

令和 6 年 6 月 3 日現在

機関番号：14301

研究種目：基盤研究(B) (一般)

研究期間：2021～2023

課題番号：21H02714

研究課題名(和文) がん三次元構造における幹細胞化シグナルの時空間的解析

研究課題名(英文) Spatiotemporal analysis of the stem cell conversion in the 3D context of cancer

研究代表者

井上 正宏 (INOUE, Masahiro)

京都大学・医学研究科・特定教授

研究者番号：10342990

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 13,300,000円

研究成果の概要(和文)：一つのがんの中のがん細胞は、均一で安定した性質を持つのではなく、すぐに変わるいろいろな性質を持つ。患者ががん組織からがん細胞を培養する方法が進歩し、そのような性質を試験管内で調べられるようになった。この研究では、大腸がんは単細胞と2-4細胞からなるクラスターでは違った性質を示し、その性質の差はNotchシグナルによって分子レベルでコントロールされていることを明らかにした。増殖しないがん細胞クラスターの亜集団は抗がん剤に耐性があり、特定の条件下では再増殖することができる。この耐性細胞を標的とした治療法を開発することが重要である。

研究成果の学術的意義や社会的意義

この研究では、単細胞と少数の細胞からなるクラスターとでは異なる性質を示すことを明らかにした。これまで、転移の単位は単細胞と考えられてきたが、細胞集団としてがんから離れたクラスターが大きな役割を果たしていることが明らかになった。また、転移のみならず、治療後に残存するがん細胞がクラスターとして残る場合、同じようなことが起こっている可能性がある。試験管内でこのような現象を再現するモデルができたことは、転移の予防や抗がん剤治療の補助療法の開発につながる。

研究成果の概要(英文)：Cancer cells within a single cancer do not have uniform and stable properties, but rather a variety of quickly changing properties. Advances in methods for culturing cancer cells from patient cancer tissue have made it possible to examine such properties in vitro. This study revealed that colorectal cancer cells exhibit different properties in single cells and in cell clusters composed of 2-4 cells, and that these differences in properties are controlled at the molecular level by Notch signaling. Subpopulations of non-proliferating cancer cell clusters are resistant to anticancer drugs and can repopulate under certain conditions. It is important to develop therapies that target these resistant cells.

研究分野：がん細胞の生物学、がん細胞の培養、治療薬の開発

キーワード：がん 多様性 可塑性 増殖 薬剤耐性

### 1. 研究開始当初の背景

正常組織において、ダメージ後に幹細胞が活性化することは、肝障害後の肝再生や、組織損傷部位の上皮による被覆など、広く観察される現象である。がんでも同様の現象が起きることは想像に難くない。つまり、治療行為による三次元構造の破壊はがんの増殖や幹細胞性を促進している可能性があり、治療効果は細胞傷害性と誘導される幹細胞活性化の差分として現れている可能性がある。我々はこれまでに、がん患者検体から純化したがん細胞を効率よく初代培養する技術である Cancer Tissue-Originated Spheroid (CTOS) 法を開発した。CTOS 法で調製したオルガノイドは元の腫瘍の性質を良く保存している。これまでに機械的破碎、低酸素、放射線などのストレスにより、がんオルガノイドで幹細胞性が増強すること、小細胞塊の機械的破碎や放射線照射では Wnt の活性化が重要であることを明らかにしている。

### 2. 研究の目的

本研究では、がん組織を再生臓器と捉え、三次元構造の破壊とその再生時におこるがん細胞の幹細胞化が、増殖や治療抵抗性を増強する分子機構を明らかにすることを試みた。特に、少数の細胞が集団として母集団から離脱したもの（クラスター）に焦点を当て、まず幹細胞化に関与する三次元構造物内の細胞間コミュニケーションの分子基盤を明らかにし、さらにダメージを受けた細胞そのものではなく、三次元構造の破壊を感知して非ダメージ細胞が幹細胞化するという仮説を検証した。

### 3. 研究の方法

我々の開発したがん三次元培養法を用いて、オルガノイド構成細胞の単一細胞あるいは少数の細胞からなるクラスターのスフェロイド形成能と増殖能を同時に解析する clonogenic assay を確立した(図, Coppo 2023 STAR Protocols)。

