

令和 5 年 5 月 31 日現在

機関番号：17102

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2020～2022

課題番号：20K07677

研究課題名(和文) 大腸癌肝転移オルガノイドと単細胞解析を用いた微小環境変化に伴う治療抵抗機序の解明

研究課題名(英文) Elucidation of therapeutic resistance mechanisms associated with microenvironmental alteration using organoid and single cell analysis of colorectal cancer liver metastases

研究代表者

藤田 逸人 (FUJITA, Hayato)

九州大学・医学研究院・共同研究員

研究者番号：40611281

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)：オルガノイド樹立に向けて手技の確立を目指していたが、肝転移巣のオルガノイド樹立には至っていない。大腸癌を含む消化器癌のscRNA-seqのためのライブラリーの作成は100症例を超えており、大腸癌については、様々な免疫細胞やfibroblastのheterogeneityを明らかにし、得られた亜集団の分化の流れを知るために疑似系譜解析を行い、細胞間相互作用についての解析も行っている。大腸癌発癌過程については免疫微小環境の変化を明らかにしつつある。また、食道扁平上皮癌に対する術前化学療法が微小環境に及ぼす影響についても解析をすすめている。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本邦における大腸癌罹患率および死亡率は年々増加傾向にあり、切除後の補助化学療法を行っても再発する例や、再発後に切除を目指し化学療法を行っても制御困難となり致死的経過を辿る例は依然として多く、その素因として肝転移腫瘍の化学療法への抵抗性獲得があげられる。そのため、大腸癌転移性肝腫瘍の化学療法抵抗機序の解明は、それを打破する新規治療法や個別化治療の開発において社会的要求度・貢献度が非常に高い。

研究成果の概要(英文)：Organoid of colon cancer liver metastases has not yet been established. We have prepared cDNA libraries for scRNA-seq of more than 100 cases of gastrointestinal cancers including colorectal cancers. For colorectal cancer, we clarified heterogeneity of various immune cells and fibroblasts, performed pseudotime analysis to understand the flow of differentiation of the obtained subpopulations. We also analyzed cell-cell interactions. We clarified changes in the immune microenvironment during colorectal carcinogenesis. Furthermore, we analyzed the effects of preoperative chemotherapy for the microenvironment of esophageal squamous cell carcinoma.

研究分野：医歯薬学

キーワード：大腸癌 肝転移 オルガノイド scRNA-seq

1. 研究開始当初の背景

本邦における大腸癌罹患率および死亡率は年々増加傾向にあり、大腸癌死亡率の低減は社会的要請度が非常に高い課題の一つである。近年、大腸癌治療は外科的治療の進歩に加え、分子標的治療薬を中心とした抗腫瘍効果の高い新規治療法を併用した集学的治療により治癒切除率や根治性を向上させてきた。しかし、転移性大腸癌の5年生存率は依然として20%に満たず予後不良であり、特に転移性肝腫瘍は大腸癌死因の約1/3を占める。大腸癌の転移性肝腫瘍は他の固形癌と異なり、同時性・異時性に関わらず転移巣の完全切除が予後改善につながるため、実臨床において積極的に転移巣切除が行われている。外科的切除と化学療法を併用することで根治を目指すことも可能となっているが、切除率の向上や切除後の再発抑制のためには化学療法の奏効が肝要となる。しかし、実際には切除後の補助化学療法を行っても再発する例や、再発後に切除を目指し化学療法を行っても制御困難となり致死経過を辿る例は依然として多く、その素因として肝転移腫瘍の化学療法への抵抗性獲得があげられる。そのため、大腸癌転移性肝腫瘍の化学療法抵抗機序の解明と、それを打破する新規治療法や個別化治療の開発は社会的要求度・貢献度が非常に高い。治療抵抗性の一因として腫瘍微小環境内の高度不均一性があげられ、治療抵抗機序の解明には癌細胞だけでなく微小環境を構築している間質内の詳細な薬剤応答機序の理解が不可欠である。

