

科学研究費助成事業 研究成果報告書

令和 6 年 6 月 12 日現在

機関番号：12102

研究種目：若手研究

研究期間：2022～2023

課題番号：22K15520

研究課題名(和文) 臨床膵癌の「一細胞遺伝子糖鎖同時解析」によるCAFの治療標的糖鎖の探索

研究課題名(英文) Investigation of novel CAF functions by analysis of Glycan structures on the surface of cancer-associated fibroblasts (CAFs) of pancreatic cancer.

研究代表者

宮崎 貴寛 (Miyazaki, Yoshihiro)

筑波大学・医学医療系・講師

研究者番号：90909433

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,500,000円

研究成果の概要(和文)：膵癌の癌関連線維芽細胞(CAF)の治療標的となる糖鎖構造を「一細胞遺伝子糖鎖同時解析(scGR-seq)」で解明し、新規CAF標的治療薬の開発への足掛かりとすることを目的とした。臨床膵癌3検体について、scGR-seq解析を行った。当初CAF分画のみの解析を予定していたが、腫瘍全体像の把握のため、腫瘍全体の解析とした。遺伝子発現と糖鎖発現から分類した16クラスターのうち、CAFは2つに相当した。iCAF (inflammatory CAF)-likeとmyCAF (myoblastic CAF)-likeの2つのクラスターとなり、それらに特異的な糖鎖について組織染色で検証中である。

研究成果の学術的意義や社会的意義

臨床膵癌3検体について、「一細胞遺伝子糖鎖同時解析(scGR-seq)」を行った。当初CAF分画のみの解析を予定していたが、全体像の把握のため腫瘍全体の解析とした。遺伝子発現と糖鎖発現から16のクラスターに分類した。遺伝子発現と糖鎖発現から分類した16クラスターのうち、CAFは2つに相当した。iCAF(inflammatory CAF)-likeとmyCAF (myoblastic CAF)-likeの2つのクラスターとなり、それらに特異的な糖鎖について組織染色で検証中である。今後新規CAF標的治療薬の開発への足掛かりとなることが期待される。

研究成果の概要(英文)：We aimed to elucidate the glycan structures of therapeutic targets of cancer-associated fibroblasts (CAFs) in pancreatic cancer by “simultaneous single-cell gene glycan analysis (scGR-seq)”. We performed scGR-seq analysis on three clinical pancreatic cancer samples. Although we initially planned to analyze only the CAF fraction, we decided to analyze the entire tumor in order to obtain an overall picture of the tumor. Among 16 clusters classified by gene expression and glycan expression, CAFs corresponded to two clusters, iCAF (inflammatory CAF)-like and myCAF (myoblastic CAF)-like, and their specific glycans are now being verified by tissue staining.

研究分野：消化器外科

キーワード：膵癌 癌関連線維芽細胞 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

難治性固形癌である膵癌(5年生存率 7-8%)は間質組織を誘導して増殖させ、間質の主要構成細胞である癌関連線維芽細胞(Cancer Associated Fibroblast: CAF)と癌細胞がダイナミックに cross talk して癌の発生・増殖が進む。特に膵癌の病理組織像においては増殖した間質が非常に多くを占め、癌の腺管をはるかに凌駕しており、間質が物理的なバリアとなり抗癌剤抵抗性の一因となることは明らかである。加えて、CAF はサイトカインやケモカインなどの分泌によって、癌に直接的に、あるいは免疫細胞などを介して間接的に作用する。癌増殖促進的にも抑制的にも作用する。既存の研究では癌細胞のみが注目され、癌-間質(CAF)相互作用に注目した研究は少ない。よって、膵癌の間質(CAF)に着目した研究が不可欠であった。また、CAF の糖鎖・レクチンに関する研究はこれまであまり行われておらず、癌の間質の機能解明のブレイクスルーになる可能性があった。

