

平 28 年 度 委 託 研 究 開 発 成 果 報 告 書

I. 基本情報

事業名： (日本語) 革新的がん医療実用化研究事業
(英語) Practical Research for Innovative Cancer Control

研究開発課題名： (日本語) 大腸がんの単一細胞レベルでの発現解析を通じた治療抵抗性獲得機構の解明
(英語) Elucidation of mechanism of therapeutic resistance by single-cell analysis in colon cancer

研究開発担当者 (日本語) 研究所がん分化制御解析分野 研究員 大畑 広和
所属 役職 氏名： (英語) Div. of Cancer Differentiation, Staff scientist, Hirokazu Ohata

実施期間： 平成 26 年 7 月 11 日 ～ 平成 29 年 3 月 31 日

分担研究 (日本語) 単一細胞発現データの数理解析
開発課題名： (英語) Mathematical analysis of single-cell expression data

研究開発分担者 (日本語) 研究所がんゲノミクス研究分野 ユニット長 加藤 護
所属 役職 氏名： (英語) Div. of Cancer Genomics, Laboratory Head, Mamoru Kato

II. 成果の概要（総括研究報告）

和文

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。我々は、無血清培地を用いたスフェロイド培養法により、ヒト大腸がん手術検体由来がん幹細胞の樹立に成功した。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、大腸がん移植腫瘍における単一細胞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ものである。

第一に、大腸がん組織の多様性を明らかにするため、3種類の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約 50 種類の遺伝子の定量 PCR を行った。各細胞の遺伝子発現データを標準化し、主成分分析、ヒートマップ分析、クラスタリング分析等を適用し、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 5~6 の細胞群に分けられ、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。また、大腸がん幹細胞には、腸幹細胞マーカーである LGR5 陽性がん幹細胞と比較的増殖の遅い SOX2 陽性がん幹細胞の、少なくとも 2 種類の大腸がん幹細胞が存在する事が示唆された。

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、単一細胞遺伝子発現解析を行った。その結果、LGR5 陽性 OLFM4 陰性の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。以上の結果より、我々は現在、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死滅させることが期待される分子標的薬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。

英文

We have established the in vitro spheroid culture of colon cancer stem cells (CSCs) from human surgical specimens. Xenograft tumors derived from these spheroid cells in immunocompromised mice were histologically indistinguishable from the original primary colon tumors.

Recently, gene expression analyses at the single-cell level have become a potent method to investigate heterogeneous cell populations, including cancer cells. In order to understand the heterogeneity of colon tumors, we analyzed the xenograft tumors derived from colon CSCs. Colon epithelial tumor cells were single cell-sorted and the expression profiles of genes representative for stem and differentiated cells were determined by qPCR. By processing the resulting data by hierarchical clustering and

principal component analysis (PCA), we dissected the tumor epithelium into several functionally different populations. These results revealed that colon CSCs were classified as at least two groups, Lgr5-positive and Sox2-positive CSCs.

We next aimed to identify the therapeutic resistant cells in anti-cancer drug, irinotecan, treated xenograft tumors by single-cell qPCR analysis. Interestingly, we found that a specific population of Lgr5-positive stem cells (Lgr5-positive / Olfm4-negative) increased after the treatment of irinotecan. These results suggest that targeting therapy of Lgr5-positive / Olfm4-negative cancer cells in combination with conventional anti-cancer drug have a potential to eradicate refractory colon cancer.

III. 成果の外部への発表

(1) 学会誌・雑誌等における論文一覧 (国内誌 3件、国際誌 2件)

1. Totoki Y, Tatsuno K, Covington KR, Ueda H, Creighton CJ, Kato M, Tsuji S, Donehower LA, Slagle BL, Nakamura H, Yamamoto S, Shinbrot E, Hama N, Lehmkuhl M, Hosoda F, Arai Y, Walker K, Dahdouli M, Gotoh K, Nagae G, Gingras MC, Muzny DM, Ojima H, Shimada K, Midorikawa Y, Goss JA, Cotton R, Hayashi A, Shibahara J, Ishikawa S, Guiteau J, Tanaka M, Urushidate T, Ohashi S, Okada N, Doddapaneni H, Wang M, Zhu Y, Dinh H, Okusaka T, Kokudo N, Kosuge T, Takayama T, Fukayama M, Gibbs RA, Wheeler DA, Aburatani H, Shibata T.
Trans-ancestry mutational landscape of hepatocellular carcinoma genomes.
Nature Genetics, 2014, vol. 46 (12), p. 1267-p. 1273.
2. 加藤 護, 「一細胞ゲノム解析」
医学の歩み, 2014, vol. 249, p. 1088-p. 1092.
3. 加藤 護 (翻訳), 「発がんドライバー変異の同定」 by David Tamborero, Abel Gonzalez-Perez and Nuria Lopez-Bigas, 実験医学, 2014, vol. 32, p. 213-p. 219.
4. 加藤 護, 「一細胞シーケンスのデータ解析」
医学のあゆみ, 2016, vol. 258, p. 317-p. 323.
5. Daisuke Shiokawa, Ai Sato, Hirokazu Ohata, Michihiro Mutoh, Shigeki Sekine, Mamoru Kato, Tatsuhiro Shibata, Hitoshi Nakagama, Koji Okamoto
The induction of selected Wnt target genes by Tcf1 mediates generation of tumorigenic colon stem cells.
Cell Reports, 2017, vol. 19 (5), p. 981-p. 994.

(2) 学会・シンポジウム等における口頭・ポスター発表

1. Dynamic regulation of colon tumor-derived stem cells demonstrated by single-cell qPCR. (ポスター) Daisuke Shiokawa, Hirokazu Ohata, Koji Okamoto, 第13回幹細胞シンポジウム (東京), 平成27年5月, 国内
2. Bioinformatics for clinical sequencing and single-cell sequencing. (口頭) 加藤 護, Mathematics in Cancer Genome Analysis, Mathematical Cooperation Program 2015 (東京), 平成27年9月, 国内
3. Tumor heterogeneity and single-cell sequencing. (口頭), 加藤 護, 第74回日本癌学会 (名古屋), 平成27年10月, 国内
4. Heterogeneity of Lgr5-positive colon tumor stem cells demonstrated by single-cell qPCR. (口頭), 塩川 大介, 大畑 広和, 岡本 康司, 第74回日本癌学会 (名古屋), 平成27年10月, 国内
5. 大腸がんの単一細胞レベルでの発現解析を通じた治療抵抗性獲得機構の解明 (ポスター), 大畑広和, 第1回AMEDがん若手研究者ワークショップ (東京), 平成27年11月, 国内
6. Heterogeneity of colon tumor stem cells and alteration of Wnt target gene expressions demonstrated by single-cell qPCR. (口頭), 塩川 大介, 大畑 広和, 岡本 康司, 第75回日本癌学会 (横浜), 平成28年10月, 国内
7. Single-cell sequencing reveals genomic and transcriptomic dynamics during tumor development in a mouse model. (口頭), 加藤 護, 第75回日本癌学会 (横浜), 平成28年10月, 国内

(3) 「国民との科学・技術対話社会」に対する取り組み

該当なし

(4) 特許出願

該当なし