近年、高度な heterogeneity を有する腫瘍内微小環境の機能的解析を行うツールとして、組織を単細胞レベルまで分離し発現解析を行うシングルセル発現解析 (scRNA-seq 解析) が盛んに行われるようになってきている (Papalexi E, et al. Nature Rev Immunol, 2017)。組織を単一細胞レベルに解離し、個々の細胞ごとに多遺伝子発現解析を行うことで、これまでのバルク解析では他の細胞の平均に埋没してしまうため捉えることが不可能であった微小な細胞集団を同定することが可能となった。この網羅的遺伝子プロファイリングの結果から組織全体を様々な機能別の細胞集団に分類することが可能となり、さらにその細胞集団ごとの特性を解析できるようになった。この技術に、転移性肝腫瘍オルガノイドと癌関連線維芽細胞 (活性化した肝星細胞) を用いた微小環境再現モデルを作製する技術を併せることで、転移性肝腫瘍において治療抵抗に關与する機能的な細胞集団や微小環境因子を新たに明らかにし、本研究課題の核心となる「どのように大腸癌転移性肝腫瘍で薬剤耐性が獲得されるのか」という「問い」を解決できると考えられた。

2. 研究の目的

外科的切除を行った転移性肝腫瘍のうち、治療歴および再発時期の異なる組織を scRNA-seq 解析することにより、薬物治療後の癌細胞のみならず、間質細胞を含めた癌周囲微小環境中の heterogeneity の変化を評価することが可能となる。さらには、同組織から樹立した転移性肝腫瘍オルガノイドと癌関連線維芽細胞 (活性化した肝星細胞) を用いた微小環境再現モデルを作製することで、解析により判明した治療抵抗にかかわる細胞集団や液性因子の in vitro/vivo での検討も可能となる。本研究の目的は、これらを併用した統合的解析により、大腸癌の転移性肝腫瘍がどのようにして治療抵抗性を獲得しているかを解明し、それを制御する新規治療法を開発することである。

3. 研究の方法

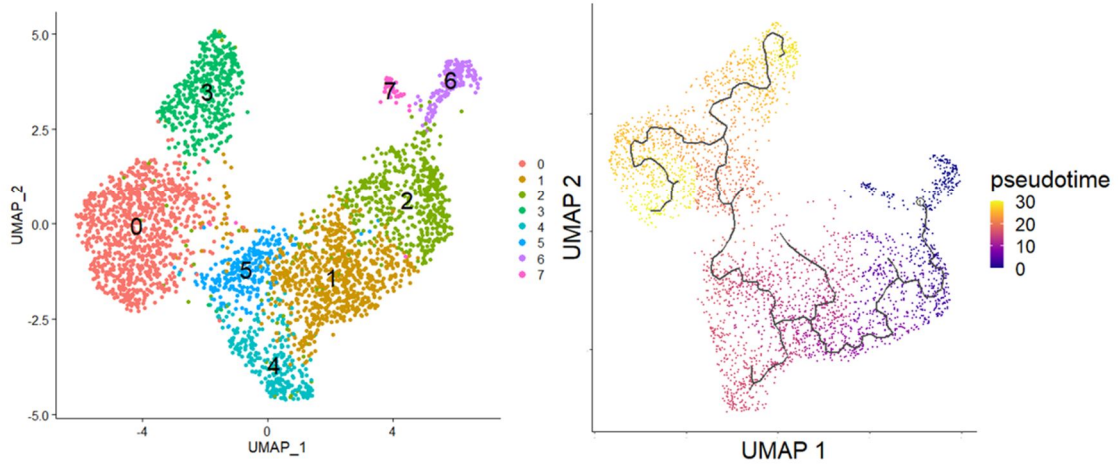
大腸癌転移性肝腫瘍から組織採取を行い、scRNA-seq 解析と癌オルガノイドおよび肝星細胞の樹立を行う。scRNA-seq data を R package “Seurat” を用いて解析を行う。〈切除前未治療〉、〈術前化学療法後〉、〈術後補助化学療法後の異時性再発〉といった治療歴および再発時期ごとに比較解析し、治療抵抗群や治療後の異時性再発群において新たに出現するなど変動を示すクラスター (細胞集団) を同定する。同定した細胞集団を Molecular Signature database (MSigDB) を用いて機能解析を行い、治療抵抗性に關与すると推定される細胞集団を同定する。また、その細胞集団に特異的な表面マーカーを検索する。