2. 研究の目的

膵癌 CAF の治療標的となる糖鎖構造を「一細胞遺伝子糖鎖同時解析(scGR-seq)」という最新手法を用いて解明し、新規 CAF 標的治療薬の開発への足掛かりとすることを目的とした。

3. 研究の方法

実験 1

大学附属病院で摘出した膵癌 3 検体について scGR-seq 解析を行った。腫瘍を手動的細断後、酵素処理により細胞単離を行った。

当初フローサイトメトリーによる CAF 分画の抽出を行い、CAF 分画のみの解析を予定していたが、腫瘍全体像の把握のため、CAF 分画を抽出せず、癌細胞を含む上皮系細胞、免疫細胞などを含めて腫瘍全体の解析とした。

実験 2

実験 1 で抽出された候補レクチンの検証 (組織染色)

4. 研究成果

図 1, 図 2 に臨床膵癌 3 検体で行った GR-seq の結果を UMAP で示す。図 1 に 3 検体のばらつきを示した。それぞれの検体毎に偏りはあるが、位置の分布よりそれぞれが異なる細胞集団より構成されていることがわかった。また、3 色が混ざり合っていることから、適正に細胞単離が行われ、解析されていることがわかった。もちろん検体毎に含まれる細胞の割合は異なるはずであり、検体毎に細胞数の偏りがあることは自然なことである。

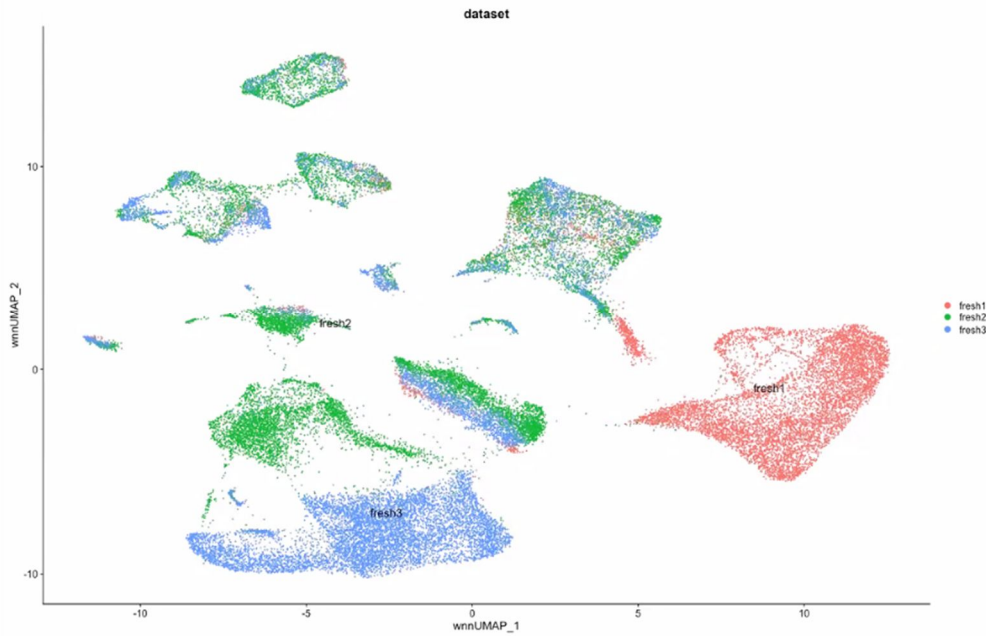


図1 臨床検体 3 検体における患者ごとのばらつき

遺伝子発現の違いにより 16 のクラスターに分類した (図 2)。CAF のクラスターは遺伝子発現パターンから 2 つのクラスターに相当し、既報に照らし、iCAF (inflammatory CAF)-like と myCAF (myoblastic CAF)-like の 2 つのクラスターとなった。

