

「リレー・フォー・ライフ プロジェクト未来」 2013 年度研究助成金
成果報告書

対象研究：分野 I（基礎研究）

研究期間：平成 25 年 1 1 月～現在

研究題目：単一細胞レベルでの遺伝子発現解析による、難治がんの抗がん剤耐性メカニズムの解明

研究代表者：国立がん研究センター研究所・分野長 岡本康司

1. 研究成果の概要

ヒトがん幹細胞のマウス移植腫瘍モデルを用いた抗がん剤抵抗性細胞の解析を最終目的として、その準備にむけた幾つかの検討を行った。とりわけ大腸がんの irinotecan 治療を検討の主眼におき、(1) 大腸がん移植腫瘍における irinotecan 投与条件の最適化、(2) 各種実験モデルを用いたシングルセル遺伝子発現解析、及び(3) irinotecan 抵抗性の大腸がん細胞のシングルセル遺伝子解析の予備実験を行った。これらの実験結果の詳細は、下記の研究成果に示した。これらの成果により、irinotecan 等の抗がん剤に抵抗性を示す大腸がん細胞の特性解析の実験準備が整った。今後の実験により、抗がん剤抵抗性と関連する遺伝子群が明らかになり、さらに shRNA、CRISPR/CAS9 等の遺伝子抑制法により、抗がん剤抵抗性を担う遺伝子の同定が可能になると期待される。

2. 研究開始当初の背景

一般に難治がんの抗がん剤において問題となるのは、がん組織の一部を占める治療抵抗性細胞の存在である。これらの細胞の持つ治療抵抗性は細胞の stochastic な選択の結果ではなく、がん組織の多様性の結果であって、一部の細胞のみが持つ特性が抗がん剤存在時に生存に有利に働いた結果であると考えられる。従って、治療抵抗性細胞の持つ個々の細胞特性を明らかにする事は、難治がん治療において決定的に重要である。このような考え方のもとに、がん組織のごく一部を担う細胞群の特性をシングルセル発現解析で明らかにする事が本研究のねらいである。

これまでの申請者の研究において、ヒトがん幹細胞の in vitro 培養系の樹立

を行ってきたが、樹立したがん幹細胞を免疫不全マウスに移植する事によりオリジナルの原発腫瘍と病理学的に極めて類似した腫瘍を再構成する事が出来る。従って、このマウス xenograft の実験系において抗がん剤治療を行い、抵抗性細胞のシングルセル発現解析を行う事により、抗がん剤抵抗性の本態を明らかにしようと考えた。

3. 研究の方法及び成果

上記の目的を達成するため、本年度は研究成果の概要に挙げた3方向の実験を行った。

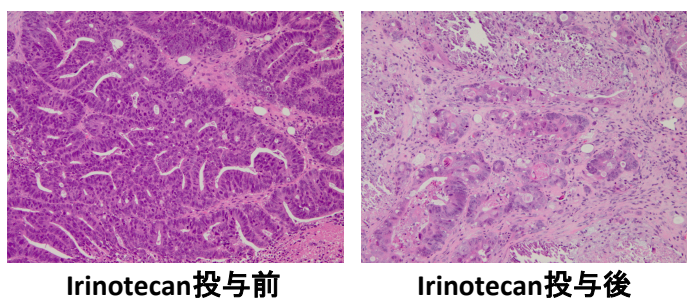
(A) 大腸がん移植腫瘍における、irinotecan 投与条件の最適化 大腸がん幹細胞を matrigel 存在化で皮下移植し、腫瘍形成を行った後、様々な投与量、投与間隔、投与期間で、irinotecan を腹腔内投与し、マウスの致死量、及び腫瘍縮小効果を検討した。その結果、週二回 100mg/kg 投与、2週間の投与（計4回投与）が最適である事が明らかになった（図1）。

また、抗がん剤投与後の細胞採取までの最適期間を決定するため、PCNA 及び Caspase-3 の免疫染色で time course の検討を行なった所、投与終了後3日後にアポトーシス細胞死に伴って、治療抵抗性の残存細胞が最小になり、その後抵抗性細胞の増殖の上昇が観察された（図2）。従って、最終投与後3日目の細胞を回収しシングルセル解析を行う事とした。

