

令和 6 年 6 月 7 日現在

機関番号：15301

研究種目：若手研究

研究期間：2022～2023

課題番号：22K16660

研究課題名（和文）間葉系微小環境の改善を目指したYAP/TAZ-TEAD阻害剤による膠芽腫治療戦略

研究課題名（英文）Treatment Strategies for Glioblastoma with YAP/TAZ-TEAD Inhibitors to Improve the Mesenchymal Microenvironment

研究代表者

畷田 篤仁 (Uneda, Atsuhito)

岡山大学・医学部・客員研究員

研究者番号：20865927

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,600,000円

研究成果の概要（和文）：マルチサンプリングにより採取したヒト膠芽腫検体を用いて空間情報を追加した一細胞RNAシーケンスを行った。膠芽腫4症例14箇所の検体を用いてシーケンス解析を行った。腫瘍の中央部ではマクロファージ、深部ではoligodendrocyte precursor cellが多く含まれ、採取部位による含有細胞組成の不均一性を確認した。Mesenchymal-like、Astrocyte-like、Oligodendrocyte precursor cell-like、Neural precursor cell-likeといった膠芽腫細胞の遺伝子発現パターンについても採取部位による不均一性を確認した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

膠芽腫は治療困難な原発性脳腫瘍である。膠芽腫の腫瘍内では、異なる性質を有する腫瘍細胞クローンがそれぞれ独立して遺伝子変異を獲得しながら増殖・分化し、その中の一部が治療抵抗性・高悪性度化・浸潤・播種に関わる機能を獲得し拡大する。その過程で、腫瘍細胞と腫瘍関連マクロファージなどが相互作用することで、間葉系微小環境が形成され、治療抵抗性に関与することも明らかになった。従って、膠芽腫の進化及び腫瘍内不均一性の獲得機構を解明することが、新たな治療戦略を構築するためには有用である。

研究成果の概要（英文）：Single-cell RNA sequencing with additional spatial information was performed on human glioblastoma specimens collected by multisampling. Sequence analysis was performed using specimens from 14 locations in 4 glioblastoma cases. We confirmed the heterogeneity of the cellular composition of glioblastoma specimens, with macrophages in the central part of the tumor and oligodendrocyte precursor cells in the deeper part of the tumor. We also confirmed heterogeneity in gene expression patterns of glioblastoma cells such as Mesenchymal-like, Astrocyte-like, Oligodendrocyte precursor cell-like, and Neural precursor cell-like, depending on the collection site.

研究分野：脳神経外科

キーワード：膠芽腫 腫瘍微小環境 単一細胞解析

※科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属します。

様式 C-19、F-19-1、Z-19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

膠芽腫は治療困難な原発性脳腫瘍である。膠芽腫の腫瘍内では、異なる性質を有する腫瘍細胞クローンがそれぞれ独立して遺伝子変異を獲得しながら増殖・分化し、その中の一部が治療抵抗性・高悪性度化・浸潤・播種に関わる機能を獲得し拡大する。その過程で、腫瘍細胞と腫瘍関連マクロファージなどが相互作用することで、間葉系微小環境が形成され、治療抵抗性に関与することも明らかになった。従って、膠芽腫の進化及び腫瘍内不均一性の獲得機構を解明することが、新たな治療戦略を構築するためには必須である。

膠芽腫は、脳室下帯の起源細胞から発生し、正常神経発生の過程を模倣するように遺伝子変異およびエピジェネティックな変異を獲得しながら、脳表に向かって進展していくと予想される。近年の解析技術の進歩により、シングルセル(一細胞)レベルでの解析が可能となり、従来の一塊(バルク)の腫瘍組織の解析では検出不可能であった細胞レベルでの動的な変化や希少クローンの同定が可能となった。それにより、膠芽腫の腫瘍内では、不均一な遺伝子発現パターンの腫瘍細胞が連続性を持って存在し、微小環境構成細胞と混在していることが明らかになった。しかし、膠芽腫の起源細胞の発生母地、微小環境との相互作用による分化制御機構、腫瘍進化における脆弱性については、十分に解明されていない。

2. 研究の目的

本研究では、マルチサンプリングにより採取したヒト膠芽腫手術検体を用いて、空間情報を追加した単一細胞マルチオミクスを行う。膠芽腫の分化能、幹細胞性の維持・獲得への影響を検証し、新規治療の開発につなげる。

3. 研究の方法

脳室下帯から発生し、脳表に向かって遊走していくと予想される膠芽腫起源細胞の性質を考慮して膠芽腫検体のマルチサンプリングを行う。採取部の空間情報は、術中のナビゲーション画像、病理画像として保存する。さらに、DNA バーコード付き細胞表面マーカー抗体 (Hashtag 抗体) を用いた CITE-seq を行う。

