

令和3年度シニア・リサーチフェロー  
**研究成果報告書**

令和4年4月27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：森裕太郎

研究課題：難治性卵巣明細胞腺がんの組織多様性の解析を通じた治療抵抗性細胞の同定及び革新的治療戦略の構築  
(テーマ) がんの本態解明に関する研究

研究期間：自 令和 3年 4月 1日

至 令和 4年 3月 31日

研究指導者：岡本 康司

公益財団法人 がん研究振興財団

## I 要旨

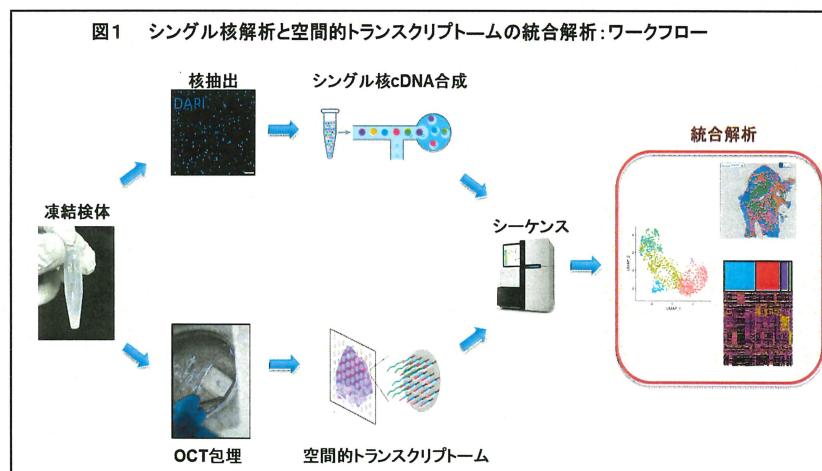
がん組織はがん細胞と様々な非がん細胞により構成される複雑な組織であるが、がん細胞とCAF (cancer-associated fibroblasts) やマクロファージ等の非がん細胞が形成する共生空間は、治療抵抗性と密接な関係があると考えられる。卵巣がんのうち、卵巣明細胞腺がんは抗がん剤抵抗性を示す症例が多く、予後が悪い点が臨床上の大きな問題となっている。

本研究課題「難治性卵巣明細胞腺がんの組織多様性の解析を通じた治療抵抗性細胞の同定及び革新的治療戦略の構築」では卵巣明細胞腺がんの治療抵抗性ニッチの本態を明らかにするため、予後情報が判明した症例の凍結組織を対象として、シングル核解析と空間的トランスクリプトームの統合解析を行った。卵巣癌の標準治療抗がん剤（カルボプラチナ+タキゾール）に抵抗性症例と感受性症例に分けてシングル核解析を行い比較した所、抵抗性症例で有意に増加するがん細胞群が認められた。これらの細胞群の腫瘍内局在を空間的トランスクリプトームとの統合解析で調べたところ、がん細胞とCAFの混在領域に局在する事が明らかとなり、治療抵抗性ニッチを形成すると考えられた。抵抗性ニッチに局在するがん細胞においては、各種インテグリンやHypoxiaに関わる遺伝子の発現上昇が認められ、これらのニッチ因子の上昇は予後増悪と相關した。これらの結果より、難治性の卵巣明細胞腺がん組織においてがん細胞とCAFの相互作用によって化学療法抵抗性ニッチが形成されていることが明らかとなり、その相互作用を阻害することで治療抵抗性が解除される可能性が見出された。

## II 序

卵巣明細胞腺がんは抗がん剤抵抗性を示す症例が多く、予後が悪い点が臨床上の大きな問題となっている。卵巣明細胞腺がんの予後の改善を目指す上で、治療抵抗性の機序を明らかにし、新規治療戦略を開発することは産婦人科にとって急務である。がんの治療抵抗性の背景に、がん組織の多様性及び難治性を構成する細胞ネットワークが存在する事が示唆されているが、このがん組織多様性を理解するための方法論として、シングルセル解析法が主流となりつつある。しかし、従来のシングルセル解析では新鮮ながん組織検体が必要であり、予後情報と結びつけるためには前方視的な解析を行う必要があった。そこで、凍結がん組織のシングル核 RNA シーケンス解析という独自の実験系を確立した。この手法を用いる事で後方視的ながん手術検体のシングルレベルでの解析が可能となる。すなわち、治療抵抗性と感受性が明確に分かる症例を選択して解析し比較することで、治療抵抗性に関わる組織多様性や細胞群を同定し、卵巣明細胞腺がんの治療抵抗性の機序について解明できると考えた。

そこで、本研究課題「難治性卵巣明細胞腺がんの組織多様性の解析を通じた治療抵抗性細胞の同定及び革新的治療戦略の構築」では10症例の卵巣明細胞腺がん症例の凍結組織に対してシングル核



RNA シーケンス解析 を施行した。また卵巣明細胞腺がん患者における抗癌剤の感受性症例と抵抗性症例の比較を行った。また抵抗性細胞の組織上での局在を明らかにする目的で、卵巣明細胞細胞腺がん症例の凍結組織に対して空間的トランスクリプトーム解析を行い、シングル核 RNA シーケンスのデータとの統合解析を行った。

