

令和 2 年 6 月 8 日現在

機関番号：32612

研究種目：若手研究

研究期間：2018～2019

課題番号：18K16746

研究課題名（和文）シングルセルRNAシーケンス法を用いた新規抗癌剤耐性誘導遺伝子の探索と機能解析

研究課題名（英文）Single-cell RNA-seq reveals the platinum resistance genes and their function.

研究代表者

丹羽 直也（NIWA, NAOYA）

慶應義塾大学・医学部（信濃町）・講師（非常勤）

研究者番号：40626743

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,200,000円

研究成果の概要（和文）：マウス膀胱癌細胞株MBT2に蛍光蛋白質であるGFP遺伝子を導入した独自の細胞株を樹立した。このGFPで標識したマウス膀胱癌細胞株を用いて正所性および異所性（皮下）膀胱癌モデルマウスを作成した。このモデルマウスから得られた腫瘍塊から、GFPで標識したがん細胞を生きたまま効率よく1細胞毎に回収するプロトコルを確立した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

シングルセルRNAシーケンス法は腫瘍塊を形成する細胞集団の転写産物(RNA)を1細胞毎に網羅的に解析できる画期的な技術であるが、実際の腫瘍塊を用いての解析では超えるべきハードルが多い。

本研究においては、GFP遺伝子を導入したマウス膀胱癌細胞株を用いて正所性膀胱癌マウスを独自に樹立、マウス膀胱癌腫瘍塊から生きたまま腫瘍細胞のみを生きたまま効率よく1細胞毎に回収するプロトコルを確立した。

本研究は膀胱癌のみならず他癌のモデルマウスも含めて腫瘍塊の1細胞毎の解析を可能にする。

研究成果の概要（英文）：We have introduced the green fluorescent protein (GFP), a novel fluorescent genetic reporter, into a mouse bladder tumor cell line (MBT2). We have established an murine orthotopic and subcutaneous bladder tumor model using the cell line. We have also developed an novel protocol to collect only tumor cells from bulk tumor.

研究分野：尿路上皮癌

キーワード：尿路上皮癌 抗がん剤耐性 腫瘍内不均一性 シングルセルRNAシーケンス法

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

転移・再発性尿路上皮癌における標準治療はシスプラチン(CDDP)を基盤とする多剤併用化学療法である。しかし奏効率は低く、奏功した場合でも一時的であり多くの場合その後耐性化する。このCDDP耐性尿路上皮癌は難治性癌の一つであり、尿路上皮癌臨床における喫緊の課題である。近年のシーケンス技術の発展に伴い、細胞形質を変化させる新たな遺伝子変異や、酸化ストレス、低酸素刺激など、癌微小環境が促すエピジェネティック変化が腫瘍内で不均一に生み出されていることが明らかとなっている。我々はCDDP抵抗性尿路上皮癌を克服する新規アプローチとしてこの腫瘍内不均一性(Intratumor heterogeneity; ITH)に着目した。同一腫瘍内に存在する異なったトランスクリプトームを持つ複数の細胞集団が、化学療法の選択圧(Selective pressure)により、最も生存に適するサブクローンを生み出すことが示されている。CDDP治療後に生き永らえる癌細胞(サブクローン)が有する特徴およびその起源、もともと腫瘍内に存在するサブクローンなのか治療過程で新たに出現するのか、を明らかにすることがCDDP抵抗性の克服につながると考えた。細胞毎に異なる多様性を有する癌組織では、RNAシーケンス・マイクロアレイに代表される従来の細胞集団解析では明確な答えにたどりつくことはできなかった。近年の1細胞毎にゲノム異常、トランスクリプトームを解析する技術の急速な発展により、単一細胞毎に含まれるmRNAをDNAに変換・増殖させ、定量的にRNAをシーケンスする「シングルセルRNAシーケンス」が可能となった。本研究では革新的技術であるシングルセルRNAシーケンスを用いてCDDP耐性機構に寄与する治療標的を1細胞レベルで明らかにする。

2. 研究の目的

近年、1細胞毎にゲノム異常、トランスクリプトームを解析する技術が急速に発展している。「シングルセルRNAシーケンス」は、単一細胞毎に含まれるmRNAをDNAに変換・増殖させ、定量的なRNAシーケンスを可能とする革新的な研究手法である。細胞内にmRNAの100倍含まれるrRNAを避けてmRNAのみをシーケンスすることで、単一細胞の遺伝子発現量を網羅的に計測する。本申請に先立つ先行研究で、CDDP耐性尿路上皮癌におけるITHの解明並びに1細胞レベルでの治療標的探索を目的としてヒト尿路上皮癌5637細胞と、独自に樹立したCDDP耐性5637PR細胞に対して、CDDP耐性獲得前後の時間軸に沿ったシングルセルRNAシーケンスを行った。この内、直接的な腫瘍形成を担うProtein-coding geneに着目した解析では、CDDP耐性獲得に伴い誘導される異なったトランスクリプトームを有する細胞集団が確認され、4種のライブラリーデータを組み合わせた分析では、12遺伝子の発現低下がCDDP耐性の誘因に成り得る可能性が示唆された。この12遺伝子を中心に、CDDP治療が誘導するITH並びにシングルセルが示すトランスクリプトームから、CDDP耐性克服の分子基盤の確立を第一の目的とした。これまでシングルセル解析は専らin vitroのみで行われてきたが、in vitroでは腫瘍細胞と免疫細胞や線維芽細胞との真の相互関係は解析できない。そこで、得られた研究成果はin vivo(マウス腫瘍モデル)で検証すべくプロトコルの確立を試みた。

