

2019年度シニア・リサーチフェロー  
**研究成果報告書**

令和2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：神田 裕介 

研究課題：難治性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 平成 31年 4月 1日  
至 令和 2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

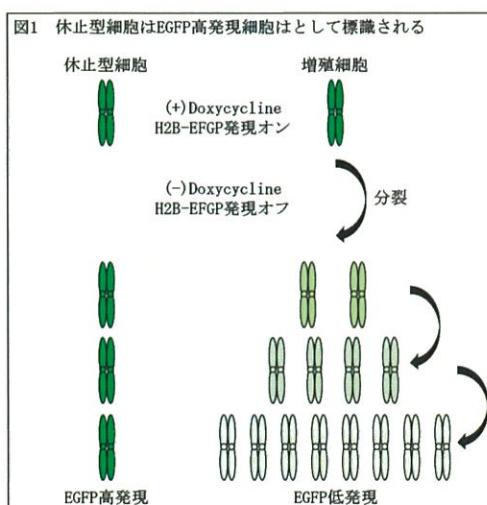
抗がん剤治療による根治が困難である要因として、増殖活性の乏しい休止型がん幹細胞が治療後も残存し、再増殖するためである事が予想されている。しかし、大腸がんを含む固形がんの休止型がん幹細胞の存在は殆ど明らかになっていない。これまでの誘導型 H2B-EGFP 導入細胞を用いた解析で、ヒト大腸がんオルガノイド由来の PDX 腫瘍を構成するがん細胞は高増殖性の細胞と増殖速度の極めて遅い休止型の細胞に分かれる事を明らかにした。興味深い事に、抗がん剤に抵抗性を示す細胞を解析したところ、休止型細胞が 5-FU, Irinotecan 等の抗がん剤に対して抵抗性を示す事が観察され、これらの細胞が治療抵抗性の根源である事が示唆された。

本研究課題「難治性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」においては、休止型がん幹細胞の存在の確認とその詳細な発現プロファイルを取得する事を目的とした。ヒト大腸がんオルガノイド由来の移植腫瘍から休止型細胞を単離し、単一細胞レベルの qPCR を行った。得られたデータの統計解析によって、休止型細胞は幹細胞マーカーを発現する事および特徴的に発現する複数の遺伝子を見出した。以上により、大腸がんにおいて休止型がん幹細胞が存在し、抗がん剤抵抗性を改善させる治療法開発の新たな観点として、休止型がん幹細胞が標的となる事が示唆された。

## II 序

がん組織を構成するがん細胞は均一ではなく、多様な性状を持つ細胞群から成る不均一な細胞集団である。特に、抗がん剤治療に対して抵抗性を示す幹細胞性を有したがん細胞集団が、再発を引き起こす事が予想されている。白血病では、がん幹細胞の中でも細胞増殖の極めて遅い休止型がん幹細胞が治療抵抗性の本態とされているが、大腸がんを含む大半の固形がんでの報告は未だにない。

そこで、所属研究室で大腸がん臨床検体から樹立され、がん幹細胞と分化したがん細胞を安定的に維持できるオルガノイド培養系を用いて、休止型がん幹細胞の存在と治療抵抗性との関連を解明する研究に着手した。休止型細胞の同定法として H2B-EGFP 融合タンパクに着目した。H2B-EGFP を一過的に発現させた細胞は、分裂毎に EGFP が希釈され蛍光強度が低下するため、分裂回数の少ない細胞を EGFP ラベル保持細胞として標識できる。そこで、Doxycycline により発現誘導可能な H2B-EGFP を導入し、一過性に発現させた H2B-EGFP を長期間維持する細胞を同定する事で、休止型細胞と増殖細胞を区別する実験系を考案、構築した（図 1）。この大腸がんオルガノイドのマウス移植腫瘍を作成し、Irinotecan の腹腔内投与を行った。その結果、休止型細胞は非投与時の腫瘍と比較し Irinotecan 投与後に残存した腫瘍で高い割合を占める事を見出した。さらに、休止型細胞は、がん幹細胞マーカーの LGR5 等を発現し、がん幹細胞の特性を持つ事、Irinotecan 添加後の再増殖活性が高い事が *in vitro* 系において観察され、治療抵抗性の根源である事が示唆された。



本研究課題「難治性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、休止型がん細胞の詳細な発現特性を明らかにする目的で、抗がん剤処理後に残存する休止型細胞を単離し、qPCR (Biomark HD, Fluidigm) による単一細胞レベルでの遺伝子発現プロファイルの解析を行った。

### III 実験方法

#### 細胞培養

ヒト大腸がんオルガノイドは、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、所属研究室の既報 (Cell Rep 19: 981–994, 2017.) に従い培養した。

