

平成29年度シニア・リサーチフェロー
研究成果報告書

平成30年 5月 31日 提出

公益財団法人 がん研究振興財団
理事長 堀田 知光 殿

報告者氏名：宮崎 利明



研究課題：がん本態解明に関する研究
(テーマ) 難治がんの大規模シングルセル解析によるがん組織多様性の解明及び臨床応用

研究期間： 自 平成29年 4月 1日
至 平成30年 3月 31日

研究指導者：氏名 岡本 康司



公益財団法人 がん研究振興財団

(1) シニア・リサーチフェロー期間中の研究について

1) 要旨

がん組織は均一ながん細胞からなる組織ではなく、多様な特性を持ったがん細胞とそれらを取り巻く様々なニッチ細胞（線維芽細胞、免疫系細胞、内皮細胞等）から構成される複雑な組織であり、これらの全体像の理解は、造腫瘍性、抗がん剤抵抗性、転移能等の、がんの難治性に関わる様々な特性の解明、ひいては革新的治療法の開発に必須である。当研究室においては、マウス大腸発がんモデル、及びヒト大腸がんのマウス PDX (Patient-Derived Tumor) を用いて、大腸がん組織の多様性理解を目的としたシングルセル発現解析の実験系を構築してきた。とりわけ、*in vivo* における幹細胞性を有するがん細胞を中心とした解析を行い、マウス大腸発がんモデルにおける解析 (Shiokawa D., et al., Cell Rep. 2017)、ヒト大腸がんのマウス PDX の解析について研究を行っている。現在さらなる研究技術の進展を目指し、革新的な技術導入による、がん組織を構成する全ての細胞の大規模シングルセル解析を目指した実験系を構築中である。

本研究は、まず大腸がん移植腫瘍におけるシングルセル遺伝子発現解析を通じて、大腸がんの組織多様性を明らかにし、さらに抗がん剤抵抗性を与える遺伝子群を解明する事を目的とした。今後は、droplet technology (Macosko et al, Cell, 2015) の技術を用いてがん組織を構成する数千個の細胞を単離、cDNA 合成を行った後、次世代シーケンサーを用いた解析により各細胞の発現プロファイルを決定する。これらの情報の統合解析によるがん構成細胞の全体像を俯瞰する。これらの解析を様々な腫瘍組織で行い、組織多様性の理解、及びがん難治性克服に向けた治療法開発の礎としたい。

2) 序

近年、様々ながん種において正常組織の持つ分化能や階層性が保たれている事が報告されている。このように自在に性質を変化するがん細胞の特性により、がん組織構成の理解をより困難にしている。また、がん組織における治療抵抗性の獲得は、がん組織を構成する細胞の一部により担われていると予想されるため、がん細胞の多様性の実態を解明することは、難治がんの持つ治療抵抗性を理解するために重要である。しかしながら、がん細胞を集団で解析する従来の研究方法では、がん組織を構成する個々の細胞の特質を解析する事は難しく、その多様性の理解のために新たな方法論の導入が必要とされている。当研究室では、ヒト大腸がん手術検体の無血清培地を用いたスフェロイド培養法によりがん幹細胞の樹立に成功している。樹立し

たスフェロイド細胞はがん幹細胞の特性を有し、免疫不全マウスに移植する事により、原発がんと類似の腫瘍を再現性よく再構成する事ができる。そこで本研究は、まず大腸がん移植腫瘍におけるシングルセル遺伝子発現解析を通じて、大腸がんの組織多様性を明らかにし、さらに抗がん剤抵抗性を与える遺伝子群を解明する事を目的とした。第一に、大腸がん組織の多様性を明らかにするため、大腸がん幹細胞由来移植腫瘍を用いて腫瘍構成細胞の発現プロファイルの解析を行った。大腸がん移植腫瘍より単一がん細胞を回収し、大腸がん幹細胞及び分化細胞に特徴的な遺伝子の定量 PCR を行った。各細胞の遺伝子発現データを分析し、これらの分析結果を総合的に評価した。その結果、大腸がん上皮組織はがん幹細胞、分化がん細胞の発現特性を有する細胞群に分けられ、大腸がん組織を構成する細胞の多様性が明らかとなった。

