

平成 30 年 6 月 20 日現在

機関番号：72602

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2015～2017

課題番号：15K06861

研究課題名(和文) 1細胞発現解析による悪性腹水貯留の分子機序の解明

研究課題名(英文) Molecular analysis of malignant ascites formation by single-cell RNA-sequencing

研究代表者

森 誠一 (Mori, Seiichi)

公益財団法人がん研究会・がんプレジジョン医療研究センター 次世代がん研究シーズ育成プロジェクト・プロジェクトリーダー

研究者番号：10334814

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,000,000円

研究成果の概要(和文)：漿液性卵巣がんでは、しばしばがん細胞を含む腹水が貯留するが、その発生機構はいまだ不明であり、有効な治療法はない。本研究では、悪性腹水の原因療法開発を目指し、腹水貯留の病態解明のための基礎研究を行ってきた。構成細胞であるがん細胞・炎症細胞・中皮細胞の、それぞれの細胞間相互作用ならびに細胞内パスウェイ異常を網羅的に明らかにする目的で、患者腹水細胞の1細胞発現解析を行った。

研究成果の概要(英文)：Although patients with serous ovarian cancer very often accumulate malignant ascites, the molecular mechanism has not been well elucidated and effective therapeutics against ascites formation has neither been available. In this research, we have been performing basic research to understand the molecular etiology. We have been performing single-cell RNA-seq analyses of ascites constituent cells, such as cancer cells, inflammatory cells, mesothelial cells, for comprehensively understanding the intercellular interaction and intracellular pathway abnormality.

研究分野：がんゲノム学 生物情報科学

キーワード：1細胞解析 漿液性卵巣がん 悪性腹水 がん細胞 炎症細胞 中皮細胞

1. 研究開始当初の背景

漿液性卵巣がんでは、しばしば悪性腹水(がん細胞を含む腹水)が貯留するが、その発生機構はいまだ不明であり、有効な治療法はない。

2. 研究の目的

本研究では、患者腹水細胞の1細胞発現解析を行い、その構成細胞であるがん細胞・炎症細胞・中皮細胞の、それぞれの細胞間相互作用ならびに細胞内パスウェイ異常を網羅的に明らかにする。

3. 研究の方法

(1) 各症例から得られた腹水細胞の1細胞発現解析を行う。

(a) マーカーの発現パターンより、悪性腹水構成細胞である、卵巣がん細胞、リンパ球・樹状細胞・マクロファージなどの炎症細胞、中皮細胞を同定する。

(b) 各細胞におけるサイトカイン・ケモカイン・成長因子・接着因子について、それらの発現とリガンド-受容体関係を解析することで、細胞間相互作用を明らかにする。

(c) 各細胞におけるパスウェイ活性パターンを調べる。

(d) データベースと照合することにより、がん細胞における体細胞変異を同定する。

(2) 各症例で明らかになった細胞間相互作用、パスウェイ活性化ならびにがん細胞の体細胞変異のパターンと、腹水量・腹水穿刺頻度、予後や治療感受性・抵抗性との比較ならびに照合を行い、腹水貯留に關与する細胞間相互作用およびパスウェイおよびがん体細胞変異を明らかにする。

(3) がん研究会の組織バンクに保管されている漿液性卵巣がん299検体の免疫染色等を行い、腹水貯留に重要な細胞間相互作用、パスウェイやがん体細胞変異を実証する。

4. 研究成果

(1) 腹水細胞の1細胞発現解析

(a) 既存の検体収集システムを活用し、手術ならびに腹水検体を収集・保管した。手術時の残存腫瘍確認の際、および腹水貯留症状の緩和目的で腹腔穿刺を行う際に採取され、細胞診断に必要な量を取った後の残余腹水を利活用した。1細胞発現解析におけるマーカー解析と比較する目的で、収集した腹水細胞は直ちにパパニコロ-染色を行い、形態学的に各細胞種の含有率を調べた。必要に応じ、がん細胞におけるEpCAM, CA125等各種マーカーの免疫染色を行い、形態学的な分類結果と照合・確認した。

(b) 1細胞解析により、細胞種をタイピングし、細胞間相互作用・パスウェイ活性を定量した。1細胞のRNA-seqライブラリを作成するため、患者腹水細胞の1細胞分散条件、前増幅条件の条件検討と品質管理を行った。

1細胞発現解析による細胞種・細胞間相互作用・パスウェイ活性の定量的解析として、以下の情報解析を行った。

RNA-seqデータの情報解析前処理

細胞種タイピング

がん細胞のEpCAM, Tリンパ球のCD3など既知のマーカーにより細胞種をタイピングした。

細胞間相互作用・パスウェイ解析・がん細胞における体細胞変異の検出

現在、複数症例の臨床情報と照合し、腹水量や予後など種々の臨床情報との相関解析を行っている。

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7件)

1. TP53 and OSBPL10 alterations in diffuse large B-cell lymphoma: prognostic markers identified via exome analysis of cases with extreme prognosis. Dobashi A, Togashi Y, Tanaka N, Yokoyama M, Tsuyama N, Baba S, Mori S, Hatake K, Yamaguchi T, Noda T, Takeuchi K. *Oncotarget*. 2018 Apr 13;9(28):19555-19568.

