘導している可能性がある。つまり正常細胞・癌細胞のいずれにおいても、変異に左右されないエピゲノムの多様性による細胞特性の揺らぎ・変化を分子レベルで可視化することが生体組織内での細胞集団多様性のさらなる包括的理解につながると考えられる。

既報で我々の報告した膵癌悪性化に関わるヒストン脱メチル化酵素KDM6Bの意義を基盤とする。KDM6Bの発現低下が癌抑制遺伝子CEBPAの発現を直接抑制し膵癌の悪性度増加に寄与することを明らかにし、膵癌における悪性形質の獲得にエピゲノム制御が関与する可能性を示唆しており、本研究のきっかけのひとつとなった

2. 研究の目的

膵癌をその分子学的特徴からサブタイプに分け、サブタイプクラスター形成におけるエピゲノム制御の重要性についても検証することを目的とする。

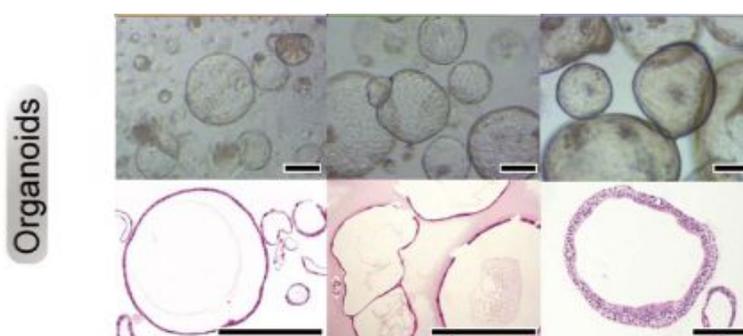
癌の多様性が実臨床における再発や薬物療法などへの耐性に関わることを考えれば、それに対する新たな治療概念の創造につながる可能性を有すると考えられる。

研究の学術的独自性としては、本研究が我々の報告した膵癌悪性化に関わるヒストン脱メチル化酵素 KDM6B の意義 (Carcinogenesis, 2014;35(11):2404) を基盤とする点があげられる。その論文では KDM6B の発現低下が癌抑制遺伝子 CEBPA の発現を直接抑制し膵癌の悪性度増加に寄与することを明らかにしたが、その後の検討で KDM6B/CEBPA axis 制御の異常に伴って出現する高い腫瘍形成能を有する細胞集団とその特異的な表面マーカー群を同定した (in submission)。これらの知見は膵癌における幹細胞性などの悪性形質の獲得にエピゲノム制御が関与する可能性を示唆しており、本研究のきっかけのひとつとなった。

研究の創造性についても、ヒト膵癌細胞の発現プロファイルの多様性に関与するエピゲノム制御とその主要な標的分子を探索することにより、多様性の制御方法を生み出す可能性がある。癌の多様性が実臨床における再発や薬物療法などへの耐性に関わることを考えれば、それに対する新たな治療概念の創造につながる可能性を有すると考えられる。

3. 研究の方法

約 15 例の患者由来膵癌オルガノイド培養系を樹立し(下図)、ヒト膵癌由来オルガノイドを用いた 1細胞 RNA シーケンスを行い、そのデータから構成細胞群を発現プロファイルによる 10 種類のクラスターに層別化した。それらを用いた生物学的アッセイやマウス移植による in vivo での解析、RNA シーケンスによる発現解析、ゲノム変異スクリーニング、エピゲノムプロファイルデータを取得する。