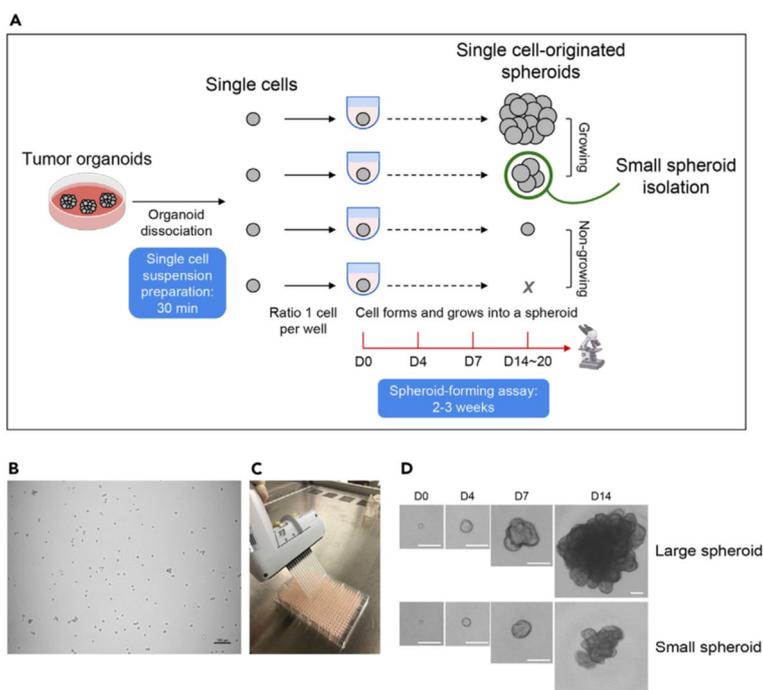


図1 単一細胞およびクラスターの増殖表現型を追跡するための細胞培養システム

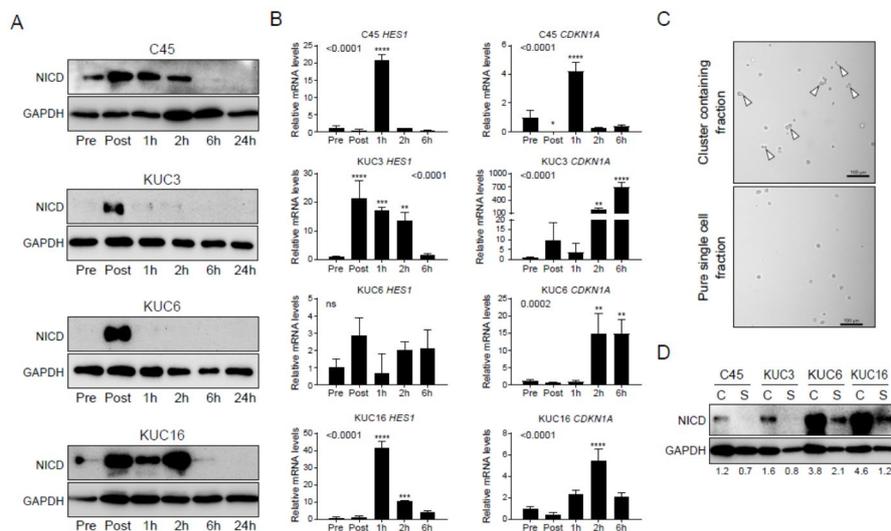
(A) 単一細胞由来・クラスターのスフェロイド形成増殖アッセイの模式図。(B) 単細胞に解離し、セルストレーナーで濾過した後の大腸がん細胞の代表的な位相差画像。スケールバー = 100μm。(C) 384 ウェルプレートへ単一細胞とクラスターからなる懸濁液をプレーティングする(D) 単細胞あるいは単クラスター由来スフェロイドの経時的増殖。スケール bar = 100 μm。

その他、免疫染色、遺伝子導入、感受性試験、免疫染色、ウエスタンブロットティング、in situ hybridization はこれまでに報告した方法に従って行った。

