

平成 28 年 10 月 24 日現在

機関番号：17102

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2013～2015

課題番号：25860542

研究課題名(和文) 胃がんの単一細胞解析と組織プロファイリングによる薬剤感受性・耐性機構の解析

研究課題名(英文) Analysis of drug sensitivity and resistance by single cell-based genetic assay and intratumoral profiling of gastric cancer

研究代表者

在田 修二 (Arita, Shuji)

九州大学・医学(系)研究科(研究院)・助教

研究者番号：20544935

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,100,000円

研究成果の概要(和文)：本課題は消化器がんの遺伝的組織内多様性を単一細胞レベルで解析することを基礎的なコンセプトとして実施された。当初は胃がんをモデルとして組織内クローナリティの変化と薬物耐性解析を実施する計画であったが実施困難であり、大腸がんをモデルとしてがん幹細胞性を中心に組織内クローナリティの解析を実施した。ヒト大腸がんの臨床検体よりCD44陽性細胞集団を分離しオルガノイド形成させることに成功した。また、CD44陰性細胞集団に対しても上皮間葉転換を誘導することで同様にオルガノイドを形成することを見出し、その過程にTWIST1およびTGF- $\beta$ シグナルが関連していることを示した。

研究成果の概要(英文)：This research program was based on a concept to analyze intratumor heterogeneity of gastrointestinal cancers by single cell-based genetic assay. Although originally planned to analyze intratumor clonal transition and drug resistance of gastric cancer, it was difficult to establish an assay of human gastric cancer. We consequently conducted experiments on human colorectal cancer to analyze cancer stemness and intratumor clonality. We achieved an experimental system of organoid formation from patient-derived CD44-positive colorectal cancer cells. Furthermore, CD44-negative cells also formed organoids under a condition of epidermal-mesenchymal transition. TWIST1 and TGF- $\beta$  signal pathway were involved in this phenomenon.

研究分野：消化器癌

キーワード：大腸がん 単細胞解析 がん幹細胞 TGF-

## 1. 研究開始当初の背景

本研究の計画時点において、進行・再発胃癌に対する化学療法は、近年のがん分子機構の解明および臨床試験実績の蓄積によって初めて分子標的治療(トラスツズマブ)が導入されたほか、種々の分子標的薬の実用化が準備段階にあり新たな局面を迎えていた。しかし、新規薬剤の使用により化学療法による予後は延長したが、依然として治療は困難であり、当初有効であった治療に対しても不応となり病状進行から死に至る経過をとる現状には根本的な変化はもたらされていなかった。

他がん種も含めたがん化学療法全般では、徐々に腫瘍の薬剤感受性あるいは耐性に関する知識が得られてきており、非小細胞肺癌の EGFR 遺伝子変異がゲフィチニブ感受性に関することや、結腸直腸癌の KRAS 遺伝子変異がセツキシマブ耐性に関わることなどが知られ、分子標的薬を中心に個別化治療が一部行われるようになってきていた。しかし、一般の殺細胞抗癌剤はもとより、個別化のうえで適応した薬剤ですら治療には至らず一定の治療期間後には治療不応となることがほとんどで、薬剤感受性・耐性に関する知見は現在でも依然として不十分である。

固形がんは一般に多重の遺伝子変異の積み重ねによって成立し、腫瘍内部での遺伝学的な不均一性が高いとされる(空間的不均一性)。Navin らによる報告(2011年)では、同一の腫瘍組織より採取単離した100個の細胞について個別にエクソーム解析を行って腫瘍細胞をいくつかの細胞クローンに分類することに成功、これらを比較し、一部のクローンに他では見られない遺伝子増幅などを検出したほか、クローナルな増殖をしていないと考えられる単一の異常細胞を多数検出し、がん組織中では頻りに新たな遺伝子異常が起こり新たな細胞が発生しているが、その変異の内容によりクローナルな増殖が可能なものと不可能なものが存在すると考察、腫瘍組織の成立に関する議論に一石を投じた。

以上のように、がん研究は多様な遺伝子変異の背景を有するヘテロな細胞集団に対して単一細胞レベルでの解析を行うことで新たな展開を見せようとしていた。化学療法が奏効する際には感受性クローンが死滅し、不応となる際には耐性クローンが増殖するモデルが想定されているが、研究開始時から現在に至るまで、これを実際に観察し証明した例はない。このモデルに基づいてがんの薬剤耐性を論じる際、上述のような腫瘍のクローナリティ解析(組織プロファイリング)はきわめて重要で、単一細胞レベルでの解析を実現することで、組織全体(バルク)の遺伝子解析では得られなかった多くの新たな情報が得られると考えられた。

反復して腫瘍生検が可能な胃癌をモデル疾患とし、化学療法の経過に従った組織プロ

ファイルの変化を観察することで、in-vivoで薬剤感受性クローンあるいは耐性クローンを同定、その他のクローンとの比較においてその遺伝学的・分子生物学的性質を明らかにすることが可能と考えられ、実験を計画した。また、得られた情報を元に薬剤感受性・耐性機構の一端を解明し、個別化治療・耐性克服にむけて新たな情報を提供することが可能となると想定された。

