

令和 6 年 5 月 16 日現在

機関番号：32643

研究種目：基盤研究(B)（一般）

研究期間：2021～2023

課題番号：21H03081

研究課題名（和文）空間的遺伝子発現解析による明細胞癌の治療抵抗性ネットワークの解明

研究課題名（英文）Elucidation of chemoresistant network of clear cell ovarian cancer via spatial analyses

研究代表者

岡本 康司（Okamoto, Koji）

帝京大学・先端総合研究機構・教授

研究者番号：80342913

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 13,000,000円

研究成果の概要（和文）：卵巣明細胞がんは予後不良であり、その抵抗性解明は医療上の喫緊の課題である。本研究では臨床がん検体を対象として、1細胞核解析と空間的解析を組み合わせた解析を行なった。1細胞核解析によりHIF-1陽性がん細胞群を治療抵抗性細胞群として同定したが、空間的トランスクリプトームとの統合解析により、抵抗性細胞がCancer-associated fibroblast（CAF）と共局在する事を明らかにした。さらに、明細胞がんスフェロイドとCAFの共培養系において、HIF-1陽性がん細胞とCAFが相互作用により活性化している事を明らかにしたが、両細胞によるフィードバック制御は治療標的となりうると考えられた。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究において、卵巣明細胞がん臨床検体を用いて、がん細胞と非がん細胞の「相互依存空間」が抗がん剤抵抗性を担う事を明らかにした点に学術的意義があると考えられる。また、1細胞核発現解析と最先端技術である空間的遺伝子発現解析を統合し、抵抗性細胞群の組織切片上で抵抗性ニッチを可視化する方法論を確立した点にも、学術的な独自性があると考えられる。本研究の社会的意義としては、これらの研究を通じて、これまで有効な治療法のなかつた卵巣明細胞がんの新しい治療法構築に結びつく可能性があると考えられる。

研究成果の概要（英文）：Ovarian clear cell carcinoma has a poor prognosis, and understanding its resistance mechanisms is a critical medical challenge. In this study, we conducted analyses combining single-nucleus and spatial analyses on clinical cancer specimens. Through single-nucleus analysis, we identified HIF-1 positive cancer cell populations as chemoresistant cells. Furthermore, integrated analysis with spatial transcriptomics revealed that these resistant cells co-localize with cancer-associated fibroblasts (CAFs). Additionally, in co-culture systems of clear cell carcinoma spheroids and CAFs, we demonstrated that HIF-1 positive cancer cells and CAFs are activated through mutual interactions. This feedback regulation between the two cell types is considered a potential therapeutic target.

研究分野：分子腫瘍学

キーワード：がん治療抵抗性 がん組織多様性 シングルセル解析 組織空間的解析

様式 C - 19、F - 19 - 1 (共通)

1. 研究開始当初の背景

近年、卵巣がんや乳がんなどの女性特有のがんが増加しており、死亡者数も増加の一途をたどっている。特に卵巣がんの中でも明細胞がんは、漿液性がんに次いで頻度が高く、早期発見が難しい上に、抗がん剤に対する高い抵抗性を示し予後が不良である。このため、明細胞がんの治療法の確立は緊急の課題となっている。進行期明細胞がんには、タキサン製剤とプラチナ製剤の併用療法 (TC 療法) が標準治療として用いられるが、これにより長期寛解を得る症例は半数に満たない。治療抵抗性の細胞分子機構は未解明であり、抵抗性メカニズムの解明が不可欠である。

最近の報告によれば、がん細胞はゲノム変異やエピジェネティックな細胞階層性により不均一であり、一部のがん細胞のみが強い抗がん剤抵抗性を有する。また、抵抗性細胞の維持には、Cancer-associated fibroblast (CAF) やマクロファージなどのニッチ細胞が関与し、これらが放出する増殖因子が相互の生存増殖に寄与していることが示唆されている。これらの知見から、抵抗性がん細胞は非がんニッチ細胞と相互依存的なネットワークを構築しており、がん微小環境における「相互依存空間」の形成が治療抵抗性メカニズムの本質と考えられる。

近年、組織中の細胞を単離し各細胞のトランスクリプトーム解析を行う 1 細胞発現解析技術が確立され、抗がん剤抵抗性細胞群の同定が可能となっている。しかし、この技術では細胞の位置情報が得られないため、「相互依存空間」を可視化できない。この問題を解決するため、組織標本上でトランスクリプトーム解析を行う空間的遺伝子発現解析技術が開発された。この技術により、がん組織の空間的位置を明らかにし、相互作用を担う因子とリセプターを同定することで、明細胞がんの新しい治療法の開発が期待される。

2. 研究の目的

1 細胞発現解析により、抗がん剤抵抗性及び感受性明細胞がんの組織多様性の解析を行い、抵抗性症例中に存在する抵抗性細胞群の存在を明らかにするとともに、抵抗性細胞群に特異的に発現する遺伝子群を抵抗性シグネチャーとして同定する。さらに空間的遺伝子発現解析により、抵抗性シグネチャーの空間的遺伝子発現解析を行い、治療抵抗性細胞のがん組織内での局在を明らかにする。最後に、治療抵抗性がん細胞の周囲に存在する細胞群の解析を行い、抵抗性細胞と非がん細胞間の相互ネットワークを明らかにし、抵抗性維持に働く細胞間コミュニケーションの全体像を可視化する。これらの統合解析を通じて、明細胞がん難治性の本態を明らかにする事を目指す。