#### 4. 研究成果

三次元構造破壊とその再生による幹細胞活性化シグナルを解析するために、我々の開発したがん三次元培養法を用いて、オルガノイド構成細胞のスフェロイド形成能と増殖能を同時に解析する clonogenic assay 法を確立した。この assay 法により、大腸がんオルガノイドは細胞死する細胞、細胞死しないがほとんど増殖しない (poorly growing: PG) 細胞、増殖する細胞で構成されていることを明らかにした。さらに、増殖する細胞の増殖能には広い幅があり、小さなスフェロイドを形成する (Small spheroid forming: S) 細胞と、大きなスフェロイドを形成する (large spheroid forming: L) 細胞で構成されていた (図2)。クローニングした S-細胞は小スフェロイドのみを形成 (S パターン) し、L-細胞は小さなスフェロイドと大きなスフェロイドの両方を形成 (D パターン) した。どちらも造腫瘍能があり、様々な外因性トリガーによって S-細胞は S パターンから D パターンへ移行した。特に Notch シグナルと Musashi-1 が重要な役割を果たしていた。以上の成果を論文発表した (Coppo 2023 iScience)。

がん細胞クラスターは単細胞よりも転移能が高いことから、がん細胞クラスターは単細胞とは異なる生物学的性質を持つことが示唆される。腫瘍塊から新たに形成される de novo がん細胞クラスターの性質は、ほとんど知られていなかった。確立した clonogenic assay 法を応用して、オルガノイドから調製した直後の単細胞から 4 細胞までのクラスターの成長パターンを追跡した。Notch シグナルは、単細胞と比較して小クラスターでは解離直後に強く活性化され、Notchシグナルの阻害はPGスフェロイドの割合を著しく増加させた。PGスフェロイドは in vitro の細胞外基質包埋条件ではごく少数しか増殖しなかったが、PG スフェロイド由来の異種移植腫瘍は、未処理のスフェロイドに匹敵する増殖率を示した。つまり、in vitro では de novo クラスターの増殖運命の決定に Notch シグナルは必要であるが、皮下移植の条件では必要ではないことが明らかになった(論文 in revision)。



## 図2 単一細胞およびクラスター生成時の Notch シグナル活性化

(A) 単一細胞由来・クラスターが形成された後の経時的な NICD ウェスタンブロットニング (B) Notch 下流遺伝子の経時的な RT-PCR (C) 単細胞とクラスターの分取 (D) 単細胞とクラスターの NICD ウェスタンブロットニング

また、抗がん剤と Notch シグナル阻害剤を併用したところ、抗がん剤暴露後の再増殖は *in vitro* では抑制されたが、*in vivo* では抑制されなかった。このことは、Notch シグナルを阻害したクラスター由来のスフェロイドは、*in vitro* では増殖が抑制されたが、移植腫瘍は未処理のスフェロイドに匹敵する増殖率を示したことと一致している。つまり、Notch シグナルの阻害を克服する何らかのメカニズムが *in vivo* の腫瘍に存在することが示唆された。*In vitro* で血管内皮細胞の培養上清で刺激すると、直ちに増殖運命の転換が起こったことから、血管内皮細胞が *in vivo* での Notch シグナル阻害の抵抗性に関与している可能性があり、現在解析を進めている。

化学療法で誘発される増殖運命の転換は、細胞ダメージそのものではなく、周囲の細胞が細胞死することが、島状に残ったクラスターの細胞にアラームとして発動し、幹細胞性を誘導するという仮説を検証するために、オルガノイドに誘導型自殺遺伝子 *iCaspase9* を導入し、特異的に細胞死を誘導できるようにした細胞を、parent cell と混合してオルガノイドを再構成させたのち、遺伝子操作した細胞のみに細胞死を誘導した。細胞死を誘導された細胞が速やかにオルガノイドから排除され、クラスターとして残存する過程を動画撮影で確認した。細胞死の誘導で、残存細胞に一過性に Notch シグナルが活性化することを確認した。しかし、残存細胞で S-パターンから D-パターンへの増殖運命の転換は起こらなかった。つまり、増殖運命の転換に Notch シグナルの活性化は必要であるが十分ではなく、残存細胞自身が受ける化学療法の影響が増殖運命の移行に必要であることが示唆された。