次に、抗がん剤治療抵抗性細胞の同定を目的として、担がんマウスに対して、大腸がんの標準的治療薬であるイリノテカンの腹腔内投与による抗がん剤治療を施行した。イリノテカン投与前後の移植腫瘍から腫瘍細胞を単離し、シングルセル遺伝子発現解析を行った。その結果、大腸がんがん幹細胞群がイリノテカン投与後に増加している事が明らかとなり、これらの細胞群が治療抵抗性を担っている事が示唆された。重要な事として、イリノテカン治療抵抗性細胞は、免疫不全マウスの皮下に再移植する事により、病理組織学的に初発腫瘍と区別できない腫瘍を再形成した。すなわち、イリノテカン投与後に残存した治療抵抗性細胞はがん幹細胞性を有し、がんの再発に寄与している事が強く示唆された。

3) 実験方法

初代ヒト大腸癌サンプル

ヒト大腸がんサンプルは、国立がんセンター中央病院（中央区、東京都）でインフォームドコンセントを受けた患者から切除したものをを用いた。

がん細胞の単離と細胞培養

腫瘍サンプルを細かく切り刻み、37°Cで1時間、1 mg/mL コラゲナーゼ D および 1 µg/mL DNase I で酵素的に解離させた後、100 および 70 µm の細胞ストレーナを通した。赤血球溶解溶液で赤血球を溶解した後、濾過した細胞を、8 ng/mL の bFGF、20 µmol/L の Y-27632 を補充した STEMPRO hESC SFM 、およびペニシリン/ストレプトマイシンを超低付着培養皿上に置いた。連続継代のために、スフェロイド細胞を Accutase で単細胞に1週間に1回解離させ、先に記載した培養条件下でインキュベートした。

動物実験

スフェロイド細胞の移植アッセイのために、スフェロイド細胞を Accutase を用いて単一細胞に解離させた後に、50% Matrigel を含む 50 μ L の培地に懸濁し、NOD/SCID マウスの側面に皮下注射した。

フローサイトメトリー分析

マウス皮下に形成させた腫瘍は、単一スフェロイド細胞にし、生存不能細胞を排除するために 7-AAD と共にインキュベートし、Epcam に対するアロフィコシアニン (APC) - コンジュゲートモノクローナル抗体を用いた。アイソタイプが一致したマウス免疫グロブリンをコントロールとして使用した。次に、FACS Aria II Cell Sorter を用いて、染色細胞を選別した。

シングルセル qPCR

シングルセル遺伝子発現分析は、Fluidigm Biomark 48.48 マイクロ流体チップシステムを用いて行った。単一細胞を分離し、1.2 U/ μ L SUPERase-In および 0.5% NonidetP-40 を補充した 1.2 \times VILO 反応混合物 5 μ L を含む 96 ウェルプレート中で分離および溶解した。1.2 μ g/mL の T4 Gene 32 タンパク質を添加した 1.5 \times SuperScript Enzyme Mix 1 μ L を添加した後、RT 反応を、25°C で 5 分間、50°C で 30 分、55°C で 25 分、60°C で 5 分、および 70°C で 10 分。次いで、5/3 \times TaqMan Pre-Amp Master Mix と 5/3 倍の特異的標的増幅 (STA) プライマーミックスの混合物 9 μ L と cDNA を混合し、遺伝子特異的な前増幅 (95°C で 10 分間の後、96°C で 5 秒間、60°C で 4 分間を 20 サイクル) を行なった。10 \times STA プライマー混合物を、DNA 懸濁液緩衝液中の検査した遺伝子について順方向および逆方向のプライマー (500 nM) をすべて混合することによって調製した。続いて、1 \times エクソヌクレアーゼ I 反応緩衝液中の 4 U / μ L エクソヌクレアーゼ I 6 μ L と前増幅した cDNA を混合し、37°C で 30 分間および 80°C で 15 分間インキュベートした。次いで、Exonuclease-I 処理した cDNA を DNA 懸濁液緩衝液で 10 倍に希釈し、SsoFast EvaGreen Supermix qPCR マスターミックスと混合し、BioMark リアルタイム PCR システムで 48.48 ダイナミックアレイを行なった。