### III 実験方法

#### 凍結組織検体のシングル核解析

卵巣明細胞腺癌の凍結組織検体は、新潟大学医歯学総合病院（中央区、新潟県）および国立がん研究センター中央病院（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されたものを使用した。3–5mm 程度の凍結組織検体からホモジナイザーを用いて核抽出を行い、10x Genomics の Chromium システムを用いて単一核の cDNA を合成しライブラリーを作製した。シーケンスはイルミナの HiSeq2500 を用いて行った。

#### 凍結組織検体の空間的トランスクリプトーム解析

10x Genomics の Visium による空間的トランスクリプトーム解析を行った。凍結組織検体を OCT に再包埋して薄切後、Visium 遺伝子発現スライドに載せ、HE 染色を行いイメージングした後、空間的バーコード付加とライブラリー構築を行った。シーケンスはイルミナの HiSeq2500 を用いて行った。

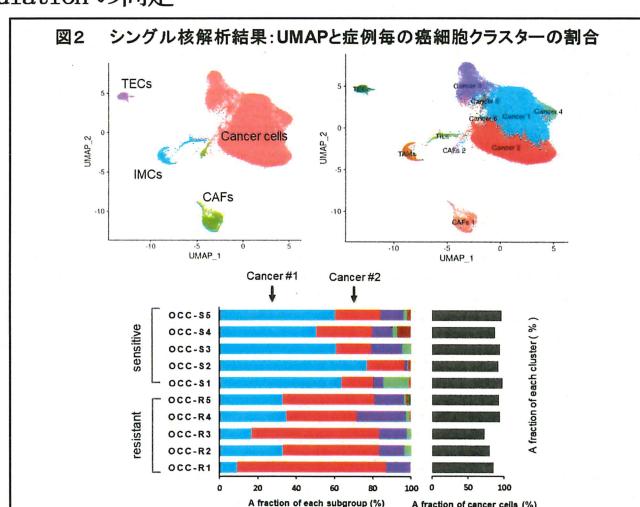
#### データ解析

シーケンスによって得られた fastq データを用いて cellranger および spaceranger によるアライメント・マッピングを行った。その後、統計解析言語 R によるシングルセル発現解析および空間的発現解析を行った。クラスタリング解析、主成分分析、発現遺伝子解析には R パッケージの Seurat (<https://satijalab.org/seurat/index.html>) を使用して解析を行った。

## IV 結果

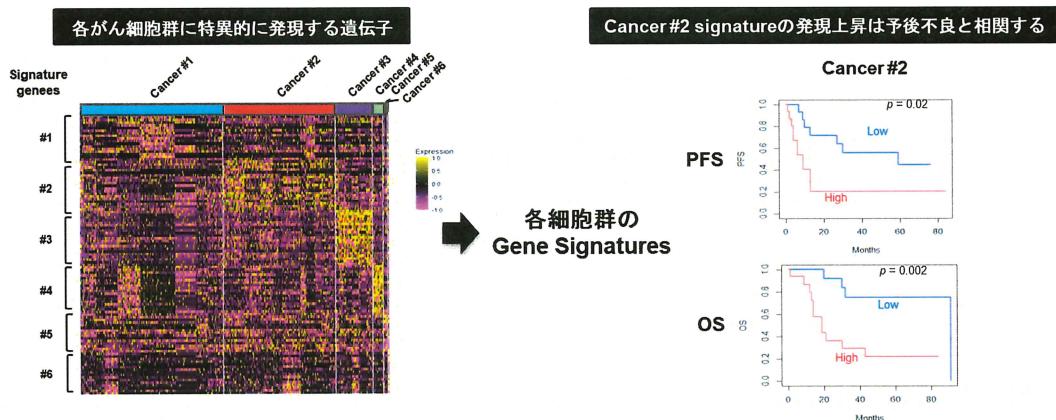
#### 治療抵抗性がん組織で増加する sub population の同定

治療抵抗性 5 症例および治療感受性 5 症例の計 10 症例についてのシングル核解析データを UMAP に展開したところ、図 2 のように細胞の種類ごとにクラスタリングされた。さらにがん細胞のクラスターを 6 つクラスターとして解析し、その存在割合を症例毎に比較したところ、治療抵抗性症例の組織において Cancer#2 のクラスターの割合が有意に多くなっていることが分かった。



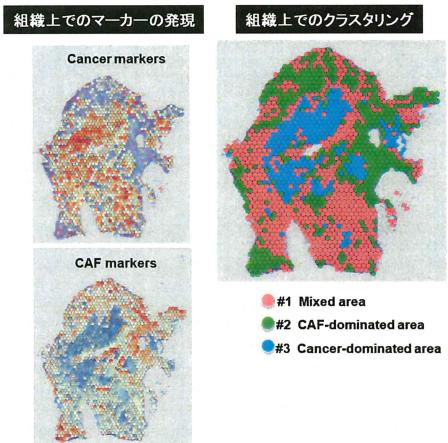
### 治療抵抗性がん細胞群のマーカーは予後不良と相関する

Cancer#2 のクラスターの増加が臨床的予後と関連があるかどうかを確認するため、シングル核解析の各癌細胞のクラスターに特徴的に発現する遺伝子群を遺伝子シグネチャーとして使用して予後解析を行った。Cancer#2 の遺伝子シグネチャーの発現が高い症例で、PFS・OS ともに短いことが分かった。また Cancer#2 の遺伝子シグネチャーでは各種インテグリンや Hypoxia に関わる遺伝子の発現上昇が認められた。