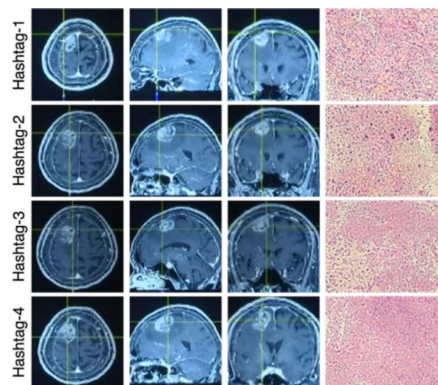
4. 研究成果

ハッシュタグ法および CITE-seq を併用したシングルセル及びシングル核マルチオームライブラリー構築のプロトコル確立のため、本年度は膠芽腫 20 症例のサンプル調整の検討を行った。物理的及び酵素反応による一細胞化処理、Debris、赤血球除去、凝集細胞のフィルタリングの条件検討を行い、安定して生存率 80%以上のサンプルを調整することが可能となった。確立したプロトコルによるサンプル調整を行い、これまでに 4 症例 14 箇所サンプルからシングルセル及び核ライブラリーを作成しシーケンス解析を行った。

シーケンスデータの解析の結果、腫瘍の中央部ではマクロファージ、深部では oligodendrocyte precursor cell が多く含まれるといった採取部位による含有細胞組成の不均一性を確認した。また、Mesenchymal-like、Astrocyte-like、Oligodendrocyte precursor cell-like、Neural precursor cell-like といった、これまでに報告されている膠芽腫細胞の遺伝子発現パターンについても、採取部位による不均一性を確認した。

引き続き、マルチサンプリング可能な症例の手術予定が組まれ次第、サンプル調整およびシーケンス

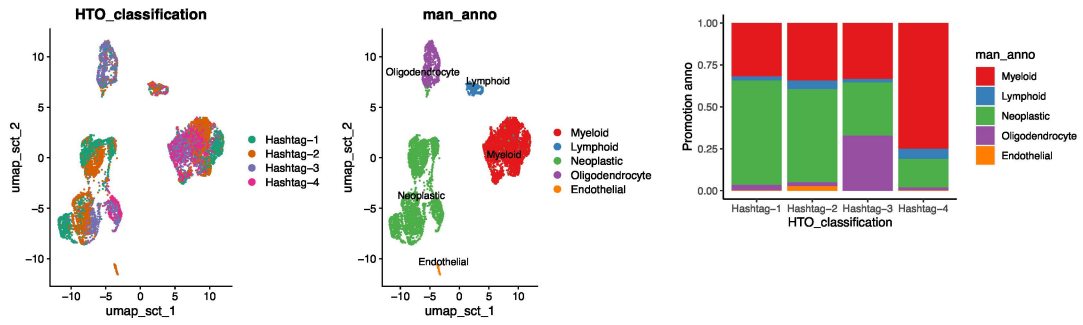
解析を進めていく。公開データとの統合解析を行い、inter tumoral heterogeneity についての解析、また、isoform 解析が可能な single cell long read RNA-seq も進めており、スプライシング解析や RNA からの変異解析も行い進展形式を明らかにしていく。



代表症例の腫瘍採取部位の MRI 及び病理画像



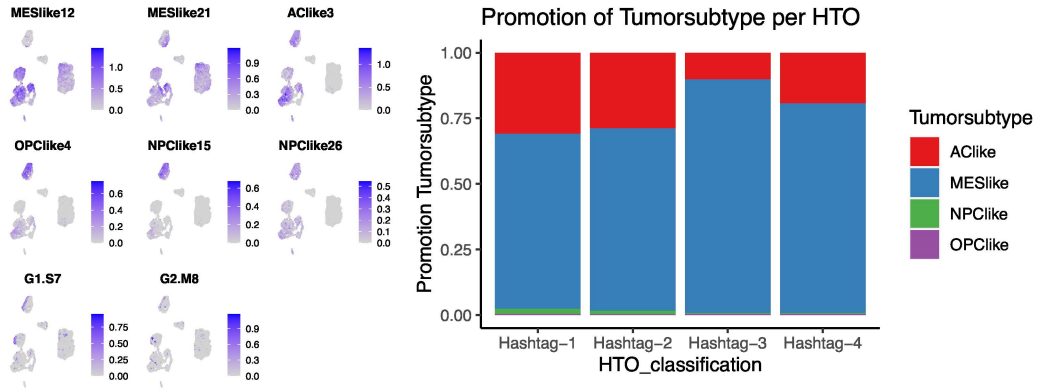
代表症例のシングルセル RNA-seq 結果



代表症例のシングルセル

RNA-seq のUMAP

細胞のアノテーション結果及び採取部位による細胞分布の違い



膠芽腫細胞遺伝子発現パターンの採取部位による分布の違い

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