(B) 各種実験モデルを用

いたシングルセル遺伝子発現解析 治療抵抗性がん細胞のシングルセル発現解

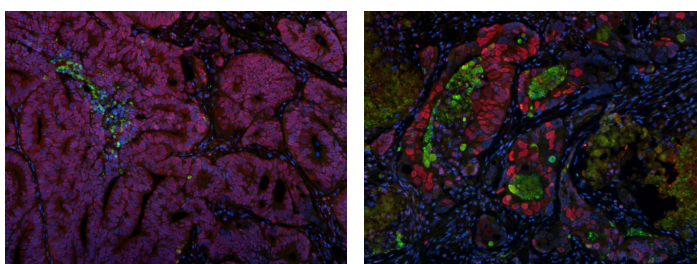
図1 がん幹細胞の移植腫瘍を用いた抗がん剤治療



Irinotecan投与前

Irinotecan投与後

図2 抗がん剤治療前後の移植腫瘍における免疫染色



Irinotecan投与前

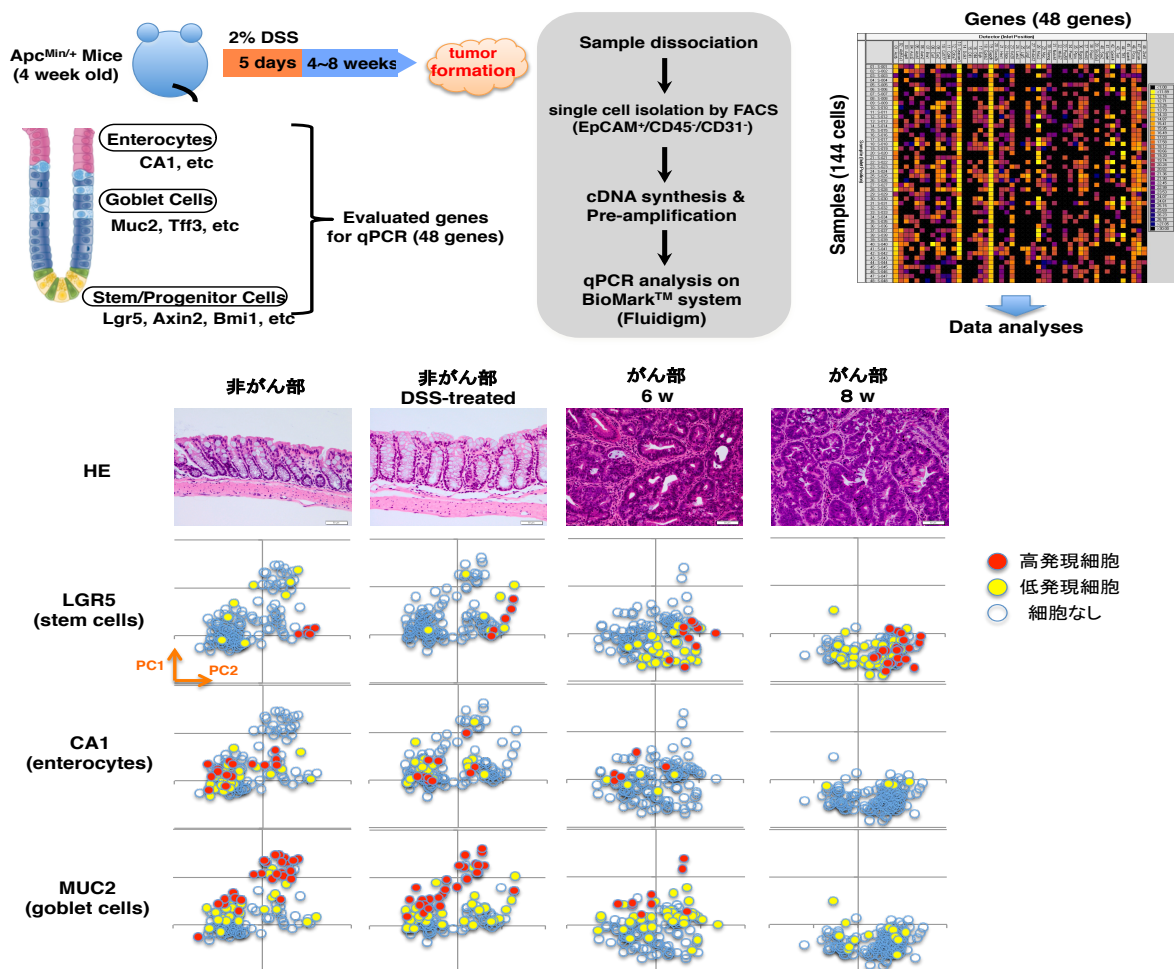
Irinotecan投与後

赤: PCNA
 緑: 活性型Caspase-3
 青: Hoechst33342

析を行なう前に、マウス大腸炎症発がんモデル、及び卵巣がん幹細胞の in vitro 分化系の2つの実験モデルにおいてシングルセル発現解析を行い、我々の実験手法が妥当なものであるか確認を行なった。

