

令和 4 年 4 月 22 日現在

機関番号：32612

研究種目：若手研究

研究期間：2020～2021

課題番号：20K17030

研究課題名（和文）四次元イメージングを用いた治療抵抗性がん幹細胞の時空間ダイナミクスの理解

研究課題名（英文）Spatial and temporal analysis of human colon cancer stem cells using 4D imaging

研究代表者

太田 悠木（Ohta, Yuki）

慶應義塾大学・医学部（信濃町）・研究員

研究者番号：80867549

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,300,000円

研究成果の概要（和文）：近年の化学療法の進歩により、切除不能消化器進行がんの治療成績は飛躍的に向上してきたが、根治治療は達成されていない。このような難治性は化学療法耐性と腫瘍再構築能を併せもつ「がん幹細胞」による腫瘍再発性に起因すると考えられている。本研究では、患者由来がんオルガノイド技術、ゲノム編集技術、生体機能マーカーの多色蛍光可視化とその生体イメージング技術を駆使し、これまで未達成であった生体内における臨床がんの化学療法耐性の動態を詳細に解析した。その結果、化学療法耐性を有する休止がん幹細胞の存在を捉える事に成功し、休止状態と再増殖のスイッチには基底膜との細胞接着シグナルが重要な役割を果たすことを見出した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

消化器がんの根治治療開発には、化学療法耐性と腫瘍再構築能を併せもつ「がん幹細胞」の理解が必要である。がん幹細胞の増殖動態を解き明かすためには時間軸に沿った動的な解析が不可欠である一方、実験基盤の欠如により生体内でのがん幹細胞動態についてはブラックボックスであった。本研究では臨床消化器がんの培養技術、幹細胞の増殖動態を可視化する革新的な遺伝子編集技術及び多光子顕微鏡を用いた生体イメージング技術により、腫瘍維持と薬剤抵抗、再発のそれぞれのフェーズにおけるがん幹細胞の時空間ダイナミクスの解明を達成した。本研究成果は消化器がんの再発・転移メカニズムの理解を深め、根源治療法の開発に繋がると期待される。

研究成果の概要（英文）：Cancer relapse after chemotherapy remains a main cause of cancer-related death. Although the relapse is thought to result from the propagation of resident cancer stem cells (CSCs), a lack of experimental platforms that enable prospective analysis of CSC dynamics has hindered testing of this hypothesis. Here, we develop a live genetic lineage-tracing system that allows longitudinal tracking of individual cells in xenotransplanted human colorectal cancer organoids and identify CSCs that display a dormant behavior in a chemo-naive state. Intravital imaging directly demonstrates the persistence of dormant CSCs during chemotherapy, followed by clonal expansion. Transcriptome analysis reveals an up-regulation of cell adhesion molecule in dormant CSCs. Chemotherapy disrupts cell adhesion molecule and induces the breaking of dormancy in CSCs. These results offer a viable therapeutic approach to overcome refractoriness of human colorectal cancer to conventional chemotherapy.

研究分野：消化器腫瘍

キーワード：大腸癌 幹細胞 がん幹細胞 休止細胞

## 1. 研究開始当初の背景

近年の化学療法の進歩により切除不能消化器進行がんの治療成績は飛躍的に向上してきたが、根治治療は達成されていない。このような難治性は、化学療法耐性と腫瘍再構築能を併せもつ「がん幹細胞」による腫瘍再発性に起因すると考えられている。当研究室では以前、オルガノイド技術とゲノム編集技術を組み合わせた細胞系譜解析により、ヒト LGR5 発現大腸がん幹細胞がクロナルな腫瘍再構築能を有することを世界に先駆け実証・報告した。しかしながら、先行研究の解析技術をもってしても、化学療法耐性と続発する腫瘍再発のようなダイナミックな変化を補足できず、LGR5 発現大腸がん幹細胞の腫瘍再発への寄与は依然として不明であった。

## 2. 研究の目的

がん幹細胞の増殖動態を解き明かすためには時間軸に沿った動的な解析が不可欠である一方、実験基盤の欠如により生体内でのがん幹細胞動態についてはブラックボックスであった。そこで本研究では、患者由来がんオルガノイド技術、ゲノム編集技術、生体機能マーカーの多色蛍光可視化とその生体イメージング技術を駆使し、イメージング解析次元と時空間分解能の向上を図ることにより、これまで未達成であった生体内における臨床がんの化学療法剤耐性の動態を可視化する事に挑戦した。このような新規技術により生きたヒトがん腫瘍中の化学療法耐性細胞を視覚的に捉えるとともに、多角的な解析と組み合わせる事でがん幹細胞の化学療法耐性と再増殖を規定するメカニズムを解き明かす事を目的とした。