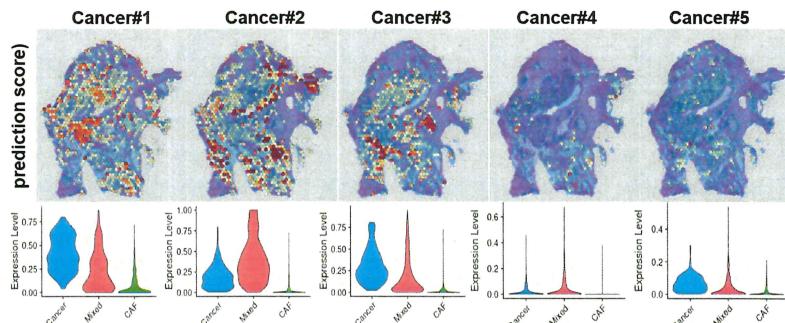
### 組織切片上における各細胞マーカーの発現とクラスタリング

卵巣明細胞腺癌の治療抵抗性症例の凍結組織を用いて Visium による空間的トランск립トーム解析を行った。組織上での癌細胞・CAF のマーカーの発現を確認したところ、HE 染色像で確認できる細胞分布と一致していた。空間的トランスクレットーム解析のデータから組織上でのクラスタリングを行ったところ、癌細胞メインの領域(Cancer-dominant area)、CAF メインの領域(CAF-dominated area)、癌細胞と CAF が混在している領域(Mixed area)の 3 つの領域に分けられた。



### がん細胞クラスターの組織切片上での分布

次にシングル核解析での各がん細胞クラスターが組織上でどのように分布しているかを確認するため、シングル核解析のデータと空間的トランスクレットームのデータを統合して解析した。興味深いことに、治療抵抗性癌細胞のクラスターである Cancer#2 は、空間的トランスクレットームにおける混在領域に分布することが分かった。

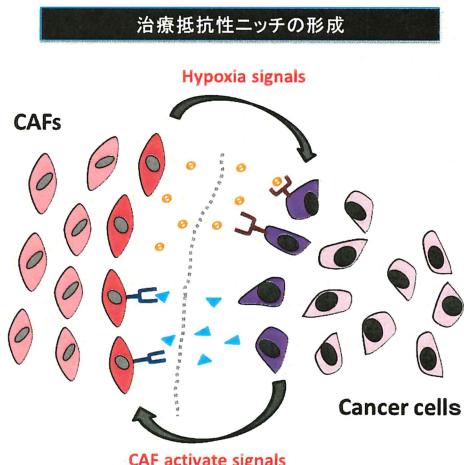


## V 考察

本研究では、まず予後が清明した卵巣明細胞腺癌凍結組織のシングル核解析を行った。その結果、治療抵抗性癌細胞クラスターが同定し、そのクラスターの遺伝子発現プロファイルの取得に成功した。さらに、その遺伝子シグネチャーが予後不良と相關していることが分かった。また空間的トランск립トームとの統合解析によって治療抵抗性癌細胞クラスターの組織上での分布について把握することができた。治療抵抗性癌細胞は組織上の癌細胞とCAFの混在部に存在することから、両者の相互作用によって治療抵抗性ニッチを形成していることが示唆された。

近年、がん細胞は不均一な集団であり、がん細胞全体のうち一部の細胞が治療抵抗性を持つ事が明らかとなっている。また、がん組織はがん細胞と様々な非がん細胞により構成される複雑な組織であるが、がん細胞とCAFが形成するニッチは、治療抵抗性と密接な関係があることも明らかとなっている。しかし、卵巣明細胞腺癌の治療抵抗性の機序についてはまだに報告がなく、卵巣明細胞腺癌症例に対して従来の抗癌剤治療を行っているのが現状である。

本研究の結果から、卵巣明細胞腺癌組織における治療抵抗性細胞の特徴を把握した。またその治療抵抗性は癌細胞とCAFとの相互作用によって形成されていることが示唆された。よってその相互作用を抑制することが出来れば治療抵抗性を解除できると考えられる。



## VI シニア・リサーチフェローペリオード中の研究成果を、今後の研究にどのように役立てたいと考えているか

今後の研究としては、がん細胞とCAFとの相互作用について解析を進め、それぞれお互いのどの因子が作用して治療抵抗性を形成しているのかを明らかにしたい。またCAFの治療抵抗性における役割を明らかにするため、がんオルガノイドとCAFのin vitro共培養系を樹立し、治療抵抗性の機能的検証を進めたい。最終的には前臨床試験に向けた阻害剤探索や、これを背景とした新たな薬剤開発等への展開に繋げていきたいと考えている。