

令和 4 年 6 月 13 日現在

機関番号：20101
研究種目：基盤研究(C) (一般)
研究期間：2019～2021
課題番号：19K08752
研究課題名(和文)1細胞遺伝子発現解析によるメラノーマ細胞の増殖及び免疫関連分子間の関係性の解明

研究課題名(英文)Characterization of the intratumoral ecosystem in melanoma by single-cell RNA-seq analysis

研究代表者
宇原 久(UHARA, HISASHI)

札幌医科大学・医学部・教授

研究者番号：40201355
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)：悪性黒色腫5例とメルケル細胞がん1例の手術検体について検討した。1例では、メラノーマ細胞は大きく5つのグループ(クラスター)に分けられ、2つのクラスターでは腫瘍細胞はMAPK系とHLAクラスIが高発現し、クラスIIとPD-L1の発現が少ないことを示している等の関係性が明らかになった。残りの5症例については細胞分離の段階で得られた細胞量が少ない、あるいはPCRの段階で次世代シーケンスに進める質が確保できず、微小ウエル内へのメラニン色素の沈降により酵素反応が進まない等の問題が発生した。フィルターなどを用いた対応を行ったが安定した手技が現時点では確率できていない。

研究成果の学術的意義や社会的意義

腫瘍組織には不均一性が存在するため、組織の塊を対象とした研究では平均化されたデータしか得られず、重要なサブグループの所見が埋もれてしまう可能性がある。本研究では完全に手技の確立に至らなかったが、1例において、腫瘍細胞におけるMAPK、AKT/PI3K関連の細胞増殖関連分子とHLAやPD-L1などの免疫関連分子の発現の関係性を明らかにすることができ、今後の研究の発展につながる糸口は見いだせたと考える。

研究成果の概要(英文)：The aim of the study is to establish of the method to obtain the single-cell gene expression of RNA in melanoma cells from the resected tumor samples. The method is planned according to the following steps (Hashimoto S, Scientific Reports 7;14225, 2017). In the first case, over expression of MAPK pathway-related molecules and HLA class 1 and lower expression of HLA class 2 and PD-L1 were observed in melanoma cells in 2 of 5 clusters. However, in next 5 examined cases, synthesis of cDNA of a single cell was not stable. We thought that melanin blocked the enzyme activity. We have tried several methods to remove melanin from tissue samples, however it has not been sufficient yet. Now, we test other methods including filters.

研究分野：皮膚科学

キーワード：シングルセルシーケンス 悪性黒色腫 バーコード

1. 研究開始当初の背景

現在メラノーマの治療の柱は、増殖や生存に関わる主なシグナル伝達経路としては RAS-MAPK 経路内の変異 BRAF 変異に対する BRAF 阻害薬と MEK 阻害薬の併用と免疫チェックポイントに関わる抗 PD-1 抗体、抗 CTLA-4 抗体の単独あるいは併用療法である。シグナル伝達経路と免疫チェックポイントは別の系と考えられてきたが、最近 BRAF などの細胞増殖に関わるシグナル系と腫瘍免疫との間の関連性が注目されており、全く異なった機序を持つ薬剤の併用療法を計画する上で包括的なデータが必要になってきた。しかし、細胞増殖関連分子も免疫関連分子もその数は多く、さらに症例間や同一腫瘍内における多様性のために、これまでのような腫瘍の塊を対象にし、かつ限られた候補分子についての検索では重要なサブグループの特性を見逃している可能性がある。

申請者は 2011 年より、BRAF 阻害薬と MEK 阻害薬、抗 PD-1 抗体、抗 CTLA-4 抗体、抗 LAG-3 抗体、IDO 阻害薬、腫瘍溶解性ウイルスの国内治験に調整医師として関わってきた (Review article, Int J Clin Oncol 2018)。患者の体内における腫瘍量や腫瘍の遺伝子変異をリアルタイムに検出するリキッドバイオプシーの開発が必要と考え、末梢血中に循環しているメラノーマ細胞の採取と解析法の構築 (Br J Cancer 2012)、次に末梢血中の cell free DNA から BRAF 変異の量をリアルタイムあるいはデジタル PCR を用いて解析し (基盤研究 C 分担 2014-2016: Acta Derm Venereol 2016)、メラノーマの腫瘍量の予測指標である血清 LDH 値や血清 5-S-CD 値より俊敏に薬剤耐性の出現を捉えることを明らかにしてきた。さらに、2016 年からは末梢血中の腫瘍細胞由来 RNA の解析を試み、現在、thyrosinase、MART-1、gp100、TRP の 4 つの分子の発現を確認しているところである (基盤研究 C 代表 2016-2018)。しかし遺伝子発現については、もっと網羅的かつ探索的に行う必要があると考えるに至った。

2. 研究の目的

(1) 腫瘍内において個々のメラノーマ細胞における増殖関連分子の発現と PD-L1 や HLA などの免疫関連分子の発現との関連性はどのようにになっているのか?

これまで、メラノーマの手術検体を用いて細胞増殖に関わる分子群の発現や遺伝子変異、腫瘍免疫の側面から PD-L1、PD-1、HLA の発現、CD8 陽性 T リンパ球や制御性 T リンパ球や腫瘍浸潤マクロファージなどの多寡が解析されてきたが、同一細胞において細胞増殖に関わる複数の分子群と免疫関連分子群相互の関連性を検証した報告はほとんどない。また、組織全体を用いた検索では平均化された結果しか得られず、遺伝子発現が同じ特性をもった細胞群にみられる現象なのか、もともと異なったサブグループの違いをみているのかわからない。

そこで、我々は研究協力者である橋本真一教授 (金沢大学) が開発した細胞 1 個ずつについて RNA 発現を網羅的に検索できる手法を用いて、メラノーマの解析を 2017 年より開始した。

(2) 治療の前後でサブグループはどのように変化するのか?