## 3. 研究の方法

がん組織中のがん幹細胞とその子孫細胞を識別して蛍光可視化するため、先行研究において作成した LGR5-tdTomato レポーターと CreER を LGR5 遺伝子の両アリルにノックインする事により、幹細胞の蛍光可視化と子孫細胞系譜解析を同時に実現するダブルレポーターノックインオルガノイドを作製する。また、休眠状態にある幹細胞を選択的に標識するためのマーカーとして G0 期細胞に発現するサイクリン依存性キナーゼ (CDK) タンパク質 p27 の CDK 結合部位に変異を挿入し、蛍光タンパク質 mVenus と融合させた p27<sup>K</sup>-mVenus ベクターを導入する。これらの技術を組み合わせることで、LGR5 がん幹細胞と休止期を同時に可視化し、さらに子孫を系譜解析することが可能になる。

次に、免疫不全マウスの腹部にウィンドウデバイスを取り付け、その中に蛍光可視化したオルガノイドを移植し、麻酔下で長波長多光子顕微鏡を用いて観察する。細胞系譜解析では数日おきに追跡するため同じ場所の再現が必要となるが、これはステージ上の位置情報と血管およびコラーゲン繊維の配向状況を照合する事により達成する。取得した画像は三次元再構築し、子孫細胞集団の時空間的変遷を定量的に解析する。本イメージング解析によって、がん幹細胞の中に存在する増殖ステータスの異なる 2 つの集団について、腫瘍維持と薬剤抵抗、再発のそれぞれの時期でどのような挙動を示すのかを明らかにする。同時に腫瘍維持と薬剤抵抗、再発のそれぞれの時期における休止幹細胞と増殖幹細胞を分取し、RNAseq により遺伝子発現動態を解析する事で幹細胞の増殖動態を司る因子を網羅的に探索する。

## 4. 研究成果

### がん幹細胞の in vivo live imaging

In vivo live imaging 実験系の確立及び幹細胞の増殖ステータスの観察のため、先行研究にて樹立した LGR5-Cre/Brainbow 患者由来オルガノイドをウィンドウデバイスを用いて免疫不全マウスへ移植し、同一腫瘍内の細胞系譜解析を行った (図 1a)。その結果、LGR5 がん幹細胞の増殖動態には、一過性に増殖し、その後クローン縮小するもの、クローン拡大し続けるもの、長期間に亘って single cell のまま存在し続けるものの 3 つのパターンがある事が明らかとなった (図 1b-g)。この事から、ヒト大腸腫瘍内の LGR5 幹細胞には活発に増殖する細胞と休止状態にある細胞が含まれる事が明らかとなった。

