

令和 5 年 5 月 25 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：20K09080

研究課題名（和文）空間的トランスクリプトミクスによる食道癌微小環境の遺伝子発現マッピング

研究課題名（英文）Gene expression mapping of esophageal cancer microenvironment by spatial transcriptomics

研究代表者

井上 重隆（INOUE, Shigetaka）

九州大学・医学研究院・共同研究員

研究者番号：00529802

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）：近年、癌の浸潤・転移機構解明のためにシングルセル解析が注目されており、我々は新技術であるVisiumを用い、従来の病理形態学と合致させた遺伝子発現地図を作成し微小環境の解明を行うことを目的として本研究を開始した。食道癌サンプルから得られたデータにより、化学療法を行うと制御性T細胞の免疫抑制能力が低下し、細胞障害性T細胞が疲弊を回避し、ヘルパーT細胞はよりメモリーへ誘導され、疲弊も回避されることがわかった。これらの結果から、食道癌において化学療法は免疫細胞による抗腫瘍免疫を増強している可能性が示唆された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究では、食道癌の化学療法前後での単一細胞レベルの遺伝子発現を解析することにより、術前化学療法がどのように免疫微小環境に影響を及ぼすか解明することを目的とした。食道癌の術前化学療法による腫瘍微小免疫環境の解明はこれまでほとんど報告がなかったため、本研究により化学療法反応性のバイオマーカー、微小環境中の治療標的を検討する一助となる可能性がある。

研究成果の概要（英文）：In recent years, single-cell analysis has attracted attention for elucidating the mechanisms of cancer invasion and metastasis. we initiated this study using Visium, a new technology, to create a gene expression map consistent with conventional pathomorphology and to elucidate the tumor microenvironment. Data from esophageal cancer samples show that chemotherapy reduces the immunosuppressive capacity of regulatory T cells, cytotoxic T cells evade exhaustion, and helper T cells are induced to become more memory-intensive and prevent exhaustion. These results suggest that chemotherapy may enhance anti-tumor immunity by immune cells in esophageal cancer.

研究分野：医歯薬学

キーワード：食道癌 Visium 空間的トランスクリプトーム シングルセル解析 腫瘍微小環境

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

食道癌は世界的に比較的高い罹患率・死亡率を示す悪性度の高い癌で、浸潤・転移メカニズムへの深い理解が治療に関わるといえる。腫瘍免疫微小環境の解明が重要となってくるが、その多様な細胞構成と複雑な関係性が問題となり、正確な解析の妨げとなってきた。近年登場した、シングルセル解析技術により微小免疫環境の多様性を解析できるようになったが、細胞の位置情報が失われるという欠点があった。10Xgenomics 社より“VisiumSpatialGeneExpression”技術が発表され、位置情報を維持したトランスクリプトーム解析が可能となり、腫瘍微小環境の解明が進められ、浸潤・転移のメカニズムの解明につながる可能性がある。

2. 研究の目的

本研究の目的は、新技術を用いて従来では入手できなかった局所の位置情報をもつ遺伝子発現情報を得ることで、食道癌微小環境の遺伝子発現マップを作成し、病理形態学の情報と比較・統合することで、腫瘍微小環境の位置による機能的な差を解析し、癌の浸潤・転移の特性に及ぼす影響を検討する。この解析を通じて、その転移・浸潤機構を制御するような新たな治療法の開発を目指し、食道癌の予後改善を目標とする。

3. 研究の方法

ヒト食道癌切除組織からの位置情報を保持した遺伝子発現データの入手
“Visium”を行う上で、癌組織の新鮮凍結切片が必要となる。新鮮な癌組織の凍結切片を用いて、スライドガラス上にオリゴが配置された特殊な方法で mRNA をキャプチャーし、位置情報を保持した cDNA を作成する。それらを singlecell transcriptome 解析と同様に NGS 用ライブラリを作成する。