4) 結果

大腸がん幹細胞の *in vitro* 培養系の確立

がん幹細胞が、がんの造腫瘍性や治療抵抗性の根源であると考えられており、がん幹細胞を標的とした治療法の開発が期待されているが、そのためにはまずがん幹細胞の生物学的特質を理解する事が重要である。がん幹細胞の特有の性質の一つとして、スフェロイド（球状体）形成能が知られている。そこで、当研究グループでは、無血清培地中で、ヒト大腸がん検体より大腸がん幹細胞の継代培養を目的としたスフェロイド培養法を確立した（図1）。実際、スフェロイド細胞の分化能、特異的表面マーカーの発現、免疫不全マウスにおける造腫瘍能等の細胞生物学的解析により、スフェロイド細胞ががん幹細胞としての特質を有する細胞を含む事を明らかにした。また、スフェロイド細胞を免疫不全マウスに移植する事により、原発がんと同様の病理像を呈する腫瘍を形成した（図2）。従って、ヒト大腸がん検体より樹立したスフェロイド細胞により、大腸がん組織の呈する細胞多様性を再現性よく再構成する事が可能となった。

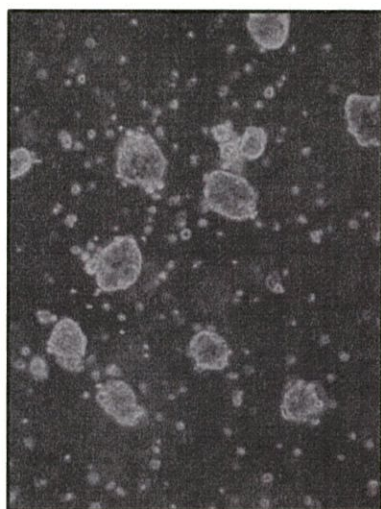


図1. ヒトがん由来
スフェロイド

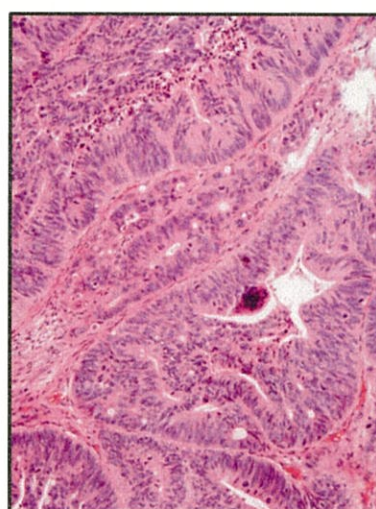


図2. マウス移植腫瘍

大腸がん幹細胞由来マウス移植腫瘍のシングルセル遺伝子発現解析

大腸がん組織における細胞多様性解析として、大腸がん幹細胞由来マウス移植腫瘍を用いて、シングルセル遺伝子発現解析を行った。方法としては、既に樹立した大腸がん幹細胞を免疫不全マウス（NOD/SCID マウス）に皮下移植し、腫瘍形成を行った。移植腫瘍は、コントロールの腫瘍とともに回収後、酵素処理等により、単一細胞に分離した。単一細胞に分離された腫瘍組織中の各腫瘍細胞は、フローサイトメトリー（FACS Aria）により、96 well plateに回収した。その後、回収された各細胞において、幹細胞特異的及び分化特異的発現を示す遺伝子群（40~50 遺伝子）の定量 PCR（Biomark HD）を行った。数理的解析によるクラスタリングを行った所、未分化スフェロイド細胞及び分化細胞は、それぞれ特有の遺伝子発現パターンを示す事が主成分解析によ

り明らかとなった。

抗がん剤抵抗性大腸がん幹細胞におけるシングルセル遺伝子発現解析

抗がん剤抵抗性細胞の、シングルセル遺伝子発現解析を行った。方法としては、既に樹立した大腸がん幹細胞を免疫不全マウスに皮下移植し、腫瘍形成を行ったのち、Irinotecan (CPT) の腹腔内投与による担がんマウスの抗がん剤治療を行った。顕著な縮小が認められた移植腫瘍は、コントロールの腫瘍とともに回収後、酵素処理等により、単一細胞に分離した。単一細胞に分離された腫瘍組織は、シングルセル遺伝子発現解析を行った。その結果、大腸がん幹細胞群が CPT 投与後に増加することが明らかとなった。