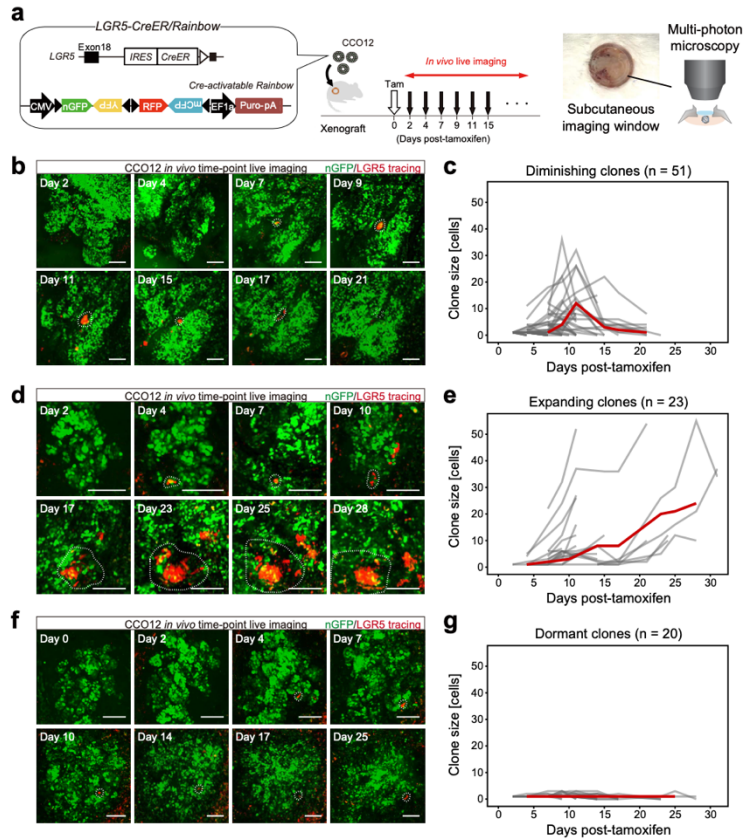


図 1. LGR5 がん幹細胞の *in vivo* live imaging による細胞系譜解析

(a) コンストラクションと実験概念図。Tamoxifen 投与により Cre 依存的にレポーターが組み換わり、LGR5 がん幹細胞の子孫細胞の一部がランダムに RFP でラベルされる。この細胞をウインドウデバイスを用いて免疫不全動物へ移植し、2 光子顕微鏡にて観察した。(b-g) 一過性に増殖するクローン (b, c)、持続的に拡大するクローン (d, e) と増殖しないクローン (f, g) の画像と増殖動態。Scale bars: 100  $\mu$  m

### 休止がん幹細胞の可視化

化学療法耐性に寄与すると考えられる休止がん幹細胞を可視化するため、患者由来大腸がんオルガノイドへ LGR5-TdTomato レポーターと p27<sup>K</sup>-mVenus レポーターを同時に導入した (図 2a)。p27<sup>K</sup>-mVenus レポーターの蛍光は増殖細胞マーカーである Ki67 の免疫染色像において相互排他的な発現パターンを示しており、休止期の細胞を効率よくマーキングできている (図 2b)。実際に、セルソーターにより p27 陽性あるいは陰性の LGR5 幹細胞を分取し、Pyronin Y/Hoechst 染色により細胞周期を同定した所、p27 陽性細胞の殆どが G<sub>0</sub> 期にある事が確認された (図 2c)。

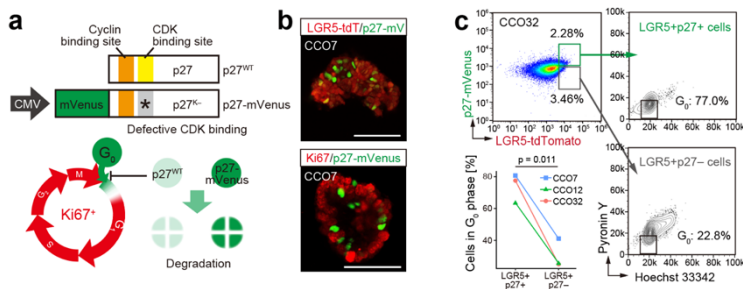


図 2. 休止がん幹細胞の可視化

(a) サイクリン依存性キナーゼ (CDK) 結合部位変異型 p27 タンパク質と mVenus レポーターの融合タンパク質。(b 上段) LGR5-TdTomato レポーターと p27<sup>K</sup>-mVenus レポーターの同時発現細胞。(b 下段) p27<sup>K</sup>-mVenus レポーター導入細胞の Ki67 免疫染色像。(c) LGR5 がん幹細胞中の p27 陽性/陰性細胞の分取と細胞周期の解析。Scale bars: 100  $\mu$  m

これらの2集団を *in vitro* live imaging により追跡した所、p27 陽性 LGR5 幹細胞は有意に分裂率が低い事が明らかとなった (図 3a, b)。p27 陽性、陰性 LGR5 幹細胞はどちらも幹細胞の特徴の1つであるコロニー形成能を持つ一方で、抗がん剤である camptothecin を投与した場合には p27 陽性 LGR5 幹細胞のみがコロニーを形成した事から、LGR5 幹細胞のうち p27 陽性細胞だけが化学療法耐性を有する事が分かった (図 3c, d)。