#### 動物実験

H2B-EGFP 導入ヒト大腸がんオルガノイドを、Accumax を用いて単一細胞に解離させた後、50% マトリゲルを含む 50  $\mu$ l の培地に懸濁し、免疫不全 NOG マウスの皮下に移植した。移植後 7 日目まで 2 mg/ml の Doxycycline 溶液の飲水投与を行った。移植 7 日目から 18 日目まで 1 週間に 2 回の頻度で Irinotecan (100 mg/kg) を腹腔内投与した。移植 21 日目にマウスを犠牲死させ、移植腫瘍を回収した。

#### セルソーティング

腫瘍組織に対してコラゲナーゼ処理と Accumax 処理を行い、得られた細胞を 0.5% BSA 含有 PBS で懸濁した。PE 標識抗マウス CD31 抗体、PE 標識マウス CD45 抗体、APC 標識抗ヒト EpCAM 抗体を添加した。氷上で 30 分間静置後、遠心し、上清を除いた。サンプルは、0.5% BSA 含有 PBS で懸濁後、死細胞判別のための DAPI を添加し、FACS Aria IIIu Cell Sorter を用いて、ヒトがん細胞 (DAPI 陰性、CD31 陰性、CD45 陰性、EpCAM 陽性) を EGFP 高発現群と低発現群に分けて 96-well plate にソーティングした。

#### シングルセル qPCR

単一細胞を、1.2 U/ $\mu$ l SUPERase-In<sup>TM</sup> RNase Inhibitor および 0.5% NP40 を含む 1.2X Vilo Reaction Mix で溶解した。1.2  $\mu$ g/ml の T4 Gene Protein と 1.5X SuperScript Enzyme Mix を含む溶液を添加した後、逆転写反応 (25°C で 5 分、50°C で 30 分、55°C で 25 分、60°C で 5 分、70°C で 10 分) を行った。反応終了後、Taqman PreAmp Master Mix と STA primer mix を cDNA と混合し、遺伝子特異的な前増幅 (95°C で 10 分間反応後、95°C で 5 秒、60°C で 4 分を 20 サイクル) を行った。次に、4U/ $\mu$ l の Exonuclease I と前増幅させた cDNA を混合し、37°C で 30 分間、次いで 85°C で 15 分反応させた。その後、10 倍希釈した Exonuclease I 反応後の cDNA に Sso Fast EvaGreen Supermix With Low ROX と DNA Binding Dye Sample Loading Reagent を加え、混合した (Sample Pre-Mix)。また、Assay Loading Reagent と 5  $\mu$ M の順方向と逆方向のプライマーを混合した (Assay Mix)。Sample Pre-Mix と Assay Mix を 96.96 Dynamic Array IFC 内で混合し、BioMark リアルタイム PCR システムでシングルセル qPCR を行った。

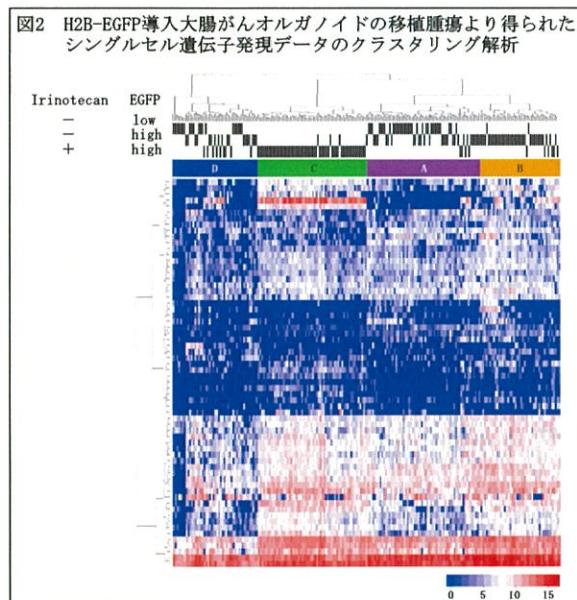
#### シングルセル発現解析

得られた単一細胞毎の発現データから統計解析言語 R によるシングルセル発現解析を行った。クラスタリング解析と主成分分析にはそれぞれ R パッケージの heatmap3 および prcomp を使用した。