5) 考察

がん組織中に存在するがん幹細胞が治療抵抗性を有するため、がんの再発等に深く寄与すると考えられている。近年、不均一な集団中にごく少数存在する細胞群の特性を解析する手法として、細胞集団を個々の細胞に分離し、単一細胞レベルで多遺伝子発現解析を行う試みが、盛んになりつつある。本研究においてヒト大腸がん手術検体より樹立した大腸がん幹細胞を免疫不全マウスの皮下に移植し、ヒト大腸がんを再構成したところ原発がんと同様の病理像を呈する腫瘍を形成することを確認した。作製したマウス皮下腫瘍組織より、フローサイトメトリーを用いて単一がん細胞を回収後、分取した単一がん細胞を用いて、大腸幹細胞及び分化細胞に特徴的な約 50 種類の遺伝子の定量 PCR を行った。その結果、大腸がん上皮組織はがん幹細胞、分化がん細胞の発現特性を有する細胞の多様性が明らかとなった。

抗がん剤治療抵抗性細胞の同定を目的として、担がんマウスに対して、大腸がんの標準的治療薬であるイリノテカン投与前後の移植腫瘍から腫瘍細胞を単離し、シングルセル遺伝子発現解析を行った。その結果、腫瘍構成細胞は、遺伝子発現プロファイルにより幾つかの細胞群に分離されたが、その中でも大腸がん幹細胞群がイリノテカン投与後に増加している事が明らかとなり、これらの細胞群が治療抵抗性を担っている事が明らかとなった。次に、治療抵抗性細胞ががん幹細胞性を有し、がんの再発に寄与するかを検証したところ、治療抵抗性細胞の造腫瘍性が確認され、再形成された腫瘍は病理組織学的に初発腫瘍と区別できなかった事より、治療抵抗性細胞はがん幹細胞性を有し、根絶すべき治療標的である事が明らかとなった。今後我々は、大多数の腫瘍形成がん細胞を死滅させるイリノテカンと治療抵抗性細胞を標的とする阻害剤の併用療法が劇的な抗腫瘍効果を示すと考え検証を進めている。

(2) シニア・リサーチフェロー期間中の研究成果を、今後の研究にどのように役立てたいと考えているか

本リサーチフェロー期間を通じて、シングルセル解析の重要性を学んでいる。本実験法によりがん細胞を構成する数百～数千個の細胞を単離、cDNA 合成を行った後、qPCR を用いた解析により各細胞の発現プロファイルを決定した。今後は、droplet technology 技術や次世代シーケンサー解析を加え、これらの情報の統合解析によるがん細胞の全体像を俯瞰したい。これらの解析を様々な腫瘍組織で行い、組織多様性の理解、及びがん難治性克服に向けた治療法開発の礎につなげたい。

References:

Macosko EZ, Basu A, Satija R, Nemesh J, Shekhar K, Goldman M, Tirosh I, Bialas AR, Kamitaki N, Marters teck EM, Trombetta JJ, Weitz DA, Sanes JR, Shalek AK, Regev A, McCarroll SA. Highly Parallel Genome-wide Expression Profiling of Individual Cells Using Nanoliter Droplets. *Cell*. 2015.

Ohata H, Ishiguro T, Aihara Y, Sato A, Sakai H, Sekine S, Taniguchi H, Akasu T, Fujita S, Nakagama H, Okamoto K. Induction of the stem-like cell regulator CD44 by Rho kinase inhibition contributes to the maintenance of colon cancer-initiating cells. *Cancer Res*. 2012.

Shiokawa D, Sato A, Ohata H, Mutoh M, Sekine S, Kato M, Shibata T, Nakagama H, Okamoto K. The Induction of Selected Wnt Target Genes by Tcf1 Mediates Generation of Tumorigenic Colon Stem Cells. *Cell Rep*. 2017.