3. 研究の方法

明細胞がんの臨床症例を、TC 療法に感受性を示した症例と早期再発した抵抗例の 2 群に分ける。2 群のそれぞれの症例の凍結検体より細胞核を抽出し、FACS により精製する。精製した細胞核を対象とした 1 細胞発現解析を行い、遺伝子発現プロファイルによるがん細胞の層別化を行う。抵抗性症例及び感受性症例の細胞層別化の結果を比較することにより、抵抗性症例で顕著に増加する細胞群を抵抗性細胞群として同定する。同定した抵抗性細胞群で特異的に発現する遺伝子群を抵抗性がん細胞シグネチャーとして同定する。

次に同じ凍結検体を用いて、空間的遺伝子発現解析を行う。抵抗性がん細胞シグネチャーのがん組織中での分布を組織切片上の遺伝子発現解析により検証し、抵抗性がん細胞の組織分布を明らかにする。同定された抵抗性細胞の組織内分布については、連続切片を用いたシグネチャー遺伝子の免疫染色により確認する。間質に存在する非がん細胞群 (CAF、マクロファージ、内皮細胞など) についても同様の解析を行い、がん組織中での細胞分布を検証する。抵抗性がん細胞及び非がん細胞の組織分布を統合する事により、お互いの位置関係から抵抗性がん細胞の周囲に存在する非がん細胞を同定する。

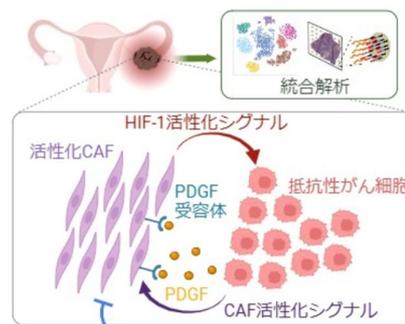
これらの細胞の遺伝子発現プロファイルより、抵抗性がん細胞の生存維持に働くりガンドとリセプターを同定し、がん細胞とニッチ非がん細胞が構成する相互依存ネットワークを可視化する。

4. 研究成果

卵巣明細胞がんの凍結検体を対象として、Visium 空間的解析とシングル核解析の統合を行なった (*Cell Rep. Med*, 2024)。標準治療抗がん剤 (カルボプラチン+パクリタキセル) に抵抗性症例と感受性症例に分けて、シングルセル解析の結果を比較した所、抵抗性症例で有意に増加する HIF-1a 陽性がん細胞群が認められた。これらの細胞群の腫瘍内局在を Visium 解析で調べた所、がん細胞と CAF の混在領域に局在する事が明らかとなった。

その後の解析で、1) 臨床検体の免疫染色より、HIF-1 陽性がん細胞と活性化型 CAF (myCAF) の増加が予後増悪と関連している事、2) 共培養モデルより、がん細胞が放出す

図 1 がん細胞とCAF相互作用による抵抗性獲得



がん細胞-CAFフィードバック阻害剤

る PDGF が、CAF 活性化を介して抗がん剤抵抗性を促進する事、3) 共培養および移植腫瘍モデルより、受容体型チロシンキナーゼ阻害剤 (Ripretinib) が、myCAF の抑制を介してがん細胞増殖抑制効果を増強する事、を明らかにした。これらの結果より、卵巣明細胞がん組織中に抗がん剤抵抗性を示すがん微小環境が存在し、myCAF が有効な治療標的となりうると考えられた(図1)。これらの結果はプレスリリースおよび新聞等で公開された(日経新聞4月26日、日経バイオテック4月26日、日刊工業新聞5月3日など)。また受容体型チロシンキナーゼ阻害剤に関する知見に基づき、特許申請を行なった(特願2023-188377)。

<引用文献>

Targeting PDGF signaling of cancer-associated fibroblasts blocks feedback activation of HIF-1 and tumor progression of clear cell ovarian cancer. Mori Y, Okimoto Y, Sakai H, Kanda Y, Ohata H, Shiokawa D, Suzuki M, Yoshida H, Ueda H, Sekizuka T, Tamura R, Yamawaki K, Ishiguro T, Mateos RN, Shiraishi Y, Yatabe Y, Hamada A, Yoshihara K, Enomoto T, Okamoto K. *Cell Rep. Med.* doi: 10.1016/j.xcrm.2024.101532. (2024)

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計4件（うち査読付論文 4件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 4件）

