

令和 6 年 5 月 23 日現在

機関番号：17102

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2021～2023

課題番号：21K08713

研究課題名(和文)空間的トランスクリプトーム解析によるCAF誘導性大腸癌免疫リモデリング機構の解明

研究課題名(英文) Spatial transcriptome analysis reveals CAF-induced colorectal cancer immune remodeling mechanism

研究代表者

佐田 政史 (SADA, Masafumi)

九州大学・医学研究院・共同研究員

研究者番号：10783508

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)：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200例を超えている。大腸癌について、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の疑似系譜解析や細胞間相互作用についての解析も行った。また、樹立したオルガノイドとの共培養に用いることを目的として、採取した大腸癌組織からCAFの樹立も行っており、その手技は確立している。Visiumを用いた空間的トランスクリプトーム解析は各種試薬準備や実験手技の確立をすすめている。

研究成果の学術的意義や社会的意義

転移・再発大腸癌の治療成績は不良で、予後向上のためには転移・再発機序の詳細な分子細胞学的基盤の解明が必要である。癌の維持・進展における腫瘍微小環境の間質細胞や免疫細胞の細胞間ネットワークや分子基盤が明らかになってきているが、癌関連線維芽細胞(CAF)が腫瘍免疫応答に与える影響は未だ不明な点が多い。腫瘍免疫抑制性のCAFサブセットを制御する、あるいは免疫促進性のCAFサブセットを誘導することが可能となれば、再発・転移性大腸癌治療における大きなブレイクスルーとなることが期待される。

研究成果の概要(英文)：The library for scRNA-seq of gastrointestinal cancers, including colorectal cancer, has been created for over 200 cases. For colorectal cancer, we clarified the heterogeneity of various immune cells and fibroblasts, and also performed pseudotime analysis and cell-cell interaction analysis. We have also established a technique for the establishment of CAFs from harvested colorectal cancer tissue for use in co-culture with established organoids. For spatial transcriptome analysis using Visium, we are preparing various reagents and establishing experimental techniques.

研究分野：医歯薬学

キーワード：大腸癌 CAF heterogeneity 腫瘍微小環境

## 様式 C - 19、F - 19 - 1 (共通)

### 1. 研究開始当初の背景

大腸癌治療の予後は、新規分子標的治療薬の導入や包括的がんゲノムプロファイリングの臨床への実装によって着実に向上している。しかし、転移を有する大腸癌の5年生存率は20%に満たず、治療成績向上のため、新規治療法に対する社会的要請度は高い。免疫チェックポイント阻害剤をはじめとする免疫療法の導入は、腫瘍微小環境を含めた癌の多様性・複雑性の理解を深めるとともに、新たな課題を浮かび上がらせてきた。さらに、化学療法や放射線療法、分子標的治療薬など、これまで免疫とは関係ないと思われていた治療にも、免疫が関与していることも明らかにされてきた。よって、腫瘍微小環境における免疫応答機序を明らかにしていくことは、癌治療の成績向上のために必要不可欠である。

生体の免疫監視機構から逃避する免疫抑制性の微小環境は、腫瘍細胞だけでなく間質細胞によっても担われていることが知られている。腫瘍細胞による免疫逃避機構の理解は進んでいるが、間質細胞による免疫抑制性のメカニズムには未だ不明な点が多い。間質細胞の中でも、癌関連線維芽細胞(CAF)は分泌される液性因子や細胞外基質によって腫瘍細胞の増殖・浸潤を促進し、血管新生や薬剤送達性など広範な生体反応とも深く関与しているが、免疫抑制性の微小環境をも作り出している。その詳細な分子機序は徐々に明らかになり始めており、高度なドロップレット・マイクロ流路プラットフォーム、分子バーコード付加技術、次世代シーケンサーを基盤とした single-cell RNA-seq (scRNA-seq) に代表される革新的技術により、従来の単一マーカーによる分類でなく、網羅的な遺伝子発現データに基づく細胞集団の再分類によるところが大きい。一方、遺伝子改変腫瘍発生マウスモデルでは、CAF を遺伝子改変技術で消失させることで従来の定説とは逆に免疫抑制性の微小環境が誘導された報告もあり、腫瘍免疫に対する CAF の位置付けについて、また CAF をターゲットとした間質標的治療薬の開発においても検討すべき課題は多い。CAF は、腫瘍細胞と同様に一様で均質な細胞集団ではなく、heterogeneity を有する細胞集団であることは従来の免疫組織学的染色や FACS によって知られていたが、scRNA-seq によるシングルセルレベルの解析により、より生体での実際の細胞の振る舞いに近いと考えられる機能的な分類が可能となった。ヒト大腸癌組織においても、scRNA-seq で2つの CAF サブタイプの存在が明らかになっている。本研究により、CAF の免疫応答バランスにおける機能的 heterogeneity が空間的 heterogeneity に依存しているのではないかと、というさらなる問いを解決できると考えられた。