## 5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計13件（うち査読付論文 11件 / うち国際共著 0件 / うちオープンアクセス 6件）

1. 著者名 Coppo Roberto, Kondo Jumpei, Onuma Kunishige, Inoue Masahiro	4. 巻 4
2. 論文標題 Tracking the growth fate of single cells and isolating slow-growing cells in human colorectal cancer organoids	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 STAR Protocols	6. 最初と最後の頁 102395 ~ 102395
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.xpro.2023.102395	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 Coppo Roberto, Kondo Jumpei, Iida Keita, Okada Mariko, Onuma Kunishige, Tanaka Yoshihisa, Kamada Mayumi, Ohue Masayuki, Kawada Kenji, Obama Kazutaka, Inoue Masahiro	4. 巻 26
2. 論文標題 Distinct but interchangeable subpopulations of colorectal cancer cells with different growth fates and drug sensitivity	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 iScience	6. 最初と最後の頁 105962 ~ 105962
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.isci.2023.105962	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 Nashimoto Yuji, Shishido Shotaro, Onuma Kunishige, Ino Kosuke, Inoue Masahiro, Shiku Hitoshi	4. 巻 11
2. 論文標題 Oxygen metabolism analysis of a single organoid for non-invasive discrimination of cancer subpopulations with different growth capabilities	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 Frontiers in Bioengineering and Biotechnology	6. 最初と最後の頁 1184325 ~ 1184325
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3389/fbioe.2023.1184325	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 Nashimoto Yuji, Mukomoto Rei, Imaizumi Takuto, Terai Takato, Shishido Shotaro, Ino Kosuke, Yokokawa Ryuji, Miura Takashi, Onuma Kunishige, Inoue Masahiro, Shiku Hitoshi	4. 巻 219
2. 論文標題 Electrochemical sensing of oxygen metabolism for a three-dimensional cultured model with biomimetic vascular flow	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 Biosensors and Bioelectronics	6. 最初と最後の頁 114808 ~ 114808
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.bios.2022.114808	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 井上正宏	4. 巻 48
2. 論文標題 オルガノイドパネルを用いた個別化医療への展開	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Medical Science Digest	6. 最初と最後の頁 581 ~ 584
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) なし	査読の有無 無
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 井上正宏	4. 巻 第4版
2. 論文標題 CTOSとPDXのシャトルシステム	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 細胞培養・組織培養の技術	6. 最初と最後の頁 223 ~ 226
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) なし	査読の有無 無
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39件 (うち招待講演 13件 / うち国際学会 0件)

1. 発表者名 井上正宏
2. 発表標題 がんバイオリソース活用の課題とソリューション
3. 学会等名 第2回横濱がんセミナー (招待講演)
4. 発表年 2024年

