

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 6 月 27 日現在

機関番号：82606

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2014～2015

課題番号：26670195

研究課題名(和文) 単一細胞レベルでの遺伝子発現プロファイリングによるがんの細胞不均一性解析

研究課題名(英文) Characterization of cellular heterogeneity of colon tumors by gene expression analyses at the single cell level

研究代表者

塩川 大介 (Shiokawa, Daisuke)

国立研究開発法人国立がん研究センター・その他部局等・ユニット長

研究者番号：90277278

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,600,000円

研究成果の概要(和文)：本研究課題の研究成果として我々はMinマウス大腸がんモデルを用い、がん部及び非がん部を構成する上皮細胞群をそれぞれの遺伝子発現プロファイルに基づき機能的に異なる7種の細胞群に分類する事に成功した。ここで見いだされた細胞多様性の大腸発がんに伴う変化を解析し、吸収系及び分泌系細胞群それぞれの様々な分化段階に於ける細胞分布どのように変化するのか、正常幹細胞はどのようにがん幹細胞へと変わってゆくのかを遺伝子発現レベルで明らかにした。さらに正常及びがん幹細胞に於けるWntターゲット遺伝子の発現を調べ、腸管上皮幹細胞のヘテロジェナイティー、がん発生に伴う細胞集団の質的变化を明らかにすることに成功した。

研究成果の概要(英文)：In order to get an insight into the molecular basis of the tumor heterogeneity, we attempted to determine gene expression profiles of tumor cells at single cell levels. Colon adenomas as well as normal epithelium in mouse carcinogenesis models are single cell-sorted by flow cytometry, and the gene expression profiles of each cell were determined by RT-PCR assays (BioMark HD system, Fluidigm). By processing the resulting data by principal component analysis (PCA), we dissected the normal and tumor epithelium into stem and differentiated cell populations.

Notably, tumor-derived stem cells were located on distinct positions from those from normal colon on the PCA plot. Given the well-established roles of the Wnt pathway in colon cancer, we examined the expression of Wnt target genes, and found that the expression of a subset of Wnt targets was altered during carcinogenesis.

研究分野：がん生物学

キーワード：大腸がん シングルセル 遺伝子発現解析 Wntシグナル

1. 研究開始当初の背景

がん組織を構成する細胞は均一では無く、異なる性状を持つ細胞群から成るヘテロな集団であることが知られている。

この現象は「がんの細胞不均一性」と呼ばれ、がん細胞に起こる遺伝子変化、さらにはがん幹細胞を頂点とする細胞分化などの要因により惹起されると考えられている。しかし、実際のがん組織がどのような種類の細胞群から構成されるかに関しては、現在まで主に免疫染色等の手法に基づき分類されているに過ぎず、その詳細は不明な点が多い。さらにはがん発生の本質とも考えられる幹細胞群のがん化に伴う変化、不均一性に至っては、その本格的な解析がこれまで行われていない。

2. 研究の目的

本研究課題に於いて我々は単一細胞レベルでの遺伝子発現解析を可能とするシングルセル qPCR 法を用い、個別細胞レベルでの遺伝子の発現プロファイリングに基づきがん細胞を分類するという新たな着想で、がん組織に於ける細胞不均一性の詳細を明らかにする。さらにはがん組織を構成する細胞の中で特に幹細胞群の変化、即ち正常幹細胞とがん幹細胞の相違を明らかにし、がん発生メカニズムの解明を試みる。

3. 研究の方法

本研究に於いては Min マウスの DSS 誘導大腸がんモデルを用い、

1) 個別細胞の遺伝子発現プロファイリングによるがん細胞のヘテロジェナイティー解析。

2) 幹細胞群の経時的変化に着目した発がんメカニズムの解明を行う。

4. 研究成果

Min マウスに DSS 投与後経時的に動物を屠殺、大腸よりがん部、非がん部を回収した。得られた組織からコラゲナーゼ処理により細胞を調製、上皮細胞をセルソーターを用いて 96 穴プレート上にシングルセルソーティングした。さらに細胞を溶解後逆転写酵素を加え cDNA を合成、リアンプリフィケーション後様々な腸管上皮細胞の分化状態に特徴的な遺伝子の発現パターンを qPCR 法により解析した。得られた結果をクラスタリング解析することにより、正常及びがん細胞を 7 種のグループに分類した (図 1)。

さらにシングルセル遺伝子発現データを PCA 法により次元圧縮を行い 2 次元プロット上に細胞分布を可視化した (図 2)。PCA プロット上に分類された 7 グループがどのような細胞集団を表すのかをそれぞれのグループに特徴的な遺伝子発現に基づきアノテーションを行った結果、吸収系分化細胞、吸収系インターミディエイト細胞、吸収系プロジェ