4. 研究成果

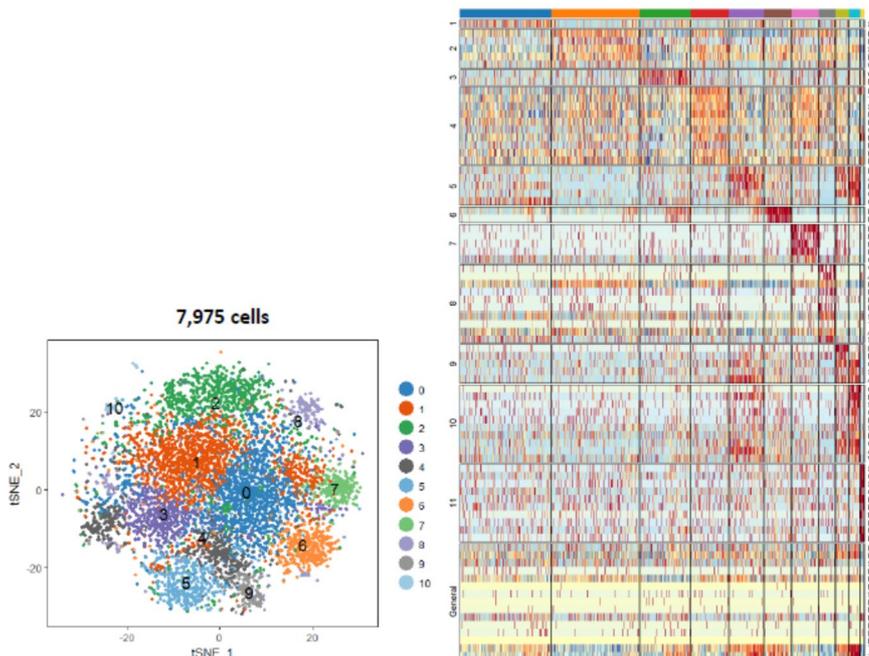
これまでに申請者は約 15 例の患者由来膵癌オルガノイド培養系を樹立し、それらを用いた生物学的アッセイやマウス移植による *in vivo* での解析への有用性を報告した (Oncotarget. 2016;7(38):61469)。さらに本研究ではその膵癌オルガノイドを用いて 1 細胞 RNA シークエンスによる発現解析、ゲノム変異スクリーニング、エピゲノムプロファイルデータを取得した。

a. 膵癌オルガノイド毎の 1 細胞レベルでの RNA シークエンス

膵癌オルガノイド内の発現多様性プロファイルのデータを取得した。

(下図; 1 細胞 RNA シークエンスを用いて得られた症例 1 の data 例)

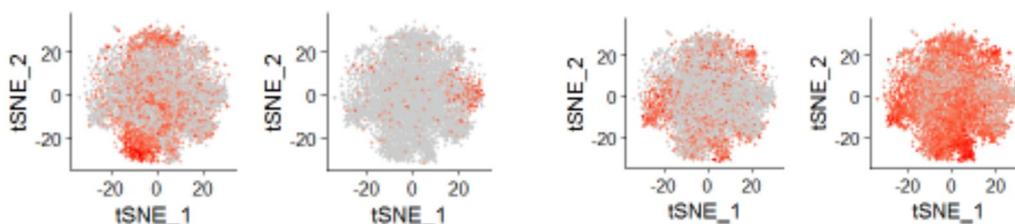
同様に集積した数症例の sc-RNAseq データについて、それらの batch effect を Seurat アルゴリズムにて補正したうえで膵癌オルガノイドの発現クラスターの層別化を行った。



上図左; 症例 1 の sc-RNAseq による unsupervised クラスタリングと subpopulation 分類
上図右; クラスタ毎の層別化遺伝子発現プロファイル

