

令和 4 年 5 月 26 日現在

機関番号：17102

研究種目：若手研究

研究期間：2020～2021

課題番号：20K16360

研究課題名（和文）大腸癌転移巣のPDXモデルライブラリーを用いた腫瘍不均一性と治療抵抗性機序の解明

研究課題名（英文）Elucidation of Tumor Heterogeneity and Treatment Resistance Mechanisms Using PDX Model Library of Colorectal Cancer Metastases

研究代表者

永吉 絹子（NAGAYOSHI, Kinuko）

九州大学・大学病院・助教

研究者番号：90761015

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）：これまで、外科切除したヒト膵癌組織を使用し、超免疫不全マウスへの皮下移植を行ったところ、6例の膵癌患者より採取した腫瘍組織片を用いたPDXモデルの樹立が完了した。さらに二次移植を行ったところ、4例の二次移植が可能であった。同様の手法を用いて大腸癌患者のPDXモデル作製を試みたが、樹立には至っていない。

また、胃癌、食道癌、大腸癌など50例以上のヒト固形癌でシングルセルRNAライブラリー作成を行っており、NGSで解析した。NGS解析後のデータは、Rパッケージ Seuratを用いて、単一細胞由来のmRNA発現からその細胞集団の特徴や機能に着目した解析、疑似系譜解析、細胞間相互作用の解析等を行った。

研究成果の学術的意義や社会的意義

原発巣・転移巣間、細胞集団間、機能的なheterogeneityを明らかにすることで、転移・再発・治療抵抗性の機序を細胞レベルで明確にすることができる。また、PDXモデルを用いることで化学療法感受性や抵抗性獲得と関連する細胞集団ごとの遺伝子発現パターンを経時的に解析することができれば、細胞の進化や選択的生存の機序解明につながり、学術的にも重要な知見となる。さらに、これらの知見が新たな転移性大腸癌の治療開発につながれば、学術や科学技術の面だけでなく多くの癌患者を含めた医療社会へ大きく貢献することとなる。

研究成果の概要（英文）：Single-cell RNA library generation was performed on surgical specimens from several types of solid tumors, including gastric, esophageal, and colorectal cancer, and analyzed by NGS. We have now succeeded in stably generating enough single cell suspensions and have generated libraries for more than 50 human solid tumors. The data after NGS analysis are analyzed using the R package Seurat, focusing on the characteristics and functions of the cell population, pseudo-genealogical analysis to determine the direction of cell differentiation, and analysis of cell-cell interactions.

In addition, our laboratory has already created a PDX model of pancreatic cancer and has attempted to create a PDX model using primary colon cancers and metastases but has not yet been able to establish one.

研究分野：医歯薬学

キーワード：大腸癌 肝転移 腫瘍不均一性 PDXモデル

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

転移を有する大腸癌の5年生存率は19%と予後不良であるが、個別化治療や化学療法の進展によりその治療成績は向上している。しかしながら、転移巣の治療効果不均一性や治療抵抗性獲得により、治療に難渋することも多く見られる。現在もなお大腸癌の転移巣制御における社会的要求・貢献度は高く、転移巣の heterogeneity と化学療法抵抗性獲得機序の解明が求められている。