ニター細胞、分泌系分化細胞、分泌系プロジェニター細胞、正常幹細胞、及びがん幹細胞からなる細胞集団であると判定された (図 2)。

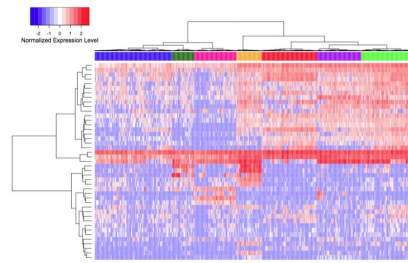


図 1、Min マウス大腸がん細胞より得られたシングルセル遺伝子発現データのクラスタリング解析。

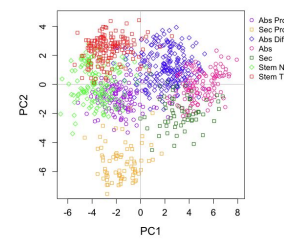


図 2、Min マウス大腸がん細胞より得られたシングルセル遺伝子発現データの PCA 解析。

さらに得られた結果をサンプルごとに分離し各細胞集団の発がんに伴う経時変化を調べた。興味深いことに発がんに伴い、1) 分泌系細胞は幹細胞からプロジェニター細胞への分化過程が阻害される、2) 吸収系細胞はプロジェニター細胞への分化は行われるが最終分化過程が阻害される、3) 幹細胞集団は発がんに伴い新たな細胞集団が出現する、ことが明らかになった (図 2)。

発がんに伴う幹細胞の性状変化の実態を明らかにするため、正常およびがん組織から回収した幹細胞集団に於ける Wnt ターゲット遺伝子群の発現プロファイルを調べた。当該実験に於いては、腸管上皮細胞の幹細胞マーカーとして広く用いられている Lgr5 遺伝子発現を指標とした。

DSS 投与 Min マウスの大腸よりがん部、非がん部を回収し、酵素処理により得られた細胞を Epcam/Cd24 発現を基にシングルセルソーティングした。それぞれの細胞より cDNA を合成、リアンプリフィケーションを行ったのち、腸管幹細胞で発現する Wnt ターゲット遺伝子の発現レベルを定量した。得られたデータセットより Lgr5 遺伝子陽性細胞を選択し以下の解析を行った。

上述により得られたシングルセルデータをクラスタリング法を用い 4 種のグループに分類した (図 3)。さらに PCA 法により 2 次

元プロット上にそれぞれの細胞集団を可視化することに成功した(図4)。

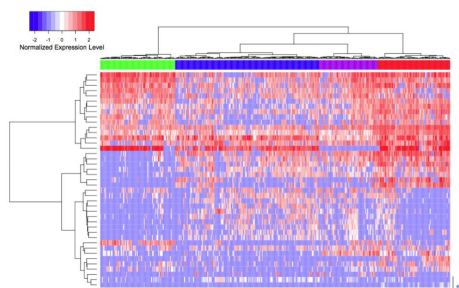


図3、Min マウス大腸上皮幹細胞より得られたシングルセル遺伝子発現データのクラスタリング解析。

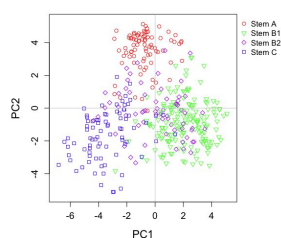


図4、Min マウス大腸上皮幹細胞より得られたシングルセル遺伝子発現データのPCA解析。

得られた結果を正常及びがん由来のサンプル群に分けて解析したところ、正常組織由来 Lgr5 陽性幹細胞はA,B及びCの3群から構成されること、がん組織由来 Lgr5 陽性幹細胞はB,C及びDの3群から構成されることが明らかとなった。即ち、がんの発生に伴い新たな幹細胞集団が出現することを見出した。

本研究の成果により大腸がんのヘテロジェニティーが明らかとなり、さらに幹細胞集団の発がん過程に於ける質的変化の実態が解明された。本研究により示された幹細胞集団のヘテロジェニティーは世界初の成果であり、今後発がん過程の全容を解明する上で重要な知見である。さらに我々はがん発生過程に於ける幹細胞集団のシングルセルデータをクラスタル・ウォリス検定により解析し、D群幹細胞を特徴付ける Wnt ターゲット遺伝子を 15 遺伝子同定しており、現在これらの遺伝子の発がん過程に於ける役割の解析を進めている。

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4件)

1. 日本がん学会(パシフィコ横浜 2014年9月25日~27日): Altered expression of a subset of Wnt target genes in colon

tumor-derived stem cells demonstrated by single-cell qPCR

Daisuke Shiokawa, Masako Ochiai, Hitoshi Nakagama, Koji Okamoto

2. 日本がん学会(名古屋国際会議場 2015年10月8日~10日): Heterogeneity of Lgr5-positive colon tumor stem cells demonstrated by single-cell qPCR

Daisuke Shiokawa, Hirokazu Ohata, Koji Okamoto

3. Stem Cell Research Symposium (東京大学 伊藤国際学術研究センター 2015年5月29日~30日): Dynamic regulation of colon tumor-derived stem cells demonstrated by single-cell qPCR

Daisuke Shiokawa, Hirokazu Ohata, Koji Okamoto

4. 個体レベルでのがん研究支援活動ワークショップ(大津市琵琶湖ホテル 2016年2月3日~4日): 単一細胞レベルの遺伝子発現解析により示された Lgr5 陽性大腸がん幹細胞の多様性

Daisuke Shiokawa, Hirokazu Ohata, Koji Okamoto

〔図書〕(計0件)

〔産業財産権〕

出願状況(計0件)

名称:

発明者:

権利者:

種類:

番号:

出願年月日:

国内外の別:

取得状況(計0件)

名称:

発明者:

権利者:

種類:

番号:

取得年月日:

国内外の別:

〔その他〕

ホームページ等

6. 研究組織

(1) 研究代表者

塩川大介 (Daisuke Shiokawa)

国立がん研究センター研究所 ユニット長

研究者番号: 90277278

(2) 研究分担者

()

研究者番号：

(3)連携研究者 ()

研究者番号：