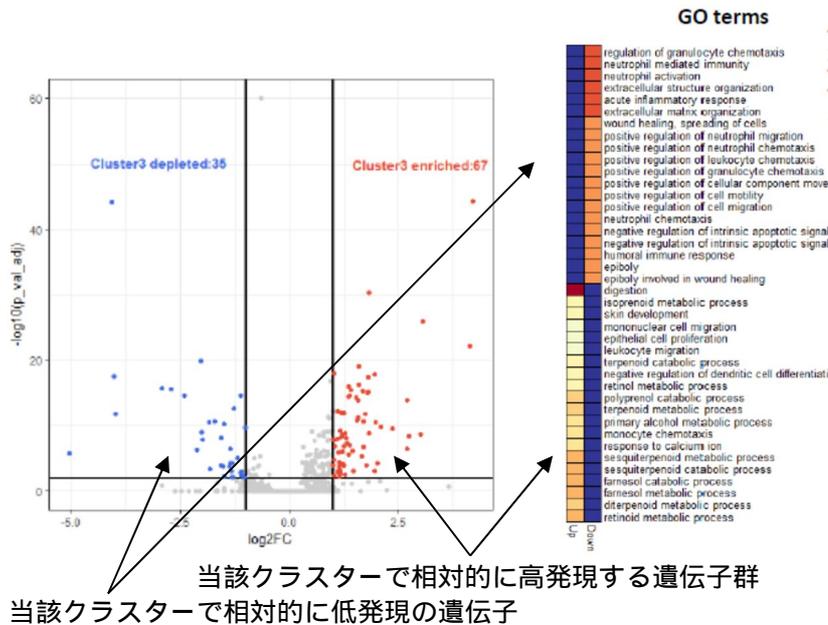
b. 膵癌オルガノイドクラスター内の幹細胞マーカー遺伝子群の発現分布の解析

膵癌幹細胞マーカー候補として知られている CD133 や CD44/CD24 などの分子、および KDM6B/CEBPA axis の異常で高発現することを見出した CD47 などのマーカー分子群の遺伝子発現の分布について検討した (下図)。この解析により各々のマーカー分子がそれぞれのクラスターにどのように分布するのかについて解析した。



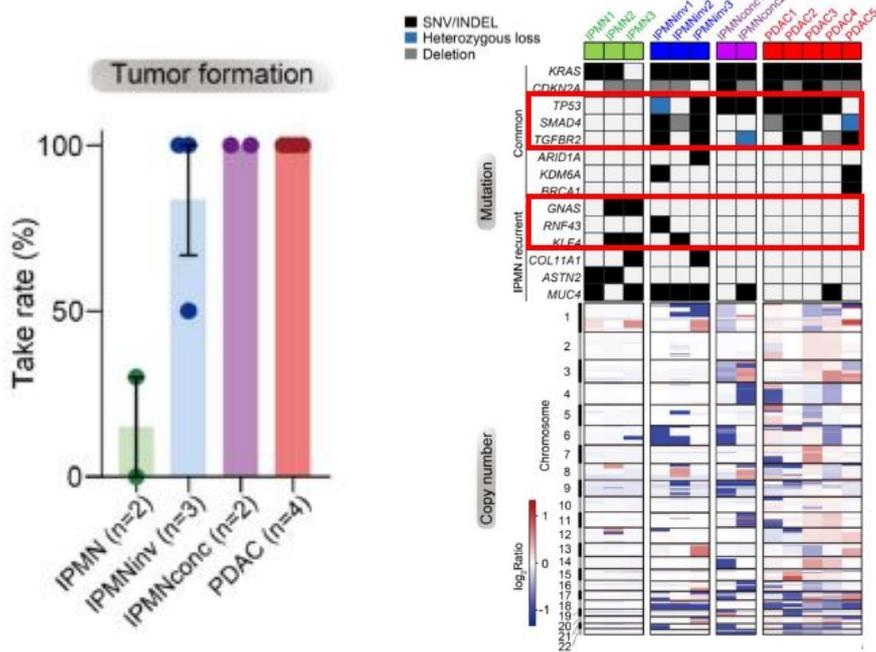
c. 膵癌幹細胞マーカー遺伝子と共発現する遺伝子プロファイルの解析

b. の解析の結果で膵癌幹細胞マーカーがとくに濃縮されている特定のクラスターに着目し、そのクラスターにおける特異的発現分子を他のクラスターと比較した。その分子群について GO 解析を行い、そのクラスターで特異的に活性化していると予想される細胞内シグナルを探索することでその幹細胞マーカー陽性クラスターの生物学的特性予測の手掛かりとできると考えた (下図; あるマーカー遺伝子発現クラスターについての発現プロファイル)。

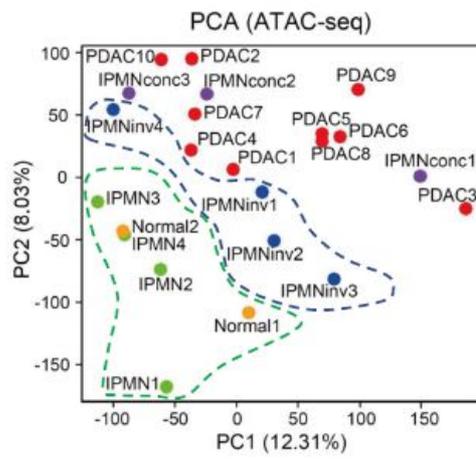


d. クロマチン構造による膵癌サブタイプの解析

各膵癌オルガノイドはサブタイプごとに明らかな増殖速度の違いは示さなかったものの、マウスにおける移植効率の違いを示した（下図左）。ゲノム変異のパターンでは一定のオーバーラップが見られた（下図右）。