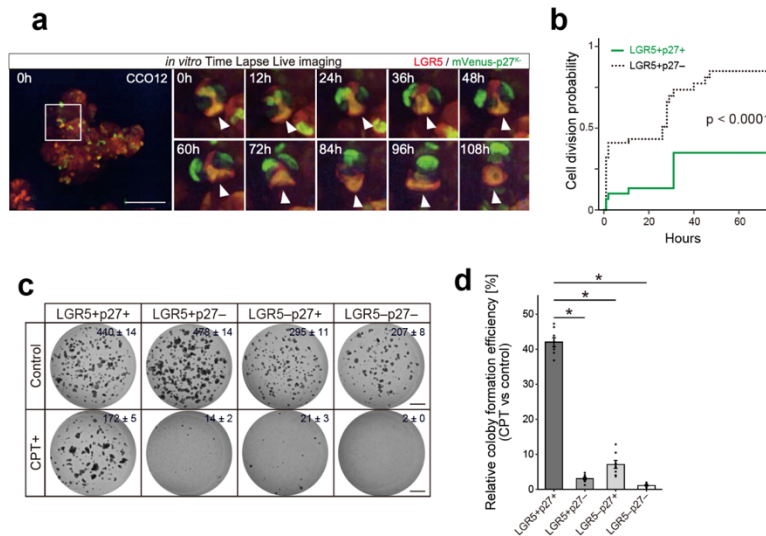


図 3. 休止がん幹細胞の機能解析

(a) LGR5-TdTomato レポーターと p27<sup>K</sup>-mVenus レポーターの同時発現細胞を *in vitro* live imaging により経時的に観察した。(b) LGR5 がん幹細胞中の p27 陽性/陰性細胞の細胞分裂率。\*P log-rank test. (c, d) 抗がん剤 camptothecin (50nM, 24h) 投与によるコロニー形成成功率の変化。Scale bars: 100 μm (a), 1mm (c) \*P < 0.0001, one-way ANOVA followed by Tukey's post-hoc test.

#### 化学療法下におけるがん幹細胞の *in vivo* live imaging

次に、LGR5-Cre/LGR5-TdTomato ダブルノックインオルガノイドに p27<sup>K</sup>-mVenus レポーターと tdiRFP-BFP レポーターを導入し、LGR5 がん幹細胞と休止期を同時に可視化すると同時に子孫細胞の系譜解析をすることを可能とした (図 4a, b)。この細胞では、LGR5 陽性幹細胞が TdTomato 蛍光を発現し、休止期にある細胞が mVenus を発現するとともに、Tamoxifen 投与によって LGR5 の子孫細胞が BFP を発現するようになる。

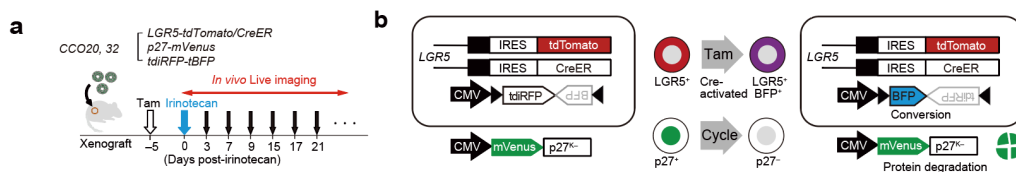


図 4. LGR5 がん幹細胞の増殖動態と子孫細胞系譜解析

(a) 投薬及び imaging のスケジュール。(b) コンストラクションと実験概念図。全ての細胞が核に tdiRFP を発現し、LGR5 陽性幹細胞が TdTomato、休止期にある細胞が mVenus を発現する。Tamoxifen 投与によって Cre 依存的に蛍光レポーターが組換わり、LGR5 の子孫細胞が BFP を発現するようになる。

この細胞と *in vivo* live imaging の実験系を用いて、定常状態及び化学療法 (irinotecan) 下でのがん幹細胞のダイナミクスを観察した。その結果、定常状態において p27 陰性 LGR5 がん幹細胞の殆どは増殖を来すのに対し、p27 陽性 LGR5 がん幹細胞は 30-40%が観察期間中 single cell であり続けた (図 5a, b)。また、細胞の生存率には 2 集団での差がなかった (図 5c)。一方で、化学療法下においては p27 陰性 LGR5 がん幹細胞の多くが死滅する中、p27 陽性 LGR5 がん幹細胞は残存して再増殖する様子が観察された (図 5d-f)。これにより、がん幹細胞としての自己複製・クローン拡大能力を持ちながら定常状態では休止期を維持し、化学療法耐性と再増殖の能力を有する「休止がん幹細胞」の存在を初めて生きたヒト大腸腫瘍内で観察する事に成功した。