1. 著者名 Tokura M, Nakayama J, Prieto-Vila M, Shiino S, Yoshida M, Yamamoto T, Watanabe N, Takayama S, Suzuki Y, Okamoto K, Ochiya T, Kohno T, Yatabe Y, Suto A, Yamamoto Y.	4. 巻 82
2. 論文標題 1.Single-Cell Transcriptome Profiling Reveals Intratumoral Heterogeneity and Molecular Features of Ductal Carcinoma In Situ.	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Cancer Res	6. 最初と最後の頁 3236-3248
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1158/0008-5472.CAN-22-0090	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 Kanda Y, Ohata H, Miyazaki T, Sakai H, Mori Y, Shiokawa D, Yokoi A, Owa T, Ochiai A, *Okamoto K.	4. 巻 586
2. 論文標題 NF- B suppression synergizes with E7386, an inhibitor of CBP/ -catenin interaction, to block proliferation of patient-derived colon cancer spheroids.	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Biochem. Biophys. Res. Commun.	6. 最初と最後の頁 93-99
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.bbrc.2021.11.063.	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 Miyazaki T, Chung S, Sakai H, Ohata H, Obata Y, Shiokawa D, Mizoguchi Y, Kubo T, Ichikawa H, Taniguchi H, Aoki K, Soga T, Nakagama H, *Okamoto K.	4. 巻 113
2. 論文標題 Stemness and immune evasion conferred by TD02-AHR pathway are associated with liver metastasis of colon cancer.	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Cancer Sci.	6. 最初と最後の頁 170-181
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1111/cas.15182.	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 Yamawaki K, Mori Y, Sakai H, Kanda Y, Shiokawa D, Ueda U, Ishiguro T, Yoshihara K, Nagasaka K, Onda T, Kato T, Kondo T, Enomoto T, *Okamoto K.	4. 巻 521
2. 論文標題 Integrative analyses of gene expression and chemosensitivity of patient-derived ovarian cancer spheroids link G6PD-driven redox metabolism to cisplatin chemoresistance.	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Cancer Lett.	6. 最初と最後の頁 29-38
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.canlet.2021.08.018.	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 -

〔学会発表〕 計10件（うち招待講演 9件 / うち国際学会 1件）

1. 発表者名 Koji Okamoto
2. 発表標題 Functional role of mTORC1-mediated inhibition of autophagy in the regulation of slow-cycling persister cells of colon cancer
3. 学会等名 The protein phosphatase conference - Jointly hosted by FASEB and the Japanese Association for Protein Phosphatase Research (JAPPR) (招待講演) (国際学会)
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 岡本康司
2. 発表標題 肺がん由来スフェロイドパネルを用いた新たな治療標的の探索
3. 学会等名 第63 回日本肺癌学会学術集会 (招待講演)
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 森裕太郎、神田裕介、酒井宏晃、大畑広和、小幡裕希、塩川大介、吉田裕、Raul Nicolas Mateos、山脇芳、石黒竜也、吉原弘祐、白石友一、加藤友康、榎本隆之、岡本康司
2. 発表標題 凍結臨床検体を用いた1細胞核解析と空間的トランスクリプトームの統合による卵巣明細胞腺がんの治療抵抗性の理解
3. 学会等名 第4回がん三次元培養研究会 (招待講演)
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 岡本康司
2. 発表標題 空間的発現解析によるがん難治性ネットワークの同定
3. 学会等名 第10回Cancer Stem Cell Symposium (招待講演)
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 Koji Okamoto
2. 発表標題 シングルセル解析と空間的発現解析の統合によるがん難治性ネットワークの同定
3. 学会等名 日本患者由来がんモデル学会学術集会2022 (招待講演)
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 大畑広和、塩川大介、岡本康司
2. 発表標題 オートファジーによる PROX1の発現誘導は NOX1-mTORC1経路の抑制を介して休眠型の大腸がん細胞を生成する
3. 学会等名 第81回日本癌学会国際シンポジウム (招待講演)
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 森裕太郎、岡本康司、神田裕介、石黒竜也、吉原弘祐、榎本隆之、山脇芳、大畑広和、塩川大介
2. 発表標題 シングルセル解析と空間的トランスクリプトーム解析による卵巣明細 胞腺癌の治療抵抗性ニッチの解明
3. 学会等名 第81回日本癌学会国際シンポジウム
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 岡本康司
2. 発表標題 シングルセル解析と空間的トランスクリプトームの統合によるがん組織多様性及び治療抵抗性の理解
3. 学会等名 第44回日本分子生物学会年会 (招待講演)
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 岡本康司
2. 発表標題 臨床がん由来のスフェロイドパネル構築と肺がん研究への応用
3. 学会等名 第62 回日本肺癌学会学術集会（招待講演）
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 岡本康司
2. 発表標題 抗がん剤抵抗性を示す休止型がん幹細胞の解析と治療戦略
3. 学会等名 第80回日本癌学会国際シンポジウム（招待講演）
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	吉原 弘祐 (Yoshihara Kosuke) (40547535)	新潟大学・医歯学系・教授 (13101)	
研究分担者	加藤 友康 (Kato Tomoyasu) (50224522)	国立研究開発法人国立がん研究センター・中央病院・科長 (82606)	
研究分担者	榎本 隆之 (Enomoto Takayuki) (90283754)	新潟大学・医歯学系・特任教授 (13101)	

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