### 2. 研究の目的

腫瘍免疫抑制性の CAF サブセットを制御する、あるいは免疫促進性の CAF サブセットを誘導することが可能となれば、再発・転移性大腸癌治療における大きなブレイクスルーとなることが期待される。難治である転移・再発大腸癌の予後改善という社会的要請に答えるための革新的治療開発の基盤となるような基礎的知見を得ることが本研究の目的である。

### 3. 研究の方法

大腸癌組織の CAF の heterogeneity を同定するために、まずマルチカラーのフローサイトメトリー(FACS)を行う。新鮮ヒト大腸癌組織を、fibroblast のマーカーを使用して解析する。得られた fibroblast マーカーによる FACS データを利用して CytoSPADE trees を作成することで、関連する phenotype の相関を可視化し、ヒト大腸癌組織における CAF サブセットを同定する。また、FACS で分取した新鮮ヒト大腸癌組織由来 CAF 細胞集団を、10X Genomics 社の Chromium Controller を使用してシングルセル分画化及びバーコード付加を行い、scRNA-seq を実行する。得られたトランスクリプトームデータを解析し、Gene Ontology、KEGG(Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes)で生物学的意味解釈を行う。特に、免疫調節 immunomodulation に関連する遺伝子群について、各々の CAF サブセットで詳細に検討する。

また、空間的遺伝子発現ソリューション(10X Genomics 社 Visium)によって、組織片上のトランスクリプトームを測定し、大腸癌微小環境における CAF と免疫細胞の遺伝子発現を視覚化・マッピングすることでそのランドスケープを明らかにする。主成分解析、階層的クラスタリングを用いて細胞群の関連を検討する。免疫細胞では、正常組織よりも腫瘍組織で増加していることがシングルセル解析でも報告された制御性 T 細胞(Treg)や Th17 細胞に着目する。

さらに、ヒト大腸癌組織由来 CAF を樹立・培養、FACS で CAF サブセットを分取し、免疫細胞との機能解析を *in vitro* で行い、腫瘍免疫応答を抑制、あるいは促進する特異的 CAF サブセットを同定する。従来のトランスウェルアッセイだけでなく、癌細胞・間質細胞・免疫細胞を3次元共培養したオルガノイドモデルを作成する。同一患者由来オルガノイドを、CAF サブセット及び免疫細胞と共培養することで生体内に近い腫瘍微小環境を再現して機能解析を行う。

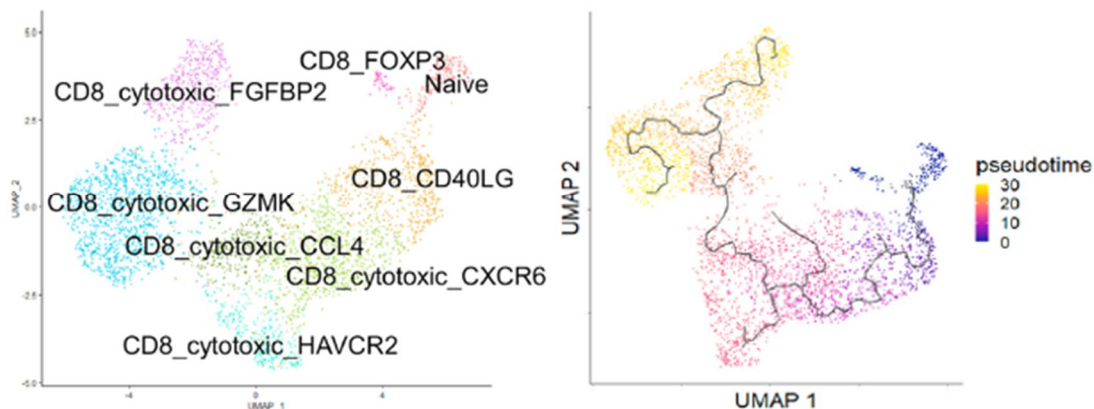
### 4. 研究成果

当研究室における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200例を超えている。大腸癌について、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の疑似系譜解析や細胞間相互作用についての解析も行った。また、樹立したオルガノイドとの共培養に用いることを目的として、採取した大腸癌組織から CAF の樹立も行っており、その手技は確立している。

