

様 式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19（共通）

科学研究費助成事業 研究成果報告書



令和 4 年 6 月 19 日現在

機関番号：82606

研究種目：研究活動スタート支援

研究期間：2020～2021

課題番号：20K22826

研究課題名（和文）凍結組織検体の1細胞核解析による卵巣明細胞がんの治療抵抗性細胞ネットワークの解明

研究課題名（英文）Identification of cellular networks that sustain chemoresistance of ovarian clear cell cancers through single nucleus analysis of frozen surgical specimens

研究代表者

森 裕太郎（Mori, Yutaro）

国立研究開発法人国立がん研究センター・研究所・特任研究員

研究者番号：80883313

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 2,200,000 円

研究成果の概要（和文）：がん組織はがん細胞と様々な非がん細胞により構成される複雑な組織であるが、がん細胞と癌関連線維芽細胞等の非がん細胞が形成する共生空間は、治療抵抗性と密接な関係があると考えられる。本研究では難治性の卵巣明細胞腺がんの治療抵抗性共生空間の本態を明らかにするため、予後情報が判明した症例の凍結組織を対象として、シングル核RNAシーケンス解析と空間的トランスクリプトームの統合解析を行った。統合解析により、治療抵抗性癌細胞群は癌細胞と癌関連線維芽細胞が混在する領域に存在することが明らかとなった。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究では難治性の卵巣明細胞腺癌組織のシングル核解析と空間的トランスクリプトーム解析を通じて、治療抵抗性癌細胞と癌関連線維芽細胞の共生・相互作用が治療抵抗性を担っている事を見出した。この共生・相互作用を阻害する事で卵巣明細胞腺癌の治療抵抗性を解除できる可能性があり、今後の新規治療法の開発につながると考える。

研究成果の概要（英文）：Recent studies suggest that intra-tumor heterogeneity of cancer is profoundly associated with chemoresistance: cancer cells can be stratified into a several distinct populations, some of which co-operate with surrounding non-cancer cells to form cellular networks that sustain chemoresistance. In this study, we performed single-nucleus RNA-seq analyses and spatial transcriptome of frozen surgical specimens of ovarian clear cell adenocarcinoma and we did integrate analysis of both. Integrated analysis revealed that chemoresistant cancer population was mainly localized in the mixed area of cancer cells and cancer associated fibroblasts.

研究分野：腫瘍生物学

キーワード：卵巣明細胞腺癌 シングルセル解析 空間的トランスクリプトーム 治療抵抗性

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、研究者個人に帰属します。

1. 研究開始当初の背景

卵巣明細胞腺がんは抗がん剤抵抗性を示す症例が多く、予後が悪い点が臨床上的大きな問題となっている。本邦において頻度が高い卵巣明細胞腺がんの予後の改善を目指す上で、治療抵抗性の機序を明らかにし、新規治療戦略を開発することは産婦人科にとって急務である。がんの治療抵抗性の背景に、がん組織の多様性及び難治性を構成する細胞ネットワークが存在する事が示唆されているが、卵巣明細胞腺がんの組織多様性に言及した報告は未だほとんどない。

2. 研究の目的

がん組織多様性を理解するための方法論として、シングルセル解析法が主流となりつつある。しかし、従来のシングルセル解析では新鮮ながん組織検体が必要であり、予後情報と結びつけるためには前方視的な解析を行う必要があった。そこで、凍結がん組織のシングル核 RNA シーケンス解析という独自の実験系を確立した。この手法を用いる事で後方視的ながん手術検体のシングルレベルでの解析が可能となる。すなわち、治療抵抗性と感受性が明確に分かる症例を選択して解析し比較することで、治療抵抗性に関わる組織多様性や細胞群を同定し、卵巣明細胞腺がんの治療抵抗性の機序について解明できると考えた。

そこで、本研究では卵巣明細胞腺がんの治療抵抗性の機序解明を目的として 10 症例の卵巣明細胞腺がん症例の凍結組織に対してシングル核 RNA シーケンス解析 を施行した。卵巣明細胞腺がん患者における抗癌剤の感受性症例と抵抗性症例の比較を行った。また抵抗性細胞の組織上での局在を明らかにする目的で、卵巣明細胞腺がん症例の凍結組織に対して空間的トランスクリプトーム解析を行い、シングル核 RNA シーケンスのデータとの統合解析を行った。