3. 研究の方法

(1) 平成30年度：先行研究で得られた、CDDP耐性獲得前後の時間軸に沿うシーケンスライブラリーデータから、CDDP治療に伴い誘導されるITH変化やCDDP耐性獲得後に減少する特定の遺伝子発現を同定した。先行研究のSiRNA法では、12標的遺伝子(ARL6IP1, CDKN3, COX7B, EIF3E, HES1, KRT17, LGALS1, MORF4L1, MT1E, PSMD1, TMA7, UQCR10)のうち8遺伝子で、ノックダウン後の有意なCDDP耐性獲得を認めた。また、特定のSiRNA法を組み合わせる事により、各々単独でノックダウンさせた場合よりCDDP耐性が亢進することが確認された。この結果はCDDP耐性獲得には、複数遺伝子の発現変化が原因であることを強く示す。更に一部の標的遺伝子の発現低下は、膀胱癌TCGAデータベース(Cancer Genome Atlas Research Network, Nature 2014)において有意に予後と相関した。これらのヒト膀胱癌細胞株を用いた検討で得られた結果の臨床的妥当性を検討した。当院のヒト膀胱癌組織検体を用いてin situ hybridizationおよび免疫化学組織を用いてmRNAおよびタンパク質レベルでの発現を検討した。

(2) 令和1年度：In vivoにおいてシングルセル解析を行うべくプロトコルを検討した。実際には、マウス正所性および皮下腫瘍モデルを作成すること、得られた腫瘍塊を1細胞毎に単離する、単離したからなる細胞懸濁液が腫瘍細胞のみをソーティング、等超えるべきハードルは高い。この1つ1つの過程について検討した。

4. 研究成果

(1) 平成30年度：発現低下とCDDP耐性の関連が示唆された12の標的遺伝子のうち、特にCOX7Bに着目した。TCGAのデータベースにおいてはCOX7Bが発現低下しているとCDDP治療後に病勢が進行しやすいことを確認した。膀胱全摘症例において、術前化学療法を施行した群では未施行群と比較してCOX7Bの発現が低いことを免疫組織化学で確認した。同一症例において、膀胱癌診断時のTUR標本と化学療法後の膀胱全摘標本でCOX7Bの発現を比較したところ、化学療法後ではCOX7Bの発現が低下していることを免疫組織化学で確認した。

(2) 令和1年度：マウス正所性および皮下腫瘍モデルを用いたシングルセルRNAシーケンス

の実験プロトコルを開発した。マウス正所性腫瘍および皮下腫瘍は当然ながら腫瘍細胞のみならず免疫細胞、線維芽細胞といった様々な細胞が混在している。従って腫瘍塊にシングルセル RNA シークエンスを適応する場合には、摘出した腫瘍塊から生きたまま 1 細胞毎に単離、その後腫瘍細胞のみを効率よくソーティングする必要がある。腫瘍細胞のみをソーティングするために、蛍光タンパク質 GFP を遺伝子導入したマウス膀胱癌細胞株 MBT2 を作成し、In vitro において数世代の継代でも GFP の発現が維持されていることを確認した。次に GFP を導入した MBT2 を用いてマウス正所性および皮下腫瘍モデルを作成し、摘出した腫瘍塊の腫瘍細胞では GFP が発現していることを確認した。通常の複数の細胞腫瘍塊から単離された細胞は生存期間が短く、冷凍保存した場合には解凍した際に死んでしまう細胞が多いことから効率よく回収できない。そこで最新のセルソーターおよびシングルセル解析装置である ICELL8®への良好なアクセスを確保し、腫瘍塊から細胞を単離し、GFP2 を発現している細胞のみを回収できることを確認した。同時に CD8 を始めとする免疫細胞も同じ腫瘍塊から単離できることも確認した。今後、この確立された方法を用いて、正所性および皮下腫瘍モデルに薬剤投与を行い、時間軸に沿ったシークエンスライブラリーの確立を試みる。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計1件（うち査読付論文 1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 Tanaka Nobuyuki, Katayama Shintaro, Reddy Aparna, Nishimura Kaneyasu, Niwa Naoya, Hongo Hiroshi, Ogiwara Koichiro, Kosaka Takeo, Mizuno Ryuichi, Kikuchi Eiji, Mikami Shuji, Miyakawa Ayako, Arenas Ernest, Kere Juha, Oya Mototsugu, Uhlen Per	4. 巻 7
2. 論文標題 Single-cell RNA-seq analysis reveals the platinum resistance gene COX7B and the surrogate marker CD63	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Cancer Medicine	6. 最初と最後の頁 6193 ~ 6204
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1002/cam4.1828	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 -

〔学会発表〕 計0件

〔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
研究協力者	田中 伸之 (TANAKA NOBUYUKI) (60445244)	慶應義塾大学・医学部(信濃町)・助教 (32612)	