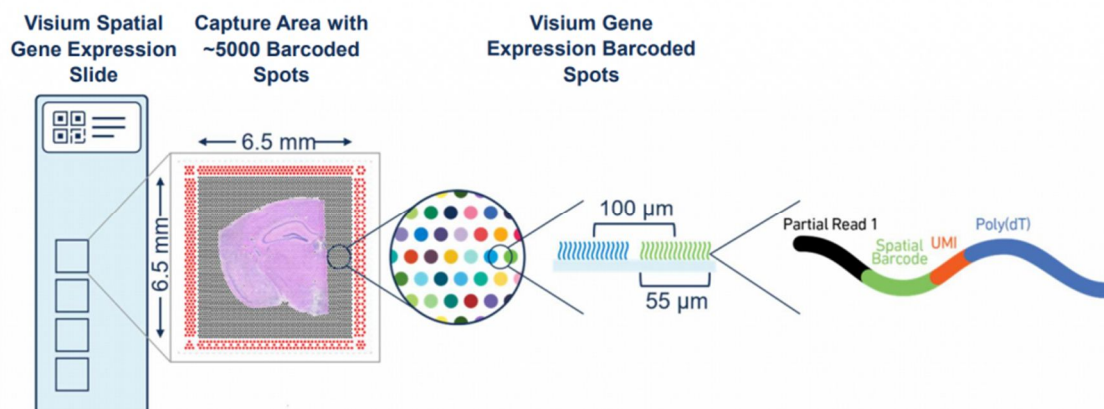
遺伝子発現マップの作成と解析

調製したライブラリを NGS でシークエンスを行い、得られたデータを 10Xgenomics 社の解析ソフトを用いて解析する。そのデータを撮影していた HE 染色の画像に重ねることで、従来では難しかった局所の病理学的知見と網羅的な遺伝子発現データの統合解析が可能となる。

in vitro, in vivo での実証と新たな治療アプローチの開発

前工程で同定した腫瘍の浸潤、転移等に関わる因子(標的となる細胞や遺伝子)に対し、patient derived organoid や PDX(patient derived xenograft)を用いて実験を行い、転移・浸潤機構など微小環境の担う機能に関りがあるかどうかを検討する。これにより浸潤転移に関する遺伝子を同定し、それを制御することによる新たな治療アプローチの開発を目指す。