3. 研究の方法

(1) 凍結組織検体のシングル核解析

卵巣明細胞腺がんの凍結組織検体は、新潟大学医歯学総合病院（中央区、新潟県）および国立がん研究センター中央病院（中央区、東京都）でインフォームドコンセントを受けた患者から切除されたものを使用した。3-5mm 程度の凍結組織検体からホモジナイザーを用いて核抽出を行い、10x Genomics の Chromium システムを用いて単一核の cDNA を合成しライブラリーを作製した。シーケンスはイルミナの HiSeq2500 を用いて行った。

(2) 凍結組織検体の空間的トランスクリプトーム解析

10x Genomics の Visium による空間的トランスクリプトーム解析を行った。凍結組織検体を OCT に再包埋して薄切後、Visium 遺伝子発現スライドに載せ、HE 染色を行いイメージングした後、空間的バーコード付加とライブラリー構築を行った。シーケンスはイルミナの HiSeq2500 を用いて行った。

(3) データ解析

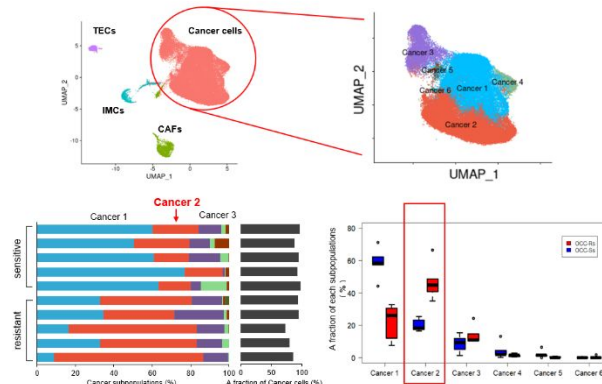
シーケンスによって得られた fastq データを用いて cell ranger および spaceranger によるアライメント・マッピングを行った。その後、統計解析言語 R によるシングルセル発現解析および空間的発現解析を行った。クラスタリング解析、主成分分析、発現遺伝子解析には R パッケージの Seurat(<https://satijalab.org/seurat/index.html>)を使用して解析を行った。

4. 研究成果

(1) 治療抵抗性ががん組織で増加する sub population の同定

治療抵抗性 5 症例および治療感受性 5 症例の計 10 症例についてのシングル核解析データを UMAP に展開したところ、図 2 のように細胞の種類ごとにクラスタリングされた。さらにがん細胞のクラスターを 6 つクラスターとして解析し、その存在割合を症例毎に比較したところ、治療抵抗性症例の組織において Cancer#2 のクラスターの割合が有意に多くなっていることが分かった。(図 1)これらの結果から Cancer#2 のクラスターが治療抵抗性に関わっている事が示唆された。