## 2. 研究の目的

本研究では、組織内の腫瘍細胞を単一細胞ごとに解析することで組織内のクローナリティを解析し(組織プロファイリング)、これを化学療法の経過に従って反復することで、in-vivoで薬剤感受性・耐性クローンを特定する。これらのクローンを解析し新たな薬剤感受性・耐性関連遺伝子を同定することで、個別化治療・耐性克服に新たな情報を提供することを目的としている。

## 3. 研究の方法

- 1 胃癌患者の原発巣生検組織を用いた単細胞解析にもとづくクローナリティ解析(組織プロファイリング)
- 2 化学療法経過での組織プロファイル変化の観察
- 3 上記の観察による、化学療法薬への感受性遺伝子および耐性遺伝子の同定
- 4 培養細胞への遺伝子組換え実験による、化学療法薬感受性および耐性遺伝子の機能解析

## 4. 研究成果

本研究は、胃癌に対して反復生検した試料を用いることを基礎に計画された。しかし、まず胃癌の手術切除検体を用いて単一細胞解析を試みるも、組織の繊維化が強いなどの影響で解析が困難であった。一方で、同じ消化管がんである大腸がんの手術検体を用いた解析では、生存率の良好な癌細胞が単一細胞として分離することが可能となったため、研究対象を大腸がんに変更して実施する方針とした。

大腸がんでは、多くの症例で化学療法開始前に原発巣が切除される。また、原発巣を切除せずに有している患者でも、頻回の大腸内視鏡検査は負担が大きいため、実臨床では胃癌に対するほど頻回には内視鏡検査による原発巣の病状確認を実施しないのが通常である。このため、大腸がんを研究対象とした場合、治療経過での反復生検は実施が困難と判断され、組織および細胞が潤沢に採取できる手術検体を用いた単回の解析を行うことを再計画した。

本研究課題の基礎となる組織内多様性に対する単一細胞解析という概念を単回の解析に当てはめ、組織内のがん細胞多様性とがん幹細胞性についての解析を実施した。

まず、患者由来大腸がん組織から得られた CD44 陽性細胞の中にがん幹細胞性を示すがん細胞が存在し、試験管内およびマウス異種移植で培養、組織再構築しうる（オルガノイド形成）ことを確認した（図 1）。

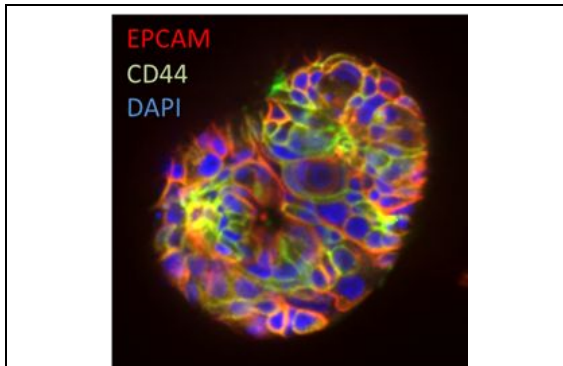


図 1  
大腸がん臨床検体からがん細胞を単離し試験管内で培養、組織再構築したもの。EPCAM (赤)、CD44 (緑) の発現にばらつきがあり、組織内多様性を再獲得していると考えられた。

再構築された臨床検体由来オルガノイドを再度単一細胞分離しそのクローナリティを解析したところ、OCT4、SOX2、NANOGなどを強発現するがん幹細胞様集団と非がん幹細胞集団に分けられた。上皮間葉転換の指標のひとつである TWIST1 はがん幹細胞様集団に強く発現していた（図 2）。

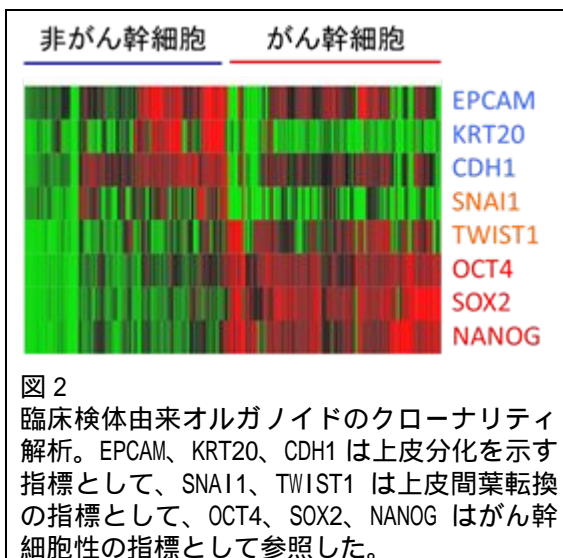


図 2  
臨床検体由来オルガノイドのクローナリティ解析。EPCAM、KRT20、CDH1 は上皮分化を示す指標として、SNAI1、TWIST1 は上皮間葉転換の指標として、OCT4、SOX2、NANOG はがん幹細胞性の指標として参照した。