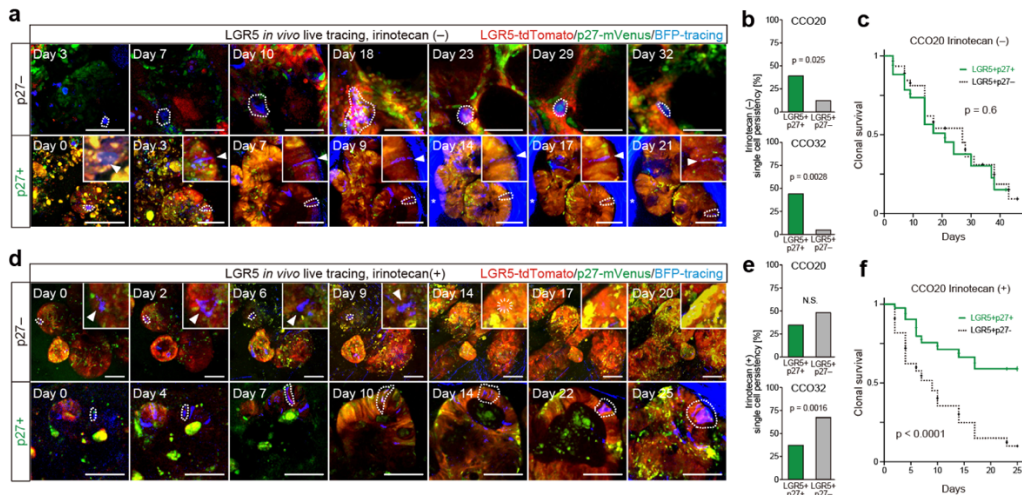


図 5. 定常状態及び化学療法下での LGR5 がん幹細胞増殖動態

(a-f) 定常状態(a)または化学療法存在下(d)での p27 陽性/陰性 LGR5 がん幹細胞増殖動態の定点観察像、定常状態(b)または化学療法存在下(e)での single cell であり続けた細胞の割合の比較。\*P Fisher's exact test. 定常状態(c)または化学療法存在下(f)でのクローン生存率の比較。\*P log-rank test. Scale bars: 100  $\mu$ m

### 休止がん幹細胞を規定するメカニズムの探索

最後に、セルソーターによって LGR5 がん幹細胞から p27 陽性及び陰性の細胞をそれぞれ分取し、RNA-sequencing 解析により休止がん幹細胞の維持に関わる因子を探索した。その結果、p27 陽性 LGR5 がん幹細胞の休止期の維持には細胞外基質との接着シグナルが関連する事が確認され、このシグナルは化学療法下においても有意に変動している事が明らかとなった (図 6a-c)。

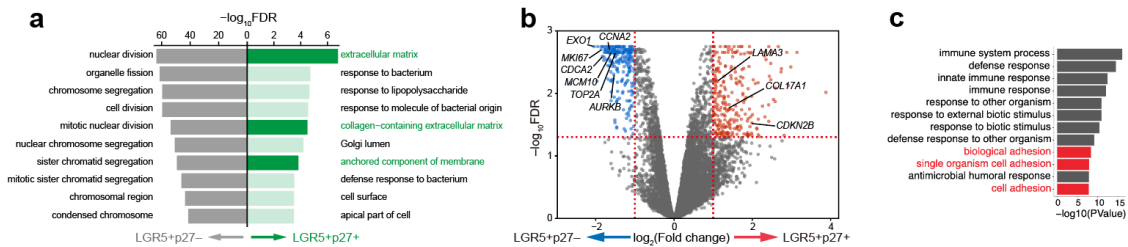


図 5. p27 陽性/陰性 LGR5 がん幹細胞の遺伝子発現解析

(a-b) 定常状態における p27 陽性/陰性 LGR5 がん幹細胞の遺伝子発現比較。p27 陽性/陰性 LGR5 がん幹細胞の比較で FDR 0.05 以下かつ fold change 1 以上または -1 以下の遺伝子を用いた Gene Ontology 解析 (a) と volcano plot (b)。Gene ontology 解析に用いた遺伝子を赤または青で示し、hemidesmosome 関連及び細胞周期関連遺伝子をハイライトした。(c) camptothecin (10nM, 24h) 処理後 p27 陽性 LGR5 がん幹細胞を分取し、control に対する遺伝子発現の変化を Gene ontology 解析により示した。

以上の成果から、本研究ではヒト固形がんの異種移植モデルを用いたライブイメージングを実現し、従来の技術では困難であったヒトがん幹細胞動態の一細胞レベルの継続的解析および分子生学的理解を可能にした。さらに、技術開発のみに留まらず、がん幹細胞の増殖動態のスイッチに基底膜との接着シグナルが重要な役割を果たすことを見出し、進行がんの根源治療法の開発につながる全く新しい知見が得られた。

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<br>(ローマ字氏名)<br>(研究者番号) | 所属研究機関・部局・職<br>(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 |
|---------|---------|
|---------|---------|