

令和 4 年 5 月 31 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：19K08363

研究課題名(和文) 一細胞解析による予後不良AFP産生胃癌の癌発生機構

研究課題名(英文) Single cell analysis revealed heterogeneous transcription factor profile of highly metastatic AFP-producing gastric cancer.

研究代表者

野中 綾 (Nonaka, Aya)

東京大学・先端科学技術研究センター・特任研究員

研究者番号：50786621

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,400,000円

研究成果の概要(和文)：AFP産生胃癌(AFPGC)は頻度が低いが高頻度に肝臓に転移し予後不良な胃癌であるが、これまで、癌発生の機序はほとんど解明されていない。本研究はオルガノイドを使用し、AFPGCの性質を解明すること目的とした。AFPGCは分化誘導により、肝臓様と腸管様の二方向へ分化することが明らかになり、AFPが発現する細胞は一部の細胞であることが明らかになった。分化方向によりHNF4Aの発現量はほぼ変化しないが、オープンクロマチン領域が異なることが明らかになり、特にHNF4Aのモチーフが大きく異なった。HNF4Aアイソフォームの発現差により、AFPGCオルガノイドの分化方向を決定する可能性が示された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究はこれまで免疫組織染色や症例報告などにとどまり、癌発生の機序はほとんど解明されていないAFPGCについて、一細胞解析を行うことによりその性質を明らかにした。AFPはAFPGCの腫瘍マーカーであるが、本研究でAFPGCの一部の細胞でしか発現が見られないことが明らかになった。またAFPGCの二方向性への分化は一つの転写因子のアイソフォームの発現差が関与していることが示され、AFPGCの発生機序解明への足掛かりになると考えられる。

研究成果の概要(英文)：Alpha-fetoprotein producing gastric cancer (AFPGC) is a rare group of gastric cancers, but it frequently metastasizes to the liver and has a poor prognosis. However, AFPGC has been limited to immunostaining and case reports, and the mechanism of cancer development is poorly understood. In the present study, we identified the heterogeneity of AFPGC organoids established from clinical samples by single cell analysis. We observed that AFPGC organoids consist of two subpopulations differentiating into either hepatocyte-like or intestine-like cells in Wnt3a-free medium by single-cell RNA (scRNA) sequencing. Furthermore, by merging the data from single-cell ATAC and scRNA analysis, we identified that The enrichment rate of the HNF4A motif differs in the direction of differentiation. Differential expression of HNF4A isoforms may determine the direction of differentiation of AFPGC organoids.

研究分野：分子生物学

キーワード：AFP産生胃癌 オルガノイド 一細胞解析

1. 研究開始当初の背景

(1) AFP 産生胃癌

胃癌は癌のなかで世界第5位の罹患率であり、特に日本を含む東アジアや南米での罹患率が高い。近年の遺伝子発現解析やゲノム解析により胃癌はいくつかの群に分類され、その一つに α フェトプロテイン (AFP) を産生する胃癌 (以下、AFP 産生胃癌) が存在する。AFP 産生胃癌は全胃癌の1.6~5.4%の頻度であるが肝臓に高頻度で転移することが知られ、5年生存率が11.6%~28.4%と胃癌全体(73%)と比べて予後不良である。AFP 産生胃癌は他の胃癌とは異なり、肝臓に類似した遺伝子を発現している事が知られている。その遺伝子を代表する AFP は、正常組織では胎児肝細胞で発現がみられるのに対し、肝臓などの一部の癌において高レベルに発現し、主に腫瘍マーカーとして用いられている。このように肝臓様の遺伝子発現様式と肝臓への転移能との関連が予想されるものの、どのような分子が AFP 産生胃癌を引き起こすのか、その発生過程のメカニズムについてはあまり明らかにされていない。AFP 産生胃癌由来の細胞株が少なく、また通常の培養皿上での二次元培養では細胞増殖が極端に遅いことも研究が進まない一因であると考えられる。