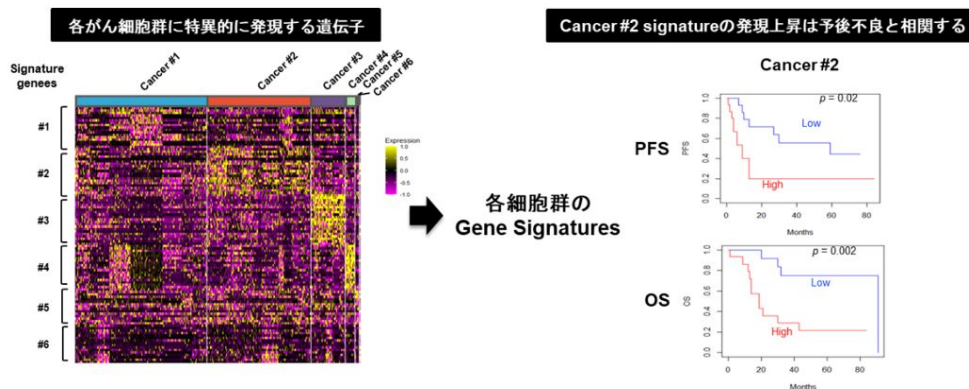
図 1 抗がん剤抵抗性と関連する明細胞がん細胞群の同定



(2) 治療抵抗性がん細胞群のマーカーは予後不良と関連する

Cancer#2 のクラスターの増加が臨床的予後と関連があるかどうかを確認するため、シングル核解析の各がん細胞のクラスターに特徴的に発現する遺伝子群を遺伝子シグネチャーとして使用して予後解析を行った。Cancer#2 の遺伝子シグネチャーの発現が高い症例で、PFS・OS とともに短いことが分かった。また Cancer#2 の遺伝子シグネチャーでは各種インテグリンや Hypoxia に関わる遺伝子の発現上昇が認められた。(図2)

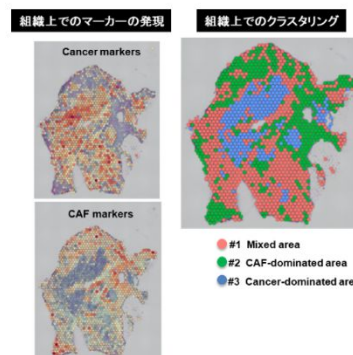
図2 治療抵抗性細胞の遺伝子発現上昇は予後と関連する



(3) 組織切片上における各細胞マーカーの発現とクラスタリング

卵巣明細胞腺癌の治療抵抗性症例の凍結組織を用いて Visium による空間的トランスクリプトーム解析を行った。シーケンスの結果、十分な遺伝子発現数が得られている事が確認できた。また組織上でのがん細胞・CAFのマーカーの発現を確認したところ、HE 染色像で確認できる細胞分布と一致していたことから、透過処理などの工程が妥当であったと考えられた。空間的トランスクリプトーム解析のデータから組織上でのクラスタリングを行ったところ、それぞれのスポットはがん細胞メインの領域 (Cancer-dominated area)、CAF メインの領域 (CAF-dominated area)、がん細胞と CAF が混在している領域 (Mixed area)の3つの領域に分けられた。(図3)

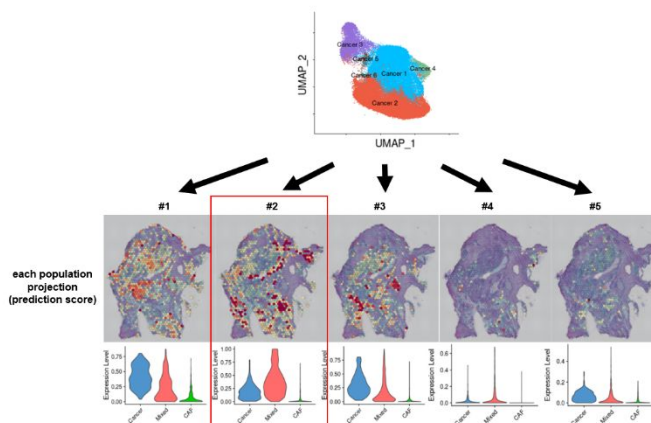
図3 組織上でのクラスタリング



(3) がん細胞クラスターの組織切片上での分布

次にシングル核解析での各がん細胞クラスターが組織上でどのように分布しているかを確認するため、シングル核解析のデータと空間的トランスクリプトームのデータを統合して解析した。興味深いことに、治療抵抗性がん細胞のクラスターである Cancer#2 は、空間的トランスクリプトームにおける混在領域に分布することが分かった。これらの結果から、がん細胞と CAF が混在している領域に治療抵抗性細胞が局在している事が示唆された。(図4)

図4 抵抗性細胞群はがんと間質の混在領域に局在する



5 . 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計1件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件）

1 . 発表者名 Mori Y, Yamawaki K, Ishiguro T, Yoshihara K, Kanda Y, Shiokawa D, Enomoto T and Okamoto K
2 . 発表標題 Identification of cellular networks that sustain chemoresistance of ovarian clear cell cancers through single nucleus analysis of frozen surgical specimens.
3 . 学会等名 第79回日本癌学会学術総会
4 . 発表年 2020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
---------	---------