一方で CD44 陰性細胞集団に対しては、上皮間葉転換を誘導する刺激を与えることで幹細胞性を獲得しうることを見出した。そこに TWIST1 および TGF-シグナル経路が関与していることを示した（図 3）。

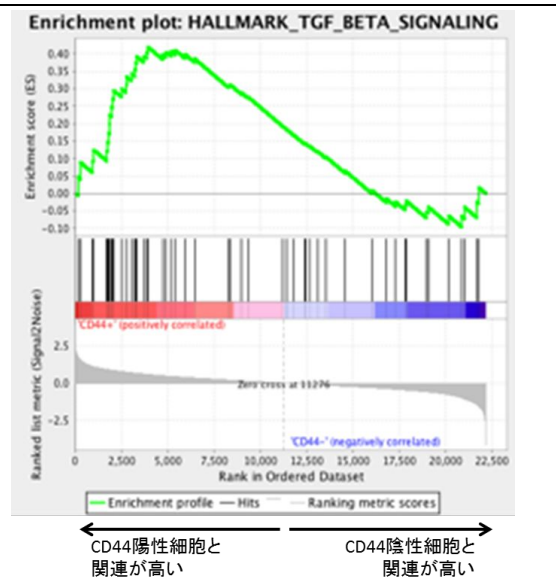


図 3  
TGF-シグナル関連遺伝子発現スコアの enrichment plot。CD44 陽性細胞において TGF-シグナル関連遺伝子が高発現していることが示された。

## 5. 主な発表論文等

（研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線）

〔雑誌論文〕(計 0 件)

〔学会発表〕(計 11 件)

(1) Nakano M, Ariyama H, et al. Plasticity of CD44+ colorectal cancer stem cells depend on TGF-beta-induced epithelial mesenchymal transition: evidences from an ex-vivo culture. American Association of Cancer Research Annual Meeting 2014. 2014 年 4 月 7 日サンディエゴ。

(2) 中野倫孝、有山寛ら. Plasticity of CD44+ colorectal cancer stem cells depend on TGF-beta-induced epithelial mesenchymal transition: evidences from an ex-vivo culture. 第 12 回日本臨床腫瘍学会学術集会. 2014 年 7 月 17 日~19 日福岡。

(3) 中野倫孝、有山寛ら. Plasticity of CD44+ colorectal cancer stem cells depend on TGF-beta-induced epithelial mesenchymal transition: evidences from an ex-vivo culture. 第 73 回日本癌学会学術集会. 2014 年 9 月 25 日~27 日横浜。

(4) Nakano M, Ariyama H, et al. Plasticity of CD44+ colorectal cancer stem cells depend on TGF-beta-induced EMT. American Association of Cancer Research Annual Meeting 2015. 2015 年 4 月 20 日ペンシルバニア。

(5) Nakano M, Ariyama H, et al. EMT induces sphere forming ability in primary colorectal cancer. 第 13 回幹細胞シンポジ

ウム. 2015年5月30日東京.

(6) 中野倫孝、田中守、在田修二ら. 悪性腹水中がん細胞のCD44の発現は可塑性をもち、TGF-betaシグナルが関与している. 第74回日本癌学会. 2015年10月9日名古屋.

(7) 中野倫孝、菊繁吉兼. スフェア培養を用いた上皮間葉転換によるがん幹細胞性の獲得. 新学術領域「幹細胞老化と疾患」若手の会. 2016年1月29日熱海.

(8) 中野倫孝、田中守ら. 上皮間葉転換によるがん幹細胞性の獲得. 新学術領域「がん支援」. 2016年2月3日大津.

(9) 中野倫孝、有山寛ら. Epithelial to mesenchymal transition by TGF-beta induced cancer stem-like property in primary colorectal cancer. 第13回日本臨床腫瘍学会学術集会. 2015年7月18日~20日札幌.

(10) Nakano M, Tanaka M, Arita S, et al. TGF-beta signaling pathway induced cancer stem-like properties in human CD44-colorectal cancer cells. American Association of Cancer Research Annual Meeting 2016. 2016年4月16日~20日ニューオーリンズ.

(11) Tanaka M, Nakano M, et al. Macrophage to fibroblast transition promote cancer progression in malignant ascetic environment within gastrointestinal peritoneal carcinomatosis patients.

〔図書〕(計 0 件)

〔産業財産権〕  
出願状況(計 0 件)

取得状況(計 0 件)

〔その他〕  
なし

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

在田 修二 ( Shuji ARITA )  
九州大学大学院 医学研究院 九州連携臨床腫瘍学講座 助教  
研究者番号: 20544935

### (2) 研究分担者

なし

### (3) 連携研究者

有山 寛 ( Hiroshi ARIYAMA )  
九州大学病院 血液・腫瘍内科 助教  
研究者番号: 80713437

### (4) 研究協力者

中野倫孝 ( Michitaka NAKANO )  
田中守 ( Mamoru TANAKA )