(2) 細胞の不均一性と癌幹細胞

癌組織から樹立した癌細胞株はディッシュ上で容易に増殖が可能であり、再現性良く実験ができ、遺伝子の機能解析や抗癌剤のスクリーニングに用いられてきた。しかしながら、均一な細胞集団に見える癌細胞株にも不均一性があり、一部の細胞が造腫瘍能を持つこと、あるいは抗癌剤耐性を持つこと (Bhang et al. 2015 *Nat Med*) が報告された。これらは癌組織における癌幹細胞という概念、すなわち、自己複製能と多分化能を持つ少数の癌幹細胞とそこから分化した細胞によって不均一な癌組織が形成される、ということと一致する。従って、癌幹細胞のようなレアな細胞集団の特性を観察することが癌の発生や進展のメカニズムを明らかにする上で必要であり、そのために本研究では以下に述べるような一細胞解析を行う。

2. 研究の目的

予後不良な AFP 産生胃癌の分子機構の報告は少なく、発癌および肝臓様の形質獲得の機構は解明されていない。本研究の目的は一細胞解析により AFP 産生胃癌の癌幹細胞の同定および発癌のメカニズムを明らかにする事である。

3. 研究の方法

実験手法1: 一細胞 RNA-seq・ATAC-seq 解析による AFP 産生胃癌の細胞集団同定

本課題では、AFP 産生胃癌を構成する、個々の細胞の遺伝子発現様式および遺伝子発現制御機構を明らかにする。まず AFP 産生胃癌由来の細胞株を、細胞外基質を含むマトリゲル中で三次元培養を行い癌オルガノイドを形成させる。癌オルガノイドを回収し、細胞を分離した後、Chromium (10x Genomics 社) の一細胞 RNA-seq および ATAC-seq 試薬を用いてライブラリーを作成し超並列シーケンサーで解析する。得られたシーケンスデータはそれぞれ、Scanpy (RNA-seq) および snapATAC (ATAC-seq) の解析ツールを用い、UMAP (Uniform Manifold Approximation and Projection) を用いて各サブpopulationに分解する。既存の胃細胞マーカーの発現量や遺伝子オンロジー解析(GO)を指標として、各細胞群の特性を抽出し、細胞群のマーカー遺伝子を同定する。また、オープンクロマチン領域を比較し、細胞群間で有意差のある領域についての配列解析を行い、特長を規定する転写因子を同定する。正常の胃由来オルガノイドについても同様の解析を行い、AFP 産生胃癌と比較することで癌特異的なマーカーの同定、発癌への関与が示唆される転写因子群の抽出を行う。

実験手法2: AFP 産生特異的な発現を呈する分子の抑制解析

実験手法1で同定した遺伝子を CRISPR/Cas9 を用いて抑制し、AFP 産生胃癌における遺伝子の機能を観察する。オルガノイド形成後の細胞には遺伝子導入が困難あるいは不均一であることが知られているが、分離後の細胞にはウイルスベクターによって遺伝子導入が効率良く行われることが報告されている。標的遺伝子に対する shRNA あるいは CRISPR/Cas9 系のガイド RNA を設計し、レンチウイルスにて細胞へ導入することで遺伝子のノックダウン・ノックアウト

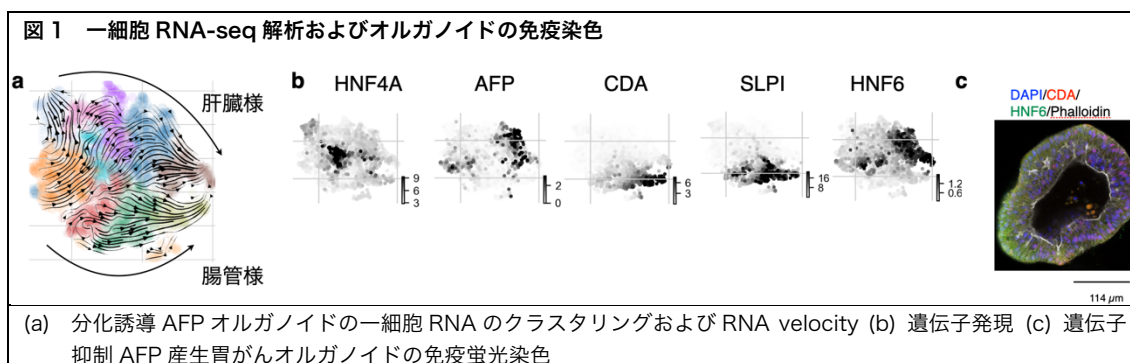
トを行う。導入された細胞を選択マーカーで濃縮し、再度三次元培養を行いオルガノイド形成能を観察する。また、遺伝子発現解析を行い、それぞれのクラスターのマーカー遺伝子の発現を確認する。