また、転移、再発癌が発生する過程では、癌細胞が幹細胞性を獲得し、周囲に癌微小環境が形成されることが、癌の転移進展・誘導に重要である。そのため、転移巣における癌微小環境を含めた分子細胞生物学的解析は転移進展機序を解明する一助となると考えられる。これまでの研究は、樹立された癌細胞株を用いた *in vitro* という特殊な環境で行われており生体内の腫瘍環境とは異なる結果となることも多かった。近年、癌組織の疑似的モデルとして注目されている patient-derived xenograft (PDX) モデルは腫瘍の微小環境まで含めてヒト腫瘍の特性がマウスの生体内で保持されており、個々の患者の癌組織を実験動物レベルで再現することができる。現在では数百種もの PDX モデルが確立されており (Nature, 2016)、今後 PDX モデルを用いた研究が癌進展機構の解明に大きく貢献すると予想される。原発巣、転移巣それぞれの PDX モデルから癌周囲微小環境下での異なる機能を有した新たな細胞集団を同定するだけでなく、1細胞毎の網羅的解析や機能解析は、治療抵抗性の一因である heterogeneity の病態解明の鍵となりうる。Single cell RNA sequence (scRNAseq) は一細胞レベルでの網羅的遺伝子発現解析を実現し、それにより細胞の形質や機能をも高い確度で予測することができる。微小環境中の全細胞を対象とした scRNAseq により、形態やマーカーによる従来の分類とは一線を画した機能的分類を構築し、新たに再分類された細胞集団を同定することが可能となる。原発巣・転移巣間、細胞集団間、機能的な heterogeneity を明らかにすることで、転移・再発・治療抵抗性の機序を細胞レベルで明確にすることができる。また、PDX モデルを用いることで化学療法感受性や抵抗性獲得と関連する細胞集団ごとの遺伝子発現パターンを経時的に解析することができれば、細胞の進化や選択的生存の機序解明につながり、これらの知見が新たな転移性大腸癌の治療開発につながれば、学術や科学技術の面だけでなく多くの癌患者を含めた医療社会へ大きく貢献すると考えられた。

2. 研究の目的

癌腫の転移には標的臓器指向性があり、それは原発巣と転移巣の解剖学的関係性だけでなく、転移標的臓器の微小環境と癌細胞の親和性によるものと考えられる (Cell Stem Cell 2014)。癌微小環境に着目した研究の多くは原発巣に焦点をあてたものであり、大腸癌原発巣と転移巣の微小環境の相違に着目した研究は少ない。転移機序の解明には転移標的臓器の微小環境をも含めた多角的解析が必要であり、PDX モデルの確立で、転移成立機序の細胞・分子生物学的基盤の解明へつながる革新的成果が得られる。癌の予後を規定するのは転移であり、現在大腸癌転移を制御する革新的治療法はなく、本研究では、PDX モデルで再現した転移巣の微小環境に着目・焦点をあて一細胞レベルで治療による経時的な変化を解析することを目的とする。scRNAseq 技術を併用することで、単一細胞レベルの網羅的発現解析を数千個の細胞を対象として同時に施行することが可能である。原発巣と転移巣の微小環境を再現した腫瘍モデル基盤の構築と scRNAseq 技術の組み合わせにより、原発巣と転移巣の化学療法の感受性や耐性獲得など治療抵抗不均一性を含めた解析も飛躍的に進めることができる。我々の研究室では、固形癌組織より作成した患者 PDX モデルや癌オルガノイドを用いてヒトの腫瘍内の微小環境を保持したモデルでの解析基盤を確立している。これに scRNAseq を用いて単一細胞レベルでの多様な細胞集団ごとの機能的分類と機能的解析を行っている。全国有数の消化器癌手術症例があるため、切除組織が容易に取得でき大規模症例数での解析も可能である。また、術前治療後の腫瘍組織や PDX モデルによる治療前後の解析で腫瘍内の化学療法感受性や治療抵抗不均一性のメカニズムが解明し、その制御に基づく新たな治療戦略の確立を目的とする。

3. 研究の方法

外科的切除した新鮮な腫瘍組織の小切片を超免疫不全マウスへ皮下移植を行う。生着・増大した腫瘍を単細胞懸濁液へ解離し、ヒト由来の癌細胞集団であることを確認する。当研究室ではヒト固形癌を用いた PDX モデルを作成しており、大腸癌でも同様の手法で作成することができる。ヒト大腸癌切除標本はバイオバンクとして凍結保存している (Hum Pathol, 2014)。これより、症例毎に原発巣、転移巣、PDX モデル、大腸癌オルガノイドの遺伝子変異検出や次世代シーケンサーによる網羅的発現解析を行い、原発巣・転移巣と各モデルとの相同性を確認するとともに、癌細胞や間質細胞の環境に依存した変化を明らかにしておく。次に、ヒト大腸癌切除組織および PDX モデルの腫瘍を解離して単細胞懸濁液を調製し、scRNAseq により単一細胞レベルでの網羅的遺伝子発現解析を行う。癌微小環境中には上皮系の癌細胞集団だけでなく、間葉系の線維芽細胞集団、各種免疫細胞など複数の細胞集団が存在する。まず、機能的な遺伝子発現の違いにより既存の細胞集団の分類を行う。さらに増殖能力が高い細胞集団、原発巣・転移巣に特異的な細胞