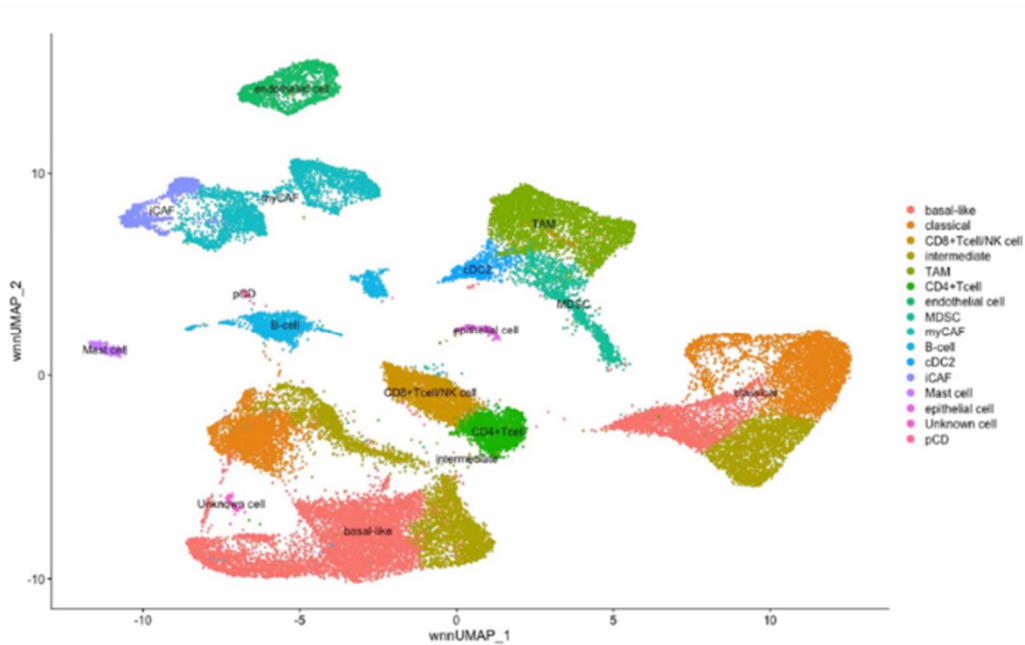


図2 臨床腫瘍を 16 の細胞集団に分類した



図3 16 クラスター毎の結合レクチン強度を示すドットプロット

16 のクラスターにおける結合レクチン強度をドットプロットで示した (図 3) 。
 上皮系細胞と CAF は明らかに結合するレクチンが異なることがわかった。しかし、腫瘍微小環境に存在する免疫細胞、血管内皮細胞、CAF では共通に認識するレクチンが多いことがわかった。これは発現する糖鎖が類似していることを示している。