実験手法3：クラスター特異的アイソフォームの同定解析

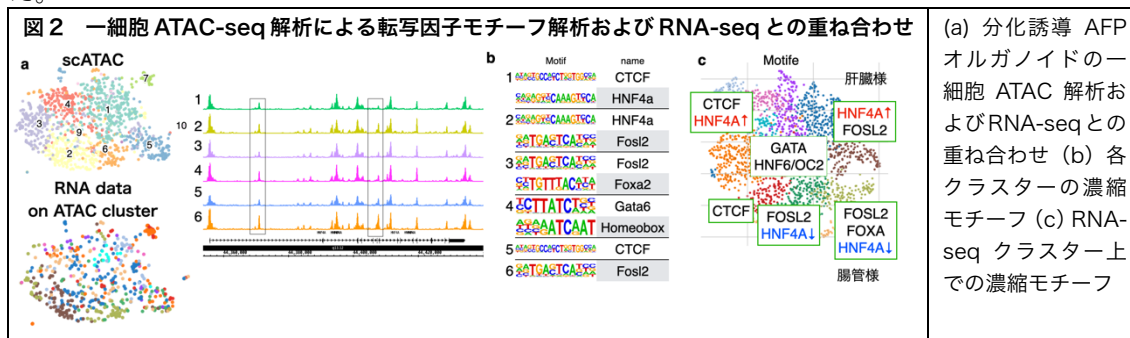
従来の一細胞解析は多くの RNA 分子を解析する事ができるが、断片化 (300 kb 程度) したライブラリーの3'末端の配列を読むため、複数のアイソフォームを持つ分子の同定は困難であった。そこで、断片化前の一細胞ライブラリーを用いて PacBio 社の ISO-Seq を用いてロングリード解析を行なう。得られたデータはセルバーコードが含まれており、同一ライブラリーから得られたショートリード解析結果と重ね合わせ、クラスターごとのアイソフォームの同定を行う。

4. 研究成果

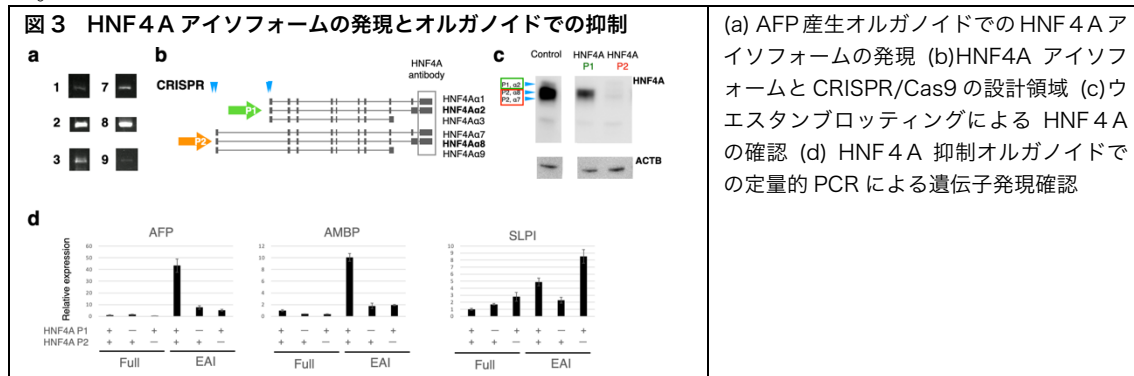
一細胞 RNA-seq 解析により AFP 産生胃がんオルガノイドは、WNT や R-spondin 等を含む幹細胞維持培地 (Full) 培養の細胞では細胞周期の状態のみで各クラスターに分類されたが、分化誘導培地 (EAI) 培養では二方向性のクラスターに分類された (図 1-a)。AFP は EAI 培養の一部のクラスターのみで発現が認められたが、これは、AFP 産生胃がんの組織染色において、AFP が一部の細胞でしか染色されないことと一致していた。RNA-velocity 解析により細胞分化方向が示され細胞周期 G1 期に 2 つのクラスターに分かれた。それぞれのクラスター特異的に発現している遺伝子を CellMarker のリストと比較すると、上部クラスターは肝臓様に、下部クラスターは腸管様に類似していることが明らかになった (図 1a-b)。また、それぞれのクラスター特異的に発現している分子を選出し、一細胞 RNA-seq で同定されたクラスターが実際に存在するのか、蛍光免疫染色を行なった。その結果、同一オルガノイド内で肝臓用クラスターのマーカーである HNF6 と腸管様クラスターのマーカーの CDA が同時に染色された (図 1c)。このことは一細胞から両方のクラスターに実際に分化していることを示している。