集団、治療抵抗性の遺伝子プロファイリングを示す細胞集団など、独自の発現解析データをもとに機能別に再分類していく。様々な pathway やシグナル、特徴的な遺伝子発現プロファイルを新たに同定し、これまでに分類されることがない機能の細胞集団を同定し、機能的な heterogeneity を明らかにする。さらに、PDX モデルに抗癌剤治療を行い、その前後の変化 scRNAseq で解析する。これにより細胞集団ごとに転移や播種、薬剤感受性や抵抗性などに特に関与する集団をさらに絞り込む。大腸癌オルガノイドの移植モデルを用いて原発巣、肝臓・肺転移巣、腹膜播種巣由来の単細胞懸濁液からも scRNAseq を行い、ヒト大腸癌切除組織や PDX モデルとの相同性を評価する。原発巣と転移巣で異なるプロファイルを持つ細胞集団を同定し、それらと比較し遺伝子や分子レベルでの heterogeneity の評価を行う。機能的な heterogeneity を有する集団については、その細胞集団の特有のマーカーとなる分子や制御するための標的となる分子を抽出する。In vitro, in vivo で増殖や、浸潤、転移、癌間質相互作用など様々な細胞特性を検討する。

4. 研究成果

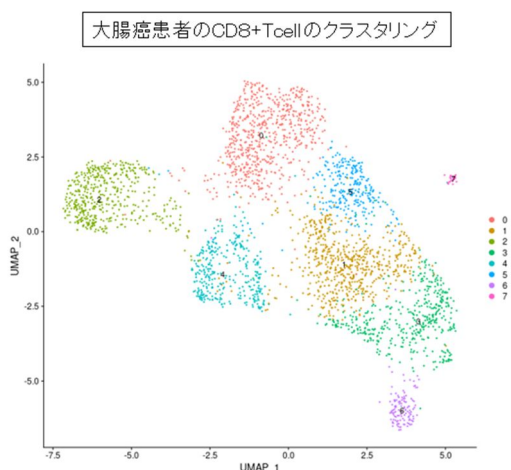
・ PDX モデルの確立

これまで、外科切除したヒト膵癌組織を使用し、超免疫不全マウスへの皮下移植を行ったところ、6例の膵癌患者より採取した腫瘍組織片を用いた PDX モデルの樹立が完了した。さらに、二次移植を行ったところ、4例の二次移植が可能であった。以上により PDX モデル作製に関するプロトコル・手法が確立できた。膵癌と同様の手法を用いて、大腸癌患者の PDX モデル作製を試みたが、樹立には至っていない。

・ scRNAseq を用いた機能解析

scRNAseq を PDX モデルに適応するため、preliminary な解析としてこれまでに、ヒト大腸癌を含むヒト消化器癌 50 例以上で解析を重ねてきた。特徴的・代表的な遺伝子発現を網羅的に解析し分類を行ったところ、リンパ球 (Tリンパ球、Bリンパ球、NK細胞など)・骨髄球系細胞 (マクロファージ、DC、好中球など) といった免疫細胞のほかに、線維芽細胞・血管内皮細胞・肥満細胞などの詳細な細胞種へクラスター分類できた。さらにそれぞれを抽出し、再クラスタリングすることで、それぞれの細胞腫の中にも機能の異なる亜集団が存在することがわかった (下図)。ライブラリ作成の手技は安定しており、解析技術も向上している。

今後は、作成した大腸癌 PDX モデルに治療介入を行い、介入の有無でその微小環境にどのような差があるかを scRNAseq で解明する方針である。



5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計2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、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
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
---------------------------	-----------------------	----

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