薬剤耐性は進行がんの薬物療法における深刻な問題である。耐性機序については薬物にさらされた腫瘍細胞の中から新規の変異体が生まれてくるのか、あるいはもともと薬剤耐性を持ったサブクラス細胞の生き残りの増殖などが考えられる。しかし薬剤耐性の研究の多くは培養細胞を用いたものであり、実際の腫瘍内での変化については十分に検討できていない。本研究における解析では、同じメラノーマ細胞集団を発現頻度の高い遺伝子群によってサブグループに分けることが可能である。橋本らは卵巣がんでは薬物投与前後であるサブグループが消失するが、一部のサブグループに変化がないことを報告している。治療の前後で採取した腫瘍組織のサブグループの変化を解析することで耐性機序の解明や治療薬の選択に有用なマーカーの発見につながる可能性がある。

3. 研究の方法

本研究では、マイクロウェルへの細胞の散布から cDNA 合成までの手技の安定化の向上を目指しながら、まずはメラノーマの細胞集団を増殖関連分子の発現が多いサブグループに分け、その集団における免疫関連分子の発現について解析する。

(1) 細胞標識用のバーコードビーズとマイクロウェルの作成

エマルジョン PCR (水滴中で 1 分子を増幅する技術) でマイクロビーズ (あらかじめ任意のプライマーサイトが数 100 万付加されている) 上に 12 個の塩基バーコードを含む合成オリゴ DNA 1 分子を増幅させる (4 の 12 乗の種類のバーコードが出来上がる)。

(2) 細胞とバーコードビーズをマイクロウェルに撒く

サイズが横 25 μm 、深さ 40 μm (用量 20 pL) のマイクロウェル (1 プレートあたり 20 万個) 上に切除標本を酵素でバラバラにした細胞とバーコードビーズを撒く。ポアソン分布に従い全ウェル数の 1/30 の細胞数を撒けば 98% の確率で 1 ウェルに 1 個の細胞が入るので、1 ウェルあたり約 7000 個の細胞が解析できる。ウェルに入っていない細胞を洗い流した後、顕微鏡でマイクロウェルに 1 個ずつ細胞が入っているか確認する。

(3) 細胞溶解と細胞由来 RNA が付着したビーズの回収と cDNA の合成

溶解後に、溶けだした mRNA がビーズ上のオリゴ dT に直ちに結合する。遠心で細胞由来 RNA が付着したビーズをチューブに回収し、逆転写酵素で cDNA を合成する。

(4) 次世代シーケンサーでバーコードと遺伝子の部分を別々に読み、ソフトで解析する。

4. 研究成果

悪性黒色腫 5 例とメルケル細胞がん 1 例の手術検体について検討できた。1 例は最終工程まで進めることができ、次世代シーケンサーにより発現している mRNA を同定でき、解析を行っている。この症例では、メラノーマ細胞は大きく 5 つのグループ (クラスター) に分けられ、2 つのクラスターでは腫瘍細胞は MAPK 系と HLA クラス I が高発現し、クラス II と PD-L1 の発現が少ないことを示している等の関係性が明らかになった。残りの 5 症例については細胞分離の段階で得られた細胞量が少ない、あるいは PCR の段階で次世代シーケンスに進める質が確保できず、最終解析まで進めることができなかった。現在、研究工程を阻害している可能性のある、メラニンの除去、と組織から効率的に 1 細胞ずつに分離できる新たな酵素を使用して方法の改善を図った。しかし、微小ウェル内へ細胞が落ち込む前に、メラニン色素の沈降が起き、メラニン色素により酵素反応が進まない等の問題が発生した。フィルターなどを用いた対応を行ったが安定した手技が現時点では確率できていない。現在、別の方法を試している。

The aim of the study is to establish of the method to obtain the single-cell gene expression of RNA in melanoma cells from the resected tumor samples. The method is planned according to the following steps (Hashimoto S, Scientific Reports 7;14225, 2017); 1) Melanoma cells was obtained from the resected tumor samples. The cell mixture was digested with collagenase and dispase. 2) the comprehensive single cell transcriptome analysis a) preparation of polystyrene beads conjugated with barcode nucleotides and of oligo-dTs by means of emulsion PCR. b) placing a barcoded bead into a well and mixing a single cell with a barcoded bead. c) adding a population of heterogeneous cells and beads into 20-pL wells molded in polydimethylsiloxane slides. 3) Synthesis of cDNA of a single cell. 4) Generation of NGS library. 5) Mapping and annotation by using software. 6) Clustering analysis and cell classification. 7) Statistical analysis. In the first case, over expression of MAPK pathway-related molecules and HLA class 1 and lower expression of HLA class 2 and PD-L1 were observed in melanoma cells in 2 of 5 clusters. However, in next 5 examined cases, synthesis of cDNA of a single cell was not stable. We thought that melanin blocked the enzyme activity. We have tried several methods to remove melanin from tissue samples, however it has not been sufficient yet. Now, we test other methods including filters.

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔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
--	---------------------------	-----------------------	----

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