

研究報告書
令和4年度：A課題

2024年4月25日

公益財団法人 がん研究振興財団

理事長 堀田 知光 殿

研究施設 慶應義塾大学医学部泌尿器科学教室

住所 東京都新宿区信濃町35

研究者氏名 田中 伸之

(研究課題)

時空間的シングルセル遺伝子発現解析による尿路上皮がん間質不均一性の解明

令和5年3月16日付助成金交付のあった標記A課題について研究が終了致しましたので
ご報告いたします。

【研究の目的】

進行・再燃過程の腫瘍組織では、がん特有の脈管・層構造や異質な細胞ニッチがマイクロな「間質の不均一性」を生み出し、この複雑化したがん間質では免疫細胞も多様性に富む。泌尿器がん薬物療法は近年劇的に進歩し、免疫チェックポイント阻害薬（ICB）が中心となった。この内、尿路上皮がんは免疫治療のパイオニアで、得られる腫瘍免疫の知見は、他の固形がん研究への波及効果が大きい。特に尿路上皮がんは、肺癌・メラノーマ・食道癌といった免疫感受性腫瘍と生物学的特徴で共通点が多く、発がん過程に発がん性物質・炎症が深く関与する。

この問題の解決に我々は、ICB 治療前後の時間的・空間的マルチサンプリングによる尿路上皮癌ゲノムシーケンスデータに、多様性解析で最新の空間的トランスクリプトーム解析を統合することで、ICB 治療下の「がんクローン進化」と「間質の不均一性」の関りを *in situ* (本来存在する場所) で明らかにする必要があると考えた。このため、本研究はまず、バルク腫瘍塊のマルチサンプリングなシーケンス解析に最新の空間トランスクリプトーム解析を結びつけることで、ICB 治療後に生き残る尿路上皮がんサブクローンとそのクローン進化の過程を明らかにしようと試みた。

【研究計画と結果】

同一腫瘍内の多様なサブクローンの混在を証明し、ICB 治療下のがんクローン進化を再現するには時間的・空間的マルチサンプリング解析は重要な手法である。我々は豊富な臨床サンプルから、免疫療法に対する感受性と抵抗性の両方を有する転移性尿路上皮がんの剖検例に着目した。

まず我々は、①治療前の検体に加え、8つの異なるバルク腫瘍塊と4つの異なる空間トランスクリプトミクスサンプルから、58対の全エクソン配列決定と RNAseq の多領域解析を行った。その結果、同一個体内の臓器間不均一性に加えて、同一臓器内の腫瘍内不均一性が明らかになり、がん悪性化に関与する標的サブクローンの存在が明らかになった(図1)。

次に、最新の Visium 遺伝子発現解析では、スライド上の 6.5mm 四方のキャプチャーエリア内に微小なスポットが等間隔で並んでいて、スポットごとに数千遺伝子について発現レベルを評価することができる。我々は、②空間的遺伝子発現解析とゲノムシーケンスデータを統合するために、Visium 遺伝子発現解析上で標的サブクローンを同定するアルゴリズムを、Lasso 法を派生させて構築することに成功し、標的サブクローンの周囲には抑制性的の特異的な免疫微小環境が存在すること、すなわち、クローン自身が生息ニッチの間質フェノタイプ形成に関与するという世界初の「微小環境の不均一性」維持機構を尿路上皮がんで見出した(図2)。

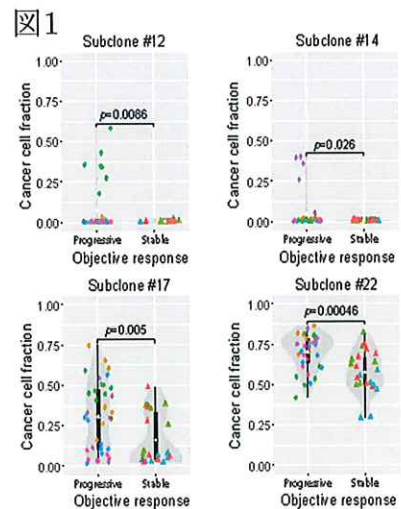
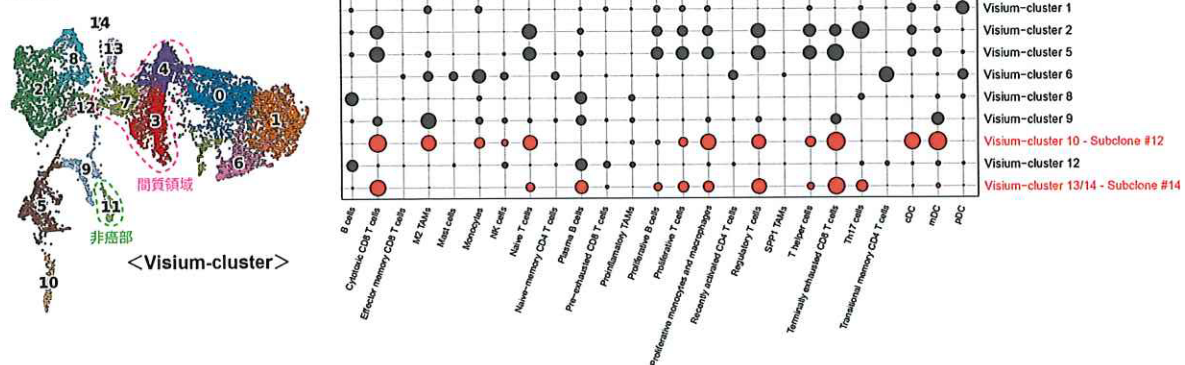


図2



【今後の予定】

今後は以下の経過を予定している。

① Syngeneic・orthotopic マウスを用いた ICB 耐性の機序の解明:ゲノム・空間的トランスクリプトーム解析でスクリーニングされた標的サブクローン候補遺伝子は、尿路上皮がん同種(syngeneic)・正所性(orthotopic)担癌マウスモデルで、ICB 後の免疫微小環境での役割を検討する。尿路上皮がんでは、C57BL/6 マウスとマウス膀胱癌細胞株 MB49 を用いることで、膀胱内正所性モデルが作成可能である。

② 次世代がんイメージングによる立体的・超高解像度ながん免疫ゲノミクスの可視化:元々通常のシーケンスでは、サンプル調製過程の細胞分離は不可避であり、組織空間における細胞の位置情報(不均一な細胞分布等)が失われる。我々は、次世代がんイメージングを実装することで、標的サブクローンが生息ニッチで形成する腫瘍免疫微小環境を、立体的・超高解像度に可視化することで、ICB 耐性に関与する癌幹細胞の維持機構や腫瘍内の細胞ヒエラルキー解明に繋げる。ライトシート顕微鏡は、透明化された腫瘍を単一細胞レベルの空間情報が保持されたまま可視化できる。また、不均一な癌幹細胞ニッチや腫瘍免疫浸潤の詳細は、超高解像度な膨張顕微鏡法を利用して、ミトコンドリア・小胞体・ゴルジ体等の細胞内小器官レベルでも達成を目指す。ICB 投与後のマウスから回収される腫瘍組織に対しても、これら次世代がんイメージングを適用する予定である。

【謝辞】

本研究の遂行にあたり、多大な援助を賜りました公益財団法人がん研究振興財団に深く感謝申し上げます。また、大家基嗣教授をはじめとした、慶應義塾大学医学部泌尿器科学教室の先生方や、バイオインフォマティクス解析でご協力頂きました東京大学大学院理学系研究科生物科学専攻医科学数理研究室の先生方にも深く感謝申し上げます。