2. Pattern of programmed cell death-ligand 1 expression and CD8-positive T-cell infiltration before and after chemoradiotherapy in rectal cancer. Ogura A, Akiyoshi T, Yamamoto N, Kawachi H, Ishikawa Y, Mori S, Oba K, Nagino M, Fukunaga Y, Ueno M. *Eur J Cancer*. 2018 Mar;91:11-20.

3. Serum miR-143 levels predict the pathological response to neoadjuvant chemoradiotherapy in patients with locally advanced rectal cancer. Hiyoshi Y, Akiyoshi T, Inoue R, Murofushi K, Yamamoto N, Fukunaga Y, Ueno M, Baba H, Mori S, Yamaguchi T. *Oncotarget*. 2017 Mar 31;8(45):79201-79211.

4. Transposon insertional mutagenesis in mice identifies human breast cancer susceptibility genes and signatures for stratification. Chen L, Jenjaroenpun P, Pillai AM, Ivshina AV, Ow GS, Efthimios M, Zhiqun T, Tan TZ, Lee SC, Rogers K, Ward JM, Mori S, Adams DJ, Jenkins NA, Copeland NG, Ban KH, Kuznetsov VA, Thiery JP. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2017 Mar 14;114(11):E2215-E2224.

5. Establishment of a Novel Histopathological Classification of High-Grade Serous Ovarian Carcinoma Correlated with Prognostically Distinct Gene Expression Subtypes. Murakami R, Matsumura N, Mandai M, Yoshihara K, Tanabe H, Nakai H, Yamanoi K, Abiko K, Yoshioka

- Y, Hamanishi J, Yamaguchi K, Baba T, Koshiyama M, Enomoto T, Okamoto A, Murphy SK, Mori S, Mikami Y, Minamiguchi S, Konishi I. *Am J Pathol*. 2016 May;186(5):1103-13.
6. Mouse models for ROS1-fusion-positive lung cancers and their application to the analysis of multikinase inhibitor efficiency. Inoue M, Toki H, Matsui J, Togashi Y, Dobashi A, Fukumura R, Gondo Y, Minowa O, Tanaka N, Mori S, Takeuchi K, Noda T. *Carcinogenesis*. 2016 May;37(5):452-60.
7. Identification of AIM2 as a downstream target of JAK2V617F. Liew EL, Araki M, Hironaka Y, Mori S, Tan TZ, Morishita S, Edahiro Y, Ohsaka A, Komatsu N. *Exp Hematol Oncol*. 2016 Jan 28;5:2.
8. Laparoscopic Anterior Pelvic Exenteration with Super Radical Parametrectomy for a Recurrent Low-Grade Endometrial Sarcoma That is Resistant to Hormone Therapy and Chemotherapy. Kanao H, Hisa T, Omi M, Nagashima M, Okamoto S, Aoki Y, Tanigawa T, Matoda M, Okamoto S, Nomura H, Omatsu K, Kato K, Utsugi K, Takeshima N. *J Minim Invasive Gynecol*. 2018 Apr 3. pii: S1553-4650(18)30176-6.
9. Oral leukoplakia, a precancerous lesion of squamous cell carcinoma, in patients with long-term pegylated liposomal doxorubicin treatment. Nomura H, Sakamoto K, Sugihara T, Okamoto S, Aoki Y, Tanigawa T, Matoda M, Omatsu K, Kanao H, Kato K, Utsugi K, Sugiyama Y, Takeshima N. *Medicine (Baltimore)*. 2018 Feb;97(7):e9932.
10. Secondary debulking surgery for para-aortic nodal recurrence in endometrial cancer requiring circumferential resection of the inferior vena cava. Kato K, Okamoto S, Ota E, Takeshima N. *Gynecol Oncol*. 2018 Apr;149(1):221-222.
11. Maintenance hormonal therapy after treatment with medroxyprogesterone acetate for patients with atypical polypoid adenomyoma. Nomura H, Sugiyama Y, Tanigawa T, Matoda M, Okamoto S, Omatsu K, Kanao H, Kato K, Utsugi K, Takeshima N. *Jpn J Clin Oncol*. 2018 Mar 1;48(3):255-258.
12. Efficacy of Transanal Drainage Tube Placement After Modified Posterior Pelvic Exenteration for Primary Ovarian Cancer. Kato K, Omatsu K, Matoda M, Nomura H, Okamoto S, Kanao H, Utsugi K, Takeshima N. *Int J Gynecol Cancer*. 2018 Feb;28(2):220-225.
13. Comparison of secondary cytoreductive surgery plus chemotherapy with chemotherapy alone for recurrent epithelial ovarian, tubal, or peritoneal carcinoma: A propensity score-matched analysis of 112 consecutive patients. Takahashi A, Kato K, Matsuura M, Katsuda T, Matoda M, Nomura H, Okamoto S, Kanao H, Kondo E, Omatsu K, Utsugi K, Takeshima N. *Medicine (Baltimore)*. 2017 Sep;96(37):e8006.
14. Survival and safety associated with aggressive surgery for stage III/IV epithelial ovarian cancer: A single institution observation study. Tate S, Kato K, Nishikimi K, Matsuoka A, Shozu M. *Gynecol Oncol*. 2017 Oct;147(1):73-80.
15. Total Laparoscopic Resection Surgery for a Cervical Carcinoma that Recurred in the Pelvic Sidewall After Radical Hysterectomy and Adjuvant Concurrent Chemoradiotherapy. Kanao H, Aoki Y, Kato K, Matoda M, Okamoto S, Nomura H, Omatsu K, Utsugi K, Takeshima N. *J Minim Invasive Gynecol*. 2017 Sep - Oct;24(6):899-900.
16. Extraction of a specimen through an umbilical zigzag incision during laparoscopic surgery for endometrial cancer. Kato K, Hisa T, Matoda M, Nomura H, Kanao H, Utsugi K, Takeshima N. *World J Surg Oncol*. 2017 May 30;15(1):110. doi: 10.1186/s12957-017-1180-x.
17. Clinicopathological Features of Early and Late Recurrence of Endometrial Carcinoma After Surgical Resection. Takahashi A, Matsuura M, Matoda M, Nomura H, Okamoto S, Kanao H, Kondo E, Omatsu K, Kato K, Utsugi K, Takeshima N. *Int J Gynecol Cancer*. 2017 Jun;27(5):967-972.
18. Secondary debulking surgery for isolated pelvic nodal recurrence requiring external iliac vein excision and reconstruction in a patient with ovarian cancer. Kato K, Nomura H, Nagashima M, Takeshima N. *Gynecol Oncol*. 2016 Dec;143(3):684-685.
19. Cytoreduction of diaphragmatic metastasis from ovarian cancer with involvement of the liver using a ventral liver mobilization technique. Kato K, Katsuda T, Takeshima N. *Gynecol Oncol*. 2016 Mar;140(3):577-9.
20. Timing of Intrauterine Manipulator Insertion During Minimally Invasive Surgical Staging and Results of Pelvic Cytology in Endometrial Cancer. Machida H, Casey JP, Garcia-Sayre J, Jung CE, Casabar JK, Moeini A, Kato K, Roman LD, Matsuo K. *J Minim Invasive Gynecol*. 2016 Feb 1;23(2):234-41.
21. Clinical usefulness of the oral chemotherapy agent S-1 in heavily