さらにはエピゲノム解析によりクロマチンの立体構造のパターンやそれに伴う転写制御のプロファイルにおいても異なるパターンを示すことが示された（下図）。



本研究では膵癌において、エピゲノムに基づくサブタイプが存在することを明らかにした。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計3件（うち査読付論文 3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 KATO HIROYUKI, TATEISHI KEISUKE, FUJIWARA HIROAKI, IJICHI HIDEAKI, YAMAMOTO KEISUKE, NAKATSUKA TAKUMA, KAKIUCHI MIWAKO, SANO MAKOTO, KUDO YOTARO, HAYAKAWA YOKU, NAKAGAWA HAYATO, TANAKA YASUO, OTSUKA MOTOYUKI, HIRATA YOSHIHIRO, TACHIBANA MAKOTO, SHINKAI YOICHI, KOIKE KAZUHIKO	4. 巻 17
2. 論文標題 Deletion of Histone Methyltransferase G9a Suppresses Mutant Kras-driven Pancreatic Carcinogenesis	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Cancer Genomics Proteomics	6. 最初と最後の頁 695 ~ 705
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.21873/cgp.20224	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 -

1. 著者名 Oyama Hiroki, Tada Minoru, Takagi Kaoru, Tateishi Keisuke, Hamada Tsuyoshi, Nakai Yousuke, Kogure Hirofumi, Mizuno Suguru, Saito Kei, Saito Tomotaka, Sato Tatsuya, Suzuki Tatsunori, Takahara Naminatsu, Morishita Yasuyuki, Arita Junichi, Hasegawa Kiyoshi, Tanaka Mariko, Fukayama Masashi, Koike Kazuhiko	4. 巻 158
2. 論文標題 Long-term Risk of Malignancy in Branch-Duct Intraductal Papillary Mucinous Neoplasms	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Gastroenterology	6. 最初と最後の頁 226 ~ 237.e5
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1053/j.gastro.2019.08.032	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 -

1. 著者名 Sano Makoto, Ijichi Hideaki, Takahashi Ryota, Miyabayashi Koji, Fujiwara Hiroaki, Yamada Tomoharu, Kato Hiroyuki, Nakatsuka Takuma, Tanaka Yasuo, Tateishi Keisuke, Morishita Yasuyuki, Moses Harold L., Isayama Hiroyuki, Koike Kazuhiko	4. 巻 8
2. 論文標題 Blocking CXCLs-CXCR2 axis in tumor-stromal interactions contributes to survival in a mouse model of pancreatic ductal adenocarcinoma through reduced cell invasion/migration and a shift of immune-inflammatory microenvironment	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Oncogenesis	6. 最初と最後の頁 8
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1038/s41389-018-0117-8	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 佐野誠, 高橋良太, 伊地知秀明, 石垣和祥, 山田友春, 宮林弘至, 水野卓, 中塚拓馬, 田中康雄, 眞杉洋平, 森下保幸, 田中麻理子, 立石敬介, Harold L Moses, 小池和彦
2. 発表標題 VCAM-1阻害は膵癌の進展と癌関連血栓症/血栓塞栓症を抑制し予後に寄与する
3. 学会等名 第79回日本癌学会学術総会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 加藤裕之 立石敬介 小池和彦
2. 発表標題 オルガノイドを用いた膵腫瘍の進展機構の検討
3. 学会等名 2021JDDW・第63回日本消化器病学会大会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 加藤裕之, 立石敬介, 藤原弘明, 山本恵介, 伊地知秀明, 宮林弘至, 高橋良太, 白田龍之介, 石垣和祥, 齋藤圭, 齋藤友隆, 高原楠昊, 濱田毅, 水野卓, 木暮宏史, 中井陽介, 田中麻理子, 牛久哲男, 長谷川潔, 小池和彦
2. 発表標題 クロマチン動態から探る膵腫瘍の層別化
3. 学会等名 第52回日本膵臓学会大会
4. 発表年 2021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
研究分担者	藤原 弘明 (FUJIWARA HIROAKI) (00814500)	公益財団法人朝日生命成人病研究所・その他部局等・教授 (移行) (82654)	

6. 研究組織（つづき）

	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	水野 卓 (MIZUNO SUGURU) (30771050)	東京大学・医学部附属病院・助教 (12601)	

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