## IV 結果

### クラスタリングによる H2B-EGFP 導入ヒト大腸がんオルガノイドの移植腫瘍に由来するがん細胞のシングルセル発現解析

抗がん剤投与後も残存する休止型がん細胞の詳細な発現プロファイルを解析するために、シングルセル解析を実施した。H2B-EGFP を導入したヒト大腸がんオルガノイドを免疫不全マウス皮下に移植し、H2B-EGFP を誘導させる事を目的として Doxycycline の飲水投与を 7 日間行った。その後、Irinotecan 投与群に関しては、移植 7 日目から 18 日目まで週 2 回の頻度で腹腔内投与を行った。移植 21 日目においてマウスを犠牲死させ、腫瘍を回収後、酵素処理によって単一細胞に分離した。ヒトがん細胞のみを回収するために抗体標識を行った後、セルソーター (FACS Aria IIIu Cell Sorter) を用いて H2B-EGFP 高発現細胞と低発現細胞をそれぞれ回収した。なお、Irinotecan 処理後に残存する H2B-EGFP 低発現細胞に関しては、生存状態が不良である事が事前の解析より明らかであったため、回収しなかった。各細胞を溶解し、得られた RNA を cDNA に逆転写し、前增幅させた。その後、幹細胞と増殖細胞に特異的な遺伝子および薬剤標的となる遺伝子を主とした遺伝子セットを用いてシングルセル qPCR (Biomark HD, Fluidigm) を行った。非投与マウスの腫瘍由来の H2B-EGFP 高発現細胞および低発現細胞、Irinotecan 投与マウスの腫瘍由来の H2B-EGFP 高発現細胞のシングルセル qPCR データを統合してクラスタリング解析を実施した。その結果、がん細胞はグループ A からグループ D の 4 種類に分類された（図 2）。グループ A は非投与群の H2B-EGFP 低発現細胞群、グループ B は非投与群の H2B-EGFP 高発現細胞群、グループ C は Irinotecan 投与群の H2B-EGFP 高発現細胞群に分類される傾向を示した。グループ D は不明の細胞集団であった。



### 主成分分析による H2B-EGFP 導入ヒト大腸がんオルガノイドの移植腫瘍に由来するがん細胞のシングルセル発現解析

細胞の類似性や差異を可視化するために、シングルセル遺伝子発現データを主成分分析により 2 次元に次元圧縮した。その結果、グループ C はグループ A、グループ B、グループ D とは比較的離れた細胞集団となった。また、このグループ C は LGR5 等の幹細胞マーカーを発現している事を見出した。さらに、グループ C に特徴的な遺伝子群を同定した。

## V 考察

本研究では、ヒト大腸がんオルガノイド由来マウス腫瘍を構成する休止型および増殖性のがん細胞の単一細胞レベルでの遺伝子発現データを解析した。その結果、グループ C が Irinotecan に対して抵抗性を示す休止型がん幹細胞の集団である事が明らかとなった。さらに、この休止

型がん幹細胞の詳細な発現プロファイルの取得に成功した。

近年、がん細胞は不均一な集団であり、がん細胞全体の僅か数%程度の細胞が治療抵抗性を持つ事が明らかとなっている。この難治性を規定する少数の細胞群は、細胞周期を休止した幹細胞性を持つ事が慢性骨髓性白血病で報告された。チロシンキナーゼ阻害剤のイマチニブ投与により、末梢血から白血病細胞が消失し見かけ上寛解するが、休止型がん幹細胞までは殺傷できず、半数以上の患者が投薬中止と共に再発する事が知られている (*Lancet Oncol* 11: 1029-1035, 2010)。一方、休止型がん幹細胞と抗がん剤抵抗性との関係性が報告されている固形がんは一部(基底細胞がん等)に限られており、大腸がんを含む殆どの固形がんでは、休止型がん幹細胞の存在は不明であった。今回、ヒト大腸がんオルガノイドに誘導型H2B-EGFPを導入する事で休止型がん細胞を検出する系とシングルセル発現解析を組み合わせる事によって初めて、休止型がん細胞が幹細胞性を持つ事を明らかにした。この休止型がん幹細胞はIrinotecanに対して抵抗性を示し、再発の要因となるため、治療標的となり得る。

休止型がん幹細胞を標的とした薬剤開発には、特徴的な遺伝子群を同定する事が前提として必要不可欠である。しかし、これまでに大腸の休止型がん幹細胞の発現プロファイルは明らかにされていなかった。本研究で行ったシングルセル発現解析により、休止型がん幹細胞に特徴的な遺伝子を複数見出した。特に、これらの遺伝子群の中には細胞表面に発現する分子や細胞内シグナル分子が含まれており、休止型がん幹細胞分取のための表面マーカーのみならず抗体医薬や低分子化合物の標的になる事が期待される。

## VI シニア・リサーチフェローピーク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

今後は、シングルセル解析により見出した休止型がん幹細胞に特徴的な遺伝子群に着目し、Irinotecanと休止型がん幹細胞を標的とした治療法の併用によって抗がん剤抵抗性の改善効果について検証を進める予定である。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。

がん細胞全体を対象とするqPCR等の解析では、少数の細胞群の発現情報が多数の細胞の平均値の中に埋没してしまう点、個々の細胞を対象にできる免疫染色やフローサイトメトリーの場合では、数種類の分子の解析に留まってしまう点を勘案すると、本研究の骨子であるシングルセルqPCR法は、細胞1個につき約100種類の遺伝子の発現データを100細胞近く取得できるため、希少な細胞群を詳細に解析する上で非常に有効である。所属研究室では肺がんや卵巣がんの三次元培養系を有しており、他臓器がんにおける休止型がん幹細胞の存在の有無についても解析を進めていきたい。