pre-treated patients with advanced or recurrent cervical cancer. Tanigawa T, Matoda M, Yamamoto A, Nomura H, Okamoto S, Sakamoto K, Kondo E, Omatsu K, Kato K, Takeshima N. Arch Gynecol Obstet. 2016 Mar;293(3):633-8.

22. A Multi-Institutional Feasibility Study on the Use of Automated Screening Systems for Quality Control Rescreening of Cervical Cytology. Sugiyama Y, Sasaki H, Komatsu K, Yabushita R, Oda M, Yanoh K, Ueda M, Itamochi H, Okugawa K, Fujita H, Tase T, Nakatani E, Moriya T. Acta Cytol. 2016;60(5):451-457.

23. Touch cytology smear of an inflammatory hepatocellular adenoma displaying an unusual pattern: A case report. Kanda H, Furuta R, Motoi N, Suzuki N, Furuta N, Komatsu K, Sugiyama Y, Saiura A, Sugitani M, Ishikawa Y. Diagn Cytopathol. 2016 Dec;44(12):1074-1077.

24. Long-term outcomes of fertility-sparing treatment of atypical polypoid adenomyoma with medroxyprogesterone acetate. Nomura H, Sugiyama Y, Tanigawa T, Matoda M, Kanao H, Kondo E, Takeshima N. Arch Gynecol Obstet. 2016 Jan;293(1):177-81.

〔学会発表〕(計0件)

〔図書〕(計0件)

〔産業財産権〕

出願状況(計0件)

取得状況(計0件)

〔その他〕

ホームページ等

なし

6. 研究組織

(1)研究代表者

森 誠一 (Seiichi Mori)

公益財団法人がん研究会・がんプレジヨン医療研究センター 次世代がん研究シーズ育成プロジェクト・プロジェクトリーダー

研究者番号：10334814

(2)研究分担者

杉山 裕子 (Yuko Sugiyama)

公益財団法人がん研究会・有明病院 細胞診断部・部長

研究者番号：80322634

(3)研究分担者

加藤 一喜 (Kazuyoshi Kato)

公益財団法人がん研究会・有明病院 婦人科・医長

研究者番号：80399451

(4)研究協力者

西子 里香 (Rika Nishiko)

公益財団法人がん研究会・がんプレジヨン医療研究センター 次世代がん研究シーズ育成プロジェクト・特任研究助手