| P value | cell | Lectins | Glycans | P value | cell | Lectins | Glycans | P value | cell | Lectins | Glycans |
|-------------|-------------------|---------|---|------------|-----------|---------|---|------------|------------------|---------|-------------------------|
| 0 | basal-like | PVL | Sia, GlcNAc | 0 | TAM | rLSLN | LacNAc, polylectosamine | 0 | endothelial cell | TJAI | α1-2Fuc |
| 0 | basal-like | rBC2LCN | Fuc α1-2Galβ1-3GlcNAc (GalNAc) | 1.768E-298 | TAM | PHAE | bisecting GlcNAc | 0 | endothelial cell | PHAE | bisecting GlcNAc |
| 8.243E-106 | basal-like | HPA | αGalNAc (A, Tn) | 6.118E-279 | MDSC | rLSLN | LacNAc, polylectosamine | 0 | endothelial cell | UEAI | α1-2Fuc |
| 1.00055E-36 | classical | rAOL | α1-2Fuc (H), α1-3Fuc (Lex), α1-4Fuc (Lea) | 1.533E-145 | MDSC | rAOL | α1-2Fuc (H), α1-3Fuc (Lex), α1-4Fuc (Lea) | 0 | myCAF | PHAE | bisecting GlcNAc |
| 0 | classical | rBC2LCN | Fuc α1-2Galβ1-3GlcNAc (GalNAc) | 7.2482E-96 | MDSC | rPTL | α1-6Fuc | 0 | myCAF | MAL.1 | α2-3Sia |
| 1.4436E-54 | intermediate | rBC2LCN | Fuc α1-2Galβ1-3GlcNAc (GalNAc) | 1.527E-138 | MDSC | cDC2 | SNA | 1.166E-240 | myCAF | rACG | α2-3Siaα2-3Sia |
| 1.4436E-54 | intermediate | rF17AG | GlcNAc | 2.0712E-66 | cDC2 | SSA | α2-6Sia | 2.22E-186 | iCAF | MAL.1 | α2-3Sia |
| 4.579E-32 | intermediate | NPA | Manα1-3Man | 8.137E-51 | cDC2 | rACG | α2-3Sia | 6.359E-182 | iCAF | PHAE | bisecting GlcNAc |
| 2.0188E-21 | epithelial cell | rPTL | α1-6Fuc | 3.768E-297 | B-cell | SNA | α2-6Sia | 2.938E-115 | iCAF | rACG | α2-3Sia |
| 2.5317E-17 | epithelial cell | UEAI | α1-2Fuc | 1.072E-250 | B-cell | rPTL | α1-6Fuc | 5.272E-10 | Unknown cell | HPA | αGalNAc (A, Tn) |
| 2.4487E-06 | epithelial cell | rMOA | αGal (B) | 4.905E-138 | B-cell | TJAI | α2-6Sia | 5.5087E-09 | Unknown cell | rLSLN | LacNAc, polylectosamine |
| 1.8229E-88 | CD4+Tcell | WFA | Terminal GalNAc, LacDINAc | 6.5339E-16 | pCD | rLSLN | LacNAc, polylectosamine | 0.02423299 | Unknown cell | rF17AG | GlcNAc |
| 2.8414E-80 | CD4+Tcell | TJAI | α2-6Sia | 2.3901E-11 | pCD | HPA | αGalNAc (A, Tn) | | | | |
| 1.9972E-65 | CD4+Tcell | rMOA | αGal (B) | 3.8664E-07 | pCD | GSLII | GlcNAcβ1-4Man | | | | |
| 4.637E-111 | CD8+Tcell/NK cell | GSLII | GlcNAcβ1-4Man | 4.0131E-73 | Mast cell | SNA | α2-6Sia | | | | |
| 1.8031E-71 | CD8+Tcell/NK cell | WFA | Terminal GalNAc, LacDINAc | 1.4771E-33 | Mast cell | SSA | α2-6Sia | | | | |
| 1.5443E-38 | CD8+Tcell/NK cell | rMOA | αGal (B) | | | | | | | | |

Top 3 of glycan binding

図4 16 クラスター毎の結合レクチンとその認識糖鎖

図4に16のクラスター毎に結合したレクチンとその認識糖鎖を示す。myCAFとiCAFにおいては有意差のあったtop3レクチンは同じであったが発現の強度が異なっていることがわかった。

実験2

その2つのクラスターに特異的なレクチンを用いて、臨床検体の組織染色で検証を行った。順位付けの高いものから検証を行っているが、実験条件の検討などに時間を要しており、検証作業はまだ途中である。引き続き検証を続けていく予定である。また、オルガノイド共培養を用いた実験系での検証も行う予定である。

【今後の展望】

今回の研究期間では、GR-seq で抽出した候補の検証までは行うことができなかったため、ひきつづき検証を続けていく予定である。

図3のドットプロットで示したように、腫瘍微小環境に存在する免疫細胞、血管内皮細胞、CAF では共通に認識するレクチンが多いことがわかった。これらの判別には遺伝子発現だけでなく、位置情報も加味して検証していくことが必要である。空間情報を加味した、空間トランスクリプトーム解析の技術も発展してきており、今後は空間トランスクリプトーム解析を行って、遺伝子発現と位置情報の両方向から CAF の性質の解明を行っていきたいと考えている。

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 (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 |
|---------|---------|
|---------|---------|