1. 発表者名 井上正宏
2. 発表標題 がん細胞集団を構成する細胞の多様性と可塑性を標的とした治療法の開発
3. 学会等名 京都大学 生理化学研究ユニット第13回シンポジウム (招待講演)
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 小沼邦重、井上正宏
2. 発表標題 大腸癌de novo クラスタが示す細胞運命のNotchシグナルによる制御
3. 学会等名 第9回細胞凝集研究会
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 井上正宏
2. 発表標題 患者がんオルガノイドを用いた感受性予測法と治療法の開発
3. 学会等名 第69回日本内科学会 四国支部生涯教育講演会（招待講演）
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 井上正宏
2. 発表標題 オルガノイド内でがん細胞が構成する社会の多様性と可塑性
3. 学会等名 細胞・組織・臓器工学とオルガノイド ワークショップ（招待講演）
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 コッポ ロベルト、近藤純平、小沼邦重、井上正宏
2. 発表標題 Distinct but interchangeable subpopulations of colorectal cancer cellse with different growth faces and drug sensitivity
3. 学会等名 第82回日本癌学会学術総会
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 コッポロベルト, 井上正宏
2. 発表標題 異なる増殖運命と薬物感受性をもつ大腸癌細胞亜集団の解析
3. 学会等名 第27回日本がん分子標的治療学会学術集会
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 井上正宏
2. 発表標題 創薬支援と個別化医療に向けた患者がん組織からのがん細胞調整と培養
3. 学会等名 和歌山県立医科大学 大学院特別講義兼大学院教員FD研修会（招待講演）
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 井上正宏
2. 発表標題 がん幹細胞の多様性と可塑性
3. 学会等名 第4回がん三次元培養研究会（招待講演）
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 Yi-Kai Lin, Masahiro Inoue
2. 発表標題 Notch signaling determine the fate of growth in the clusters of colorectal cancer cells
3. 学会等名 第18回がんとハイポキシア研究会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 小沼邦重, 井上正宏
2. 発表標題 大腸がん細胞集団における薬剤耐性分画の代謝状態の解析
3. 学会等名 第18回がんとハイポキシア研究会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 井上正宏
2. 発表標題 薬剤耐性におけるがん細胞の運命決定
3. 学会等名 日本患者由来がんモデル学会学術集会2022 (招待講演)
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 井上正宏
2. 発表標題 がんオルガノイド培養とがんの多様性・可塑性
3. 学会等名 第102回北海道医学大会 腫瘍系分科会 (第125回北海道癌談話会例会) (招待講演)
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 Roberto Coppo, 近藤純平, 小沼邦重, 井上正宏
2. 発表標題 機能的な単一細胞解析による大腸癌内の相互転換可能な細胞亜集団の解明
3. 学会等名 第81回日本癌学会学術総会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 井上正宏
2. 発表標題 がん三次元初代培養を用いた薬剤感受性試験
3. 学会等名 がんと代謝研究会 in 佐渡
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 角南 智彦, 井上正宏, 小沼邦重, 山田敦, 武藤学
2. 発表標題 大腸前がん病変におけるスフェロイド増殖能の多様性
3. 学会等名 第31回日本がん転移学会学術集会・総会.
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 林 奕凱, 井上正宏
2. 発表標題 大腸がん細胞集団における幹細胞性の可塑性とNotch シグナルによる制御
3. 学会等名 第31回日本がん転移学会学術集会・総会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 Coppo Roberto, 小沼邦重, 近藤純平, 井上正宏
2. 発表標題 機能的な単一細胞解析による大腸癌内の相互転換可能な細胞亜集団の解明
3. 学会等名 第31回日本がん転移学会学術集会・総会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 井上正宏
2. 発表標題 患者由来がん三次元細胞培養の臨床応用
3. 学会等名 第26回日本がん分子標的治療学会学術集会（招待講演）
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 井上正宏
2. 発表標題 Cancer tissue-originated spheroids法の精密化医療への応用
3. 学会等名 第19回日本臨床腫瘍学会学術集会（招待講演）
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 井上正宏
2. 発表標題 機能的単細胞解析によるがん幹細胞多様性の解析
3. 学会等名 患者由来がんモデル研究会（招待講演）
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 井上正宏
2. 発表標題 大腸がん幹細胞の多様性 - オルガノイドの機能的単細胞解析 -
3. 学会等名 第39回日本ヒト細胞学会学術集会（招待講演）
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 Coppo Roberto, Jumpei Kondo, Masahiro Inoue
2. 発表標題 Molecular mechanism of regulating the growth status in cancer stem cells of colorectal cancer
3. 学会等名 第80回日本癌学会学術総会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 Lin Yi-kai, 井上正宏
2. 発表標題 大腸がん細胞集団における幹細胞の可塑性とNotchシグナルによる制御
3. 学会等名 第25回日本がん分子標的治療学会学術集会
4. 発表年 2021年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

<a href="https://www.kyoto-u.ac.jp/ja/research-news/2023-01-20">https://www.kyoto-u.ac.jp/ja/research-news/2023-01-20</a> <a href="https://cbrrd.med.kyoto-u.ac.jp/paper.html">https://cbrrd.med.kyoto-u.ac.jp/paper.html</a>
--

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	近藤 純平  (KONDO Jumpei)  (80624593)	大阪大学・大学院医学系研究科・准教授    (14401)	

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