第一に、マウス大腸炎症発がんモデルにおいては、Apc^{Min/+} マウスに DSS 経口投与を行なう事により、大腸発がんを起こす実験系を用い、がん部及び非がん部より、腸管上皮をフローサイトメトリー (FacsAria II, Becton Dickinson) を用いて単離した。単離した腸管細胞を用いて、シングルセル遺伝子発現解析 (Fluidigm、BioMark HD) により、各種細胞マーカー (幹細胞及び分化細胞、48 遺伝子) 等の発現解析を行なった (図3、上部)。えられた結果の数理的解析を行い、主成分解析により、がん部及び非がん部を構成する細胞 (幹細胞、分化細胞) を2次元マップ上に分離した (図3、下部)。発がんに伴い、幹細胞群において、Wnt 経路のターゲット遺伝子の一部が選択的に上昇する事を認めた (未発表)。このように、発がん過程における幹細胞の動態を明らかにした。

図3 マウス炎症発がんモデルにおけるシングルセル発現解析



次に、ヒト卵巣がん由来のがん幹細胞を用いたシングルセル発現解析を行なった。これまでの研究により、卵巣がん幹細胞も、大腸がん幹細胞と同様にスフェロイド（球状体）として、*in vitro* で維持、増殖できる事を確認している（未発表データ）。スフェロイド状態のがん幹細胞を用い、血清添加で分化誘導を起こす事により、がん幹細胞の未分化状態から分化状態への遷移過程での細胞特性の変化をシングルセル発現解析で検討した。実験手法としては、上の実験と同様に、フローサイトメトリーで細胞を単離後、Fluidigm のシステムでシングルセル解析を行なった。主成分解析の結果、分化細胞と未分化細胞は分離可能である事、さらに分化細胞は未分化状態に戻る事ができ分化可塑性を有している事が明らかとなった（図4）。

これら (A)、(B) の実験により、申請者らの確立したシングルセル発現解析は、個々の細胞レベルでの発現特性の解析に有力手段となりうる事を明らかにした。

(C) irinotecan 抵抗性の大腸がん細胞のシングルセル遺伝子解析の予備実験 (A)、(B)の結果を受けて、*xenograft* 由来の *irinotecan* 抵抗性大腸がん細胞を対象にした、シングルセル発現解析を開始した。(A)においては、*irinotecan* 投与の至適条件を決定したが、まずより *mild* な抗がん剤投与条件で、治療抵抗性細胞のシングルセル発現解析を行なった所、主成分解析の2次元マップ上で、治療抵抗性細胞

図4 卵巣がんスフェロイド細胞の分化、及び脱分化

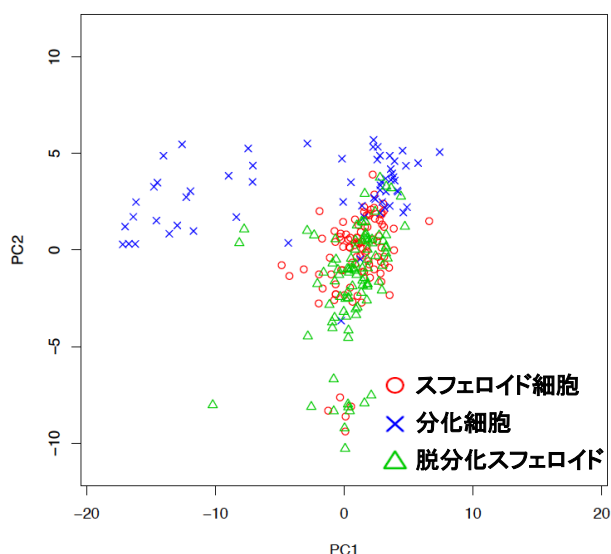
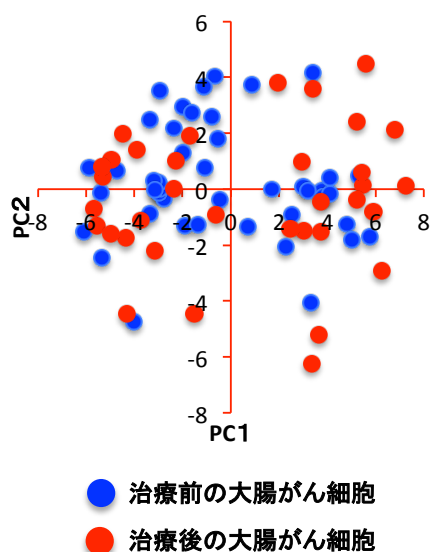