治療抵抗群から樹立した腫瘍オルガノイド/肝星細胞の中から上記解析で同定した細胞集団を、表面マーカーを基に sorting し分取する。それらを用いて微小環境再現モデルを作製し、in vitro/vivo での薬剤投与試験を行い、同定した細胞群が実際に治療抵抗性に關与しているかを評価・確認する。さらに同定した細胞群を制御する薬剤の検索や開発につなげ、同様に微小環境再現モデルを用いて評価する。

4. 研究成果

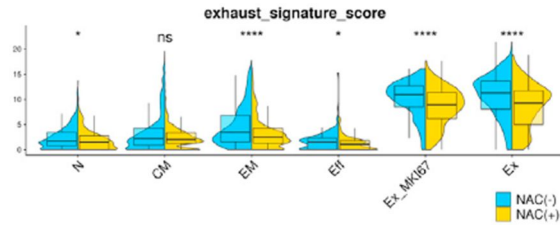
当研究室では、すでに11例の隣癌由来オルガノイドを樹立しており、大腸癌肝転移巣由来のオルガノイド樹立に向けて手技の確立を目指していたが、樹立には至っていない。大腸癌を含む消化器癌の scRNA-seq のためのライブラリーの作成は100症例を超えており、大腸癌については、様々な免疫細胞や fibroblast の heterogeneity を明らかにし、得られた亜集団の分化の流れを知るために疑似系譜解析を行い、細胞間相互作用についての解析も行っている。大腸癌発癌過程については免疫微小環境の変化を明らかにしつつある。

FAP大腸組織のCD8+ Tcellのクラスタリング図と疑似系譜解析図



また、食道扁平上皮癌に対する術前化学療法が微小環境の及ぼす影響についても解析を行っている。これに倣い、今後大腸癌肝転移巣に対しても、術前化学療法前後のサンプル採取およびシングルセル発現解析をすすめる方針である。

術前化学療法によるCD8+ Tcellの疲弊化スコアの変化



Okuda S. et al. iScience 2023

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計5件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 久野恭子、水内祐介、大内田研宙、片山直樹、堤 親範、中村祥一、奥田 翔、大坪慶志輝、寅田信博、佐田政史、田村公二、永吉絹子、中村雅史
2. 発表標題 FAP発癌過程におけるTregの免疫抑制能の変化
3. 学会等名 第123回日本外科学会定期学術学会
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 久野恭子、水内祐介、大内田研宙、堤親範、中村祥一、奥田翔、大坪慶志輝、寅田信博、佐田政史、田村公二、永吉絹子、進藤幸治、仲田興平、森山大樹、中村雅史
2. 発表標題 Single cell RNA sequenceを用いた家族性大腸腺腫症各発がん段階のCD4+ Tcellの比較
3. 学会等名 JDDW2022(第30回日本消化器関連学会週間)
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 久野恭子、大内田研宙、水内祐介、堤親範、中村祥一、奥田翔、大坪慶志輝、寅田信博、佐田政史、田村公二、永吉絹子、池永直樹、仲田興平、中村雅史
2. 発表標題 Single cell RNA sequenceを用いた家族性大腸腺腫症発癌過程におけるCD8+Tcellの解析
3. 学会等名 第122回日本外科学会定期学術集会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 久野恭子、水内祐介、大内田研宙、中村祥一、奥田翔、大坪慶志輝、佐田政史、永吉絹子、寅田信博、進藤幸治、仲田興平、森山大樹、永井俊太郎、中村雅史
2. 発表標題 Single cell RNA sequenceを用いた家族性大腸腺腫症におけるmacrophageのheterogeneityの解明
3. 学会等名 第29回日本消化器関連学会週間（JDDW 2021）
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 久野恭子、水内祐介、大内田研宙、中村祥一、奥田翔、大坪慶志輝、進藤幸治、仲田興平、森山大樹、永井俊太郎、中村雅史
2. 発表標題 scRNA-seqを用いたFAPにおける発がん過程の観察
3. 学会等名 第57回九州外科学会・第57回九州小児外科学会・第56回九州内分泌外科学会
4. 発表年 2021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
研究分担者	水元 一博 (MIZUMOTO Kazuhiro) (90253418)	国際医療福祉大学・赤坂心理・医療福祉マネジメント学部・教授 (32206)	
研究分担者	池永 直樹 (IKENAGA Naoki) (90759755)	九州大学・大学病院・助教 (17102)	

	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	久野 恭子 (HISANO Kyoko)		

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