次に AFPGC のオルガノイド分化にどの様な転写因子が関与しているか同定するために、EAI 培養 AFP 産生オルガノイドの一細胞 ATAC-seq 解析を行なった (図 3a)。得られたデータは解析ツール SnapATAC を用い UMAP により大きく 6 つのクラスターに分類された。それぞれのクラスター特異的にオープンになっているゲノム領域を FDR 値の上位 2000 か所を抽出し、どの様な転写因子モチーフが濃縮しているのか、HOMER を用いて解析した (図 3b)。その結果 GATA、HNF4A および HNF6 等の肝臓の分化に重要な転写因子が濃縮することがわかった。また一細胞 ATAC-seq のデータを in silico で一細胞 RNA-seq のデータと紐付けを行なった。この手法は TSS 近傍にクロマチンオープン領域がある場合は遺伝子が発現しているとみなし、発現状態が類似する細胞を一細胞 RNA-seq のデータから抽出する (図 3a)。その結果、上部の肝臓様クラスターでは HNF4A のモチーフが濃縮し、下部の腸管様クラスターでは他の細胞集団と比較し HNF4A モチーフの濃縮率は低下していた (図 3c)。しかし一細胞 RNA-seq 解析のクラスター中心部で HNF4A の発現は亢進しているが、その他のクラスターでの発現はほぼ均一であった (図 1b)。このことは、HNF4A の働きは発現量だけでは、明らかにできない機構があると考えられた。



HNF4A は肝臓の分化で鍵になる転写因子であり、P1 と P2 の二つのプロモーターを持ち複数のアイソフォームが存在する。本実験で用いているオルガノイドで HNF4A のアイソフォーム特異的 PCR を行うと、P1 プロモーター由来の HNF4A $\alpha 2$ と P2 由来の $\alpha 8$ が主に発現していることが明らかになった (図 3a)。ATAC 解析で得られた、クラスターによる HNF4A モチーフの濃縮の違いが発現するアイソフォームの違いによるものと考え、P1 および P2 由来の HNF4A をそれぞれ CRISPR/Cas9 を用いてそれぞれ抑制した (図 3b-c)。それぞれのノックアウトオルガノイドを Full 培地および EAI 培地で培養し、肝臓様クラスターのマーカー (AFP・AMBP)、腸管様マーカー (SLPI) の発現を確認した (図 3d)。その結果 P1-HNF4A を抑制すると、AFP 産生オルガノイドは分化誘導しても両方のマーカーの発現は亢進せず、P2-HNF4A を抑制すると肝臓様マーカーは亢進しないが、腸管様マーカーはコントロールと比較しても有意に亢進した。



これらの結果により、AFP 産生オルガノイドは分化誘導により、肝臓様と腸管様の二方向へ分化することが明らかになり、AFP が発現する細胞は一部のクラスターであることが明らかになった。分化方向により HNF4A の発現量はほぼ変化しないが、オープンクロマチン領域が一細胞 ATAC-seq 解析により異なることが明らかになり、特に HNF4A のモチーフが大きく異なった。HNF4A アイソフォームの発現差により、AFP 産生胃がんオルガノイドの分化方向を決定する可能性が示された。

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 1件）

1. 発表者名 野中 綾
2. 発表標題 一細胞解析で明らかになった高転移性AFP産生胃がんの不均一な転写因子プロファイル
3. 学会等名 第79回日本癌学会学術総会（国際学会）
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
---------	---------