図5 大腸がんマウス移植腫瘍のirinotecan治療前後の主成分解析(予備実験)



の分布の母集団がん細胞からの移行が観察された (図5)。今後は、至適条件で irinotecan 投与を行い、治療抵抗性細胞の特性を明らかにする予定である。

4. 今後の研究の方向性

今年度の研究結果を受けて、来年度は irinotecan 抵抗性大腸がん細胞の遺伝子発現の特性を明らかにし、抗がん剤抵抗性を担うと予想される遺伝子群の同定につとめる。同様の解析を他の抗がん剤や、卵巣がんについても行い、治療抵抗性に関わる遺伝子群の共通性、特異性について明らかにする。さらに、これらの遺伝子群の機能的な重要性を明らかにするため、*in vitro* 培養がん幹細胞に対し相当する遺伝子の shRNA 発現レンチウイルス、又は CRISPR/CAS9(double nickase 法)発現プラスミドの electroporation (NEON technology、Life technologies) の導入により遺伝子抑制を行う。治療抵抗性遺伝子を抑制したがん幹細胞の移植腫瘍の抗がん剤抵抗性が減弱するかどうか検証する事により、抗がん剤抵抗性を担う因子の同定を行なう。これらの研究により、抗がん剤と治療抵抗性遺伝子の抑制による synthetic lethal 法による革新的治療法構築にむけた検討を行なう。

5. 主な発表論文等

雑誌論文 (計3件)

1. Sakai H, Sato A, Aihara Y, Ikarashi Y, Midorikawa Y, Kracht M, Nakagama H, Okamoto K. MKK7 mediates miR-493-dependent suppression of liver metastasis of colon cancer cells. **Cancer Sci.** doi: 10.1111/cas.12380 (2014)
2. Mikawa T, Maruyama T, Okamoto K, Nakagama H, ME Leonart L, Tsusaka T, Hori K, Murakami I, Izumi T, Takaori-Kondo A, Yokode M, Peters G, Beach D, and Kondoh H. Senescence-inducing stress promotes proteolysis of glycolytic enzyme phosphoglycerate mutase via ubiquitin ligase Mdm2. **J. Cell Biol.** 204, 729-745 (2014)
3. Horii T, Morita S, Kimura M, Kobayashi R, Tamura D, Takahashi R, Kimura H, Suetake I, Ohata H, Okamoto K, Tajima S, Ochiya T, Abe Y, Hatada I. Genome engineering of mammalian haploid embryonic stem cells using the Cas9/RNA system. **Peer J.** 1:e230. doi: 10.7717/peerj.230. (2013)

学会発表（計2件）

1. 第36回日本分子生物学会年会 ワークショップ招待講演「単一細胞レベルの遺伝子発現解析による大腸発がんメカニズムの解析」岡本康司（神戸、平成25年12月3日）
2. 文部科学省科研費新学術領域研究 がん研究分野の特性等を踏まえた支援活動 個体レベルでのがん研究支援活動ワークショップ 「Single-cell qPCR法を用いたMinマウスDSS誘導大腸腫瘍に於ける細胞多様性の解析」塩川大介、土橋翔子、落合雅子、中釜斉、岡本康司（大津市琵琶湖ホテル、平成26年2月17日）

6. 研究組織

国立がん研究センター研究所（発がんシステム研究分野）

岡本 康司（分野長、研究の総括）

塩川 大介（ユニット長、シングルセル発現解析）

大畑 広和（研究員、ヒト大腸がん幹細胞の培養及び解析）

横道 憲幸（がん研究特別研究員、ヒト卵巣がん幹細胞の培養及び解析）

土橋 祥子（研究補助員、がん幹細胞の移植腫瘍形成及び抗がん剤治療）

国立がん研究センター研究所（がんゲノミクス研究分野）

加藤 護（ユニット長、シングルセルデータの数理的解析）

国立がん研究センター中央病院

関根 茂樹（医長、ヒト大腸がん標本の病理学的解析）

谷口 浩和（医員、ヒト大腸がん標本の病理学的解析）

吉田 正行（医員、ヒト卵巣がん標本の病理学的解析）

金光 幸秀（科長、ヒト大腸がん標本の採取及び臨床的解析）

加藤 友康（医長、ヒト卵巣がん標本の採取及び臨床的解析）