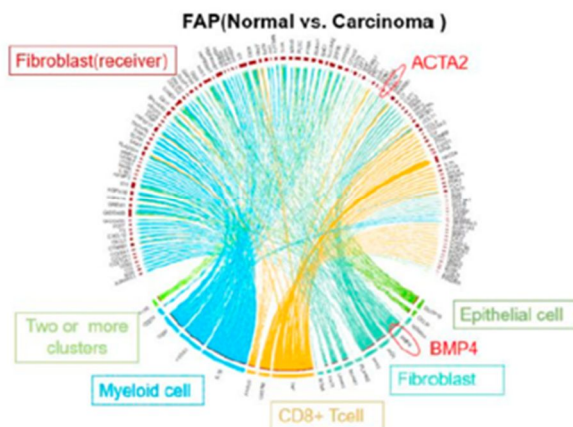
Visium を用いた空間的トランスクリプトーム解析は各種試薬準備や実験手技の確立をすすめている。

### FAP由来大腸癌組織のCD8+ T cellのクラスタリングおよび疑似系譜解析



Hisano K. et al. Cancer Letters 2024

### FAP由来大腸癌組織の線維芽細胞とその他の細胞種の細胞間相互作用解析 (正常部と癌部の比較)



Hisano K. et al. Cancer Letters 2024

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計1件（うち査読付論文 1件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 0件）

1. 著者名 Hisano Kyoko, Mizuuchi Yusuke, Ohuchida Kenoki, Kawata Jun, Torata Nobuhiro, Zhang Jinghui, Katayama Naoki, Tsutsumi Chikanori, Nakamura Shoichi, Okuda Sho, Otsubo Yoshiki, Tamura Koji, Nagayoshi Kinuko, Ikenaga Naoki, Shindo Koji, Nakata Kohei, Oda Yoshinao, Nakamura Masafumi	4. 巻 589
2. 論文標題 Microenvironmental changes in familial adenomatous polyposis during colorectal cancer carcinogenesis	5. 発行年 2024年
3. 雑誌名 Cancer Letters	6. 最初と最後の頁 216822
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.canlet.2024.216822	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 1件）

1. 発表者名 堤親範、大内田研宙、片山直樹、大坪慶志輝、寅田信博、進藤幸治、森山大樹、水内祐介、仲田興平、中村雅史
2. 発表標題 por2胃癌・食道胃接合部癌における癌関連線維芽細胞とCD8陽性T細胞の相互作用の解明
3. 学会等名 第78回日本消化器外科学会総会
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 久野恭子、水内祐介、大内田研宙、孫起和、片山直樹、堤親範、寅田信博、藤本崇聡、田村公二、永吉絹子、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癌段階のmyeloid cellの比較
3. 学会等名 第44回癌免疫外科研究会
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 久野恭子、水内祐介、大内田研宙、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 Yuki Mochida, Kenoki Ohuchida, Nobuhiro Torata, Tomohiko Shinkawa, Toshiya Abe, Noboru Ideno, Naoki Ikenaga, Kohei Nakata, Masafumi Nakamura
2. 発表標題 Single-cell RNA sequence-based evaluation of the mechanism of CAF-related chemo-resistance of PDAC
3. 学会等名 第53回日本膵臓学会大会・第26回国際膵臓学会 ( IAP・JPS2022 ) ( 国際学会 )
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 久野恭子、水内祐介、大内田研宙、寅田信博、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 scRNA-seqを用いたUC由来癌におけるfibroblastのheterogeneityの解明
3. 学会等名 第77回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

〔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	甲斐 昌也 (KAI Masaya) (10755242)	九州大学・医学研究院・共同研究員  (17102)	

6. 研究組織（つづき）

	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	藤田 逸人  (FUJITA Hayato)  (40611281)	九州大学・医学研究院・共同研究員    (17102)	
研究分担者	三好 圭  (MIYOSHI Kei)  (70755272)	九州大学・医学研究院・共同研究員    (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