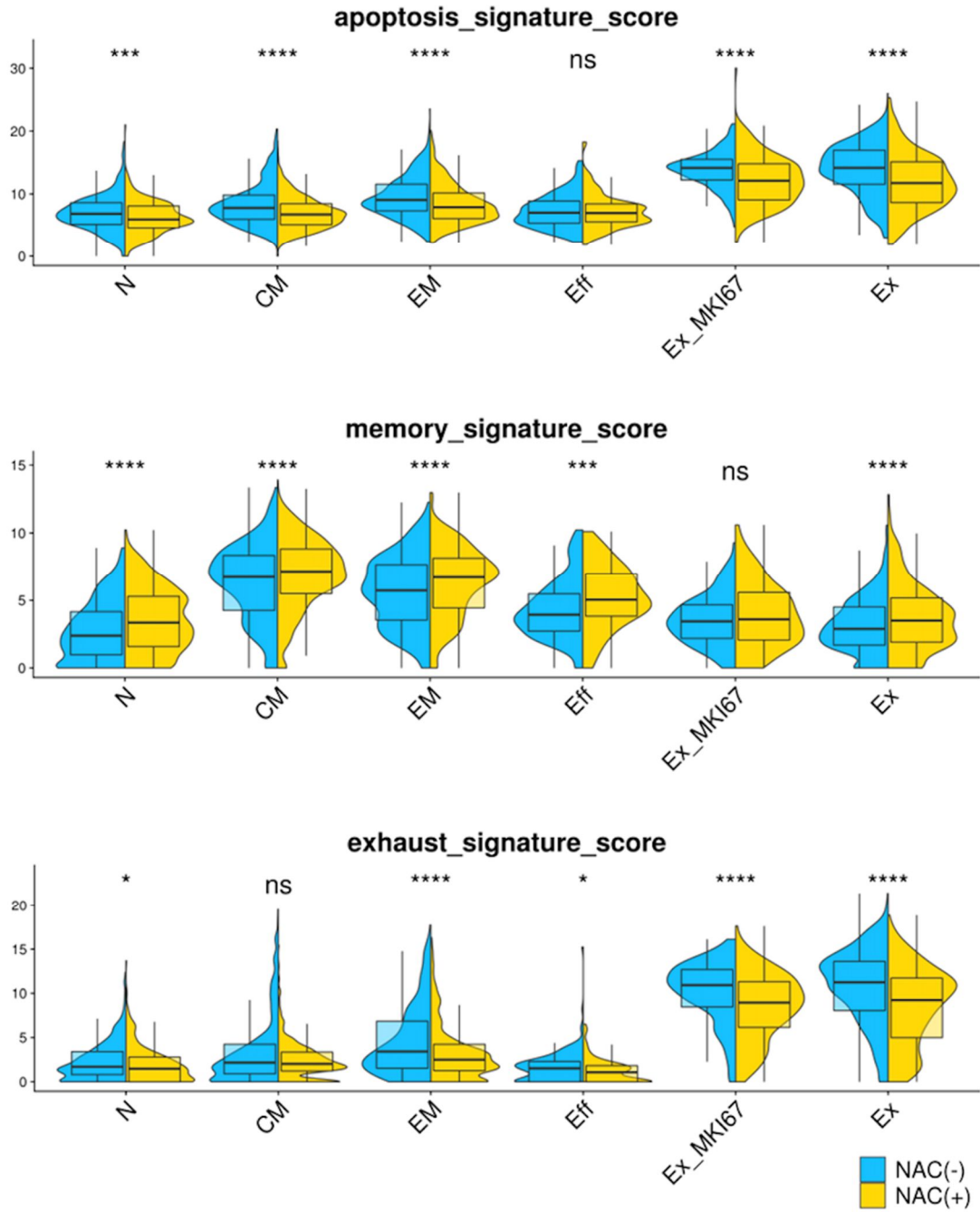
“Visium”の簡略図



4. 研究成果

当研究室が以前から保有している食道癌サンプルから得られたシークエンスデータを用いたシングルセル解析により、化学療法の有無による免疫細胞の機能変化を評価した。化学療法を行った症例においては、細胞障害性 T 細胞はアポトーシスや疲弊を回避し、ヘルパー T 細胞はよりメモリーへと誘導され、疲弊も回避されることがわかった。一方で、制御性 T 細胞は細胞傷害性や免疫抑制能力が低下しており、樹状細胞での抗原提示性は増加したことがわかった。よって、食道癌における化学療法では免疫細胞による抗腫瘍免疫を増強している可能性が示唆された。今後、Visium を用いて空間的な位置情報に基づいた腫瘍微小免疫の詳細な解析を行う予定である。

・NACがCD8T細胞において、アポトーシスを減少させ、記憶を促進し、疲弊化を防ぎ、抗腫瘍免疫応答を強化した。



5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計2件（うち査読付論文 2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 Nakamura S, Ohuchida K, Ohtsubo Y, Yamada Y, Tsutsumi C, Okuda S, Hisano K, Mochida Y, Shinkawa T, Iwamoto C, Torata N, Mizuuchi Y, Shindo K, Nakata K, Moriyama T, Torisu T, Nagai E, Morisaki T, Kitazono T, Oda Y, Nakamura M	4. 巻 13
2. 論文標題 Single cell transcriptome analysis reveals functional changes in tumour infiltrating B lymphocytes after chemotherapy in oesophageal squamous cell carcinoma	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 Clinical and Translational Medicine	6. 最初と最後の頁 e1181
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1002/ctm2.1181	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 -

1. 著者名 Okuda Sho, Ohuchida Kenoki, Shindo Koji, Moriyama Taiki, Kawata Jun, Tamura Koji, Sada Masafumi, Nagayoshi Kinuko, Mizuuchi Yusuke, Ikenaga Naoki, Nakata Kohei, Oda Yoshinao, Nakamura Masafumi	4. 巻 24
2. 論文標題 Clinical impact of remnant lymphatic invasion on the recurrence of esophageal squamous cell carcinoma after esophagectomy with neoadjuvant chemotherapy	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Oncology Letters	6. 最初と最後の頁 337
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3892/ol.2022.13457	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

〔学会発表〕 計6件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 奥田翔, 大内田研宙, 堤親範, 中村祥一, 久野恭子, 持田郁己, 大坪慶志輝, 新川智彦, 寅田信博, 水内祐介, 進藤幸治, 森山大樹, 仲田興平, 中村雅史
2. 発表標題 食道扁平上皮癌TMEのTregに対し術前化学療法が及ぼす影響についての解析
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 2022年

1. 発表者名 中村祥一, 大内田研宙, 堤親範, 久野恭子, 奥田翔, 大坪慶志輝, 寅田信博, 水内祐介, 進藤幸治, 仲田興平, 森山大樹, 中村雅史
2. 発表標題 シグナルセル解析を用いた食道癌内浸潤Bリンパ球のheterogeneityの解明
3. 学会等名 第60回日本癌治療学会学術集会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 中村祥一、大内田研宙、奥田翔、大坪慶志輝、寅田信博、水内祐介、進藤幸治、仲田興平、森山大樹、中村雅史
2. 発表標題 シングルセル解析を用いた食道癌内B細胞における機能解析
3. 学会等名 第77回日本消化器外科学会総会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 持田郁己、大内田研宙、寅田信博、堤親範、中村祥一、久野恭子、奥田翔、新川智彦、仲田興平、中村雅史
2. 発表標題 シングルセル解析を用いた膵臓癌の間質相互作用による化学療法抵抗性機序の検討
3. 学会等名 第77回日本消化器外科学会総会
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、大内田研宙、中村祥一、持田郁己、奥田翔、大坪慶志輝、水内祐介、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を用いた食道扁平上皮癌におけるcancer associated fibroblastのheterogeneityの解明
3. 学会等名 第121回日本外科学会定期学術集会
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	白羽根 健吾 (SHIRAHANE Kengo) (10529803)	九州大学・医学研究院・共同研究員 (17102)	
研究分担者	岩本 千佳 (IWAMOTO Chika) (10752842)	九州大学・医学研究院・特任助教 (17102)	
研究分担者	大内田 研宙 (OHUCHIDA Kenoki) (20452708)	九州大学・医学研究院・准教授 (17102)	

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