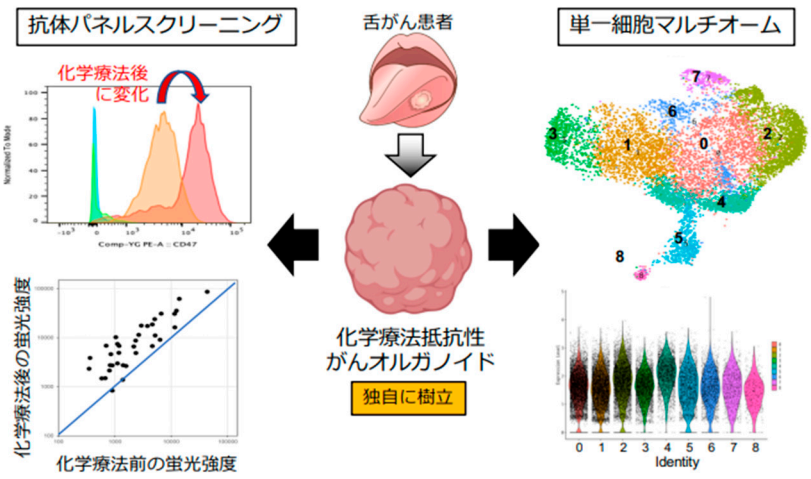
24　ヒト癌オルガノイドを用いた化学療法耐性癌幹細胞同定	佐藤　卓

【目的】化学療法剤を用いた癌の臨床治療では、化学療法剤耐性のわずかな癌細胞が微小残存病変として生き残り、これらが原因となって癌が再発することが大きな課題である。したがって、この残存癌細胞が生じる分子基盤を解明し、それらを駆逐する手法を確立することができれば、多くの癌患者の救命に繋がる。化学療法剤の致死的ストレス下において癌細胞が生き延びる現象は「パーシスタンス」と呼ばれる。同現象は、化学療法剤に晒された癌細胞のうちのごく一部が偶発的、かつ一過的に抗癌剤耐性の性質を獲得する現象と理解されているが、現時点では、化学療法剤によって誘導されるパーシスタンスの分子基盤は不明である。最近、腫瘍内、さらに患者間の癌の不均一性を *in vitro* に再現しうる新たな非臨床ヒト癌モデルとして、「患者由来癌オルガノイド」の有用性が多くの癌種で示されている。我々もこれまでに、独自に確立した手法を用い、舌癌の患者腫瘍組織に由来する癌オルガノイド株を樹立している(論文投稿中)。興味深いことに、樹立した患者ごとの癌オルガノイド株は、化学療法剤に対する感受性が極めて多様であり、化学療法剤存在下で生き延びる癌細胞を、特に多く含むオルガノイド株を複数得ている。本研究では、パーシスタンス誘導の分子基盤解明を目指し、化学療法剤抵抗性のヒト扁平上皮癌オルガノイドモデルの解析から、パーシスタンスを担う細胞集団を同定する。

【方法】本研究では、まず多様なヒト細胞表面抗原に対する抗体パネルを用い、化学療法剤抵抗性癌オルガノイド株に発現する細胞表面抗原、およびそれらの中で、化学療法剤処理後に生存するパーシスターに特徴的に濃縮される細胞表面抗原を探索した。一方、1 細胞マルチオーム解析を実施し、癌オルガノイド中の化学療法抵抗性細胞集団の同定を試みた。

【結果】すでに取得済みの癌オルガノイドの遺伝子発現データを参考に、実際にオルガノイドで発現されている可能性の高い細胞表面抗原を抗体パネルの中から選択した。それらの抗体を用い、化学療法剤耐性癌オルガノイドを構成する癌細胞のフローサイトメーター解析を行った。その結果、同オルガノイドの癌細胞に定常的に発現される分子および、それらの中で、化学療法剤処理後の細胞で発現亢進する複数の分子を見出した。しかしながら、いずれの抗体の染色でもオルガノイドを構成する癌細胞はほぼ均一に染色されており、特定の細胞集団を分画化できるような染色パターンは得られなかった。一方、単一細胞マルチオーム解析を実施し、パーシスタンスに関わることが予想される癌幹細胞集団の同定を試みたが、既知の癌幹細胞マーカー遺伝子を発現する特定の細胞クラスターを見いだすことはできなかった。現在、タイムラプスイメージングも合わせて用いることで、パーシスターに特徴的な「細胞表面分子の経時的発現変化」から同細胞を特定可能か検討中である。

患者由来癌オルガノイドを用いる化学療法剤パーシスター癌幹細胞の同定



24. ヒト癌オルガノイドを用いた化学療法耐性癌幹細胞同定

佐藤　卓

東京医科歯科大学 難治疾患研究所 生体防御学分野

Key words：癌オルガノイド，化学療法剤，パーシスタンス

緒　言

化学療法剤を用いた癌の臨床治療では、化学療法剤耐性のわずかな癌細胞が微小残存病変として生き残り、これらが原因となって癌が再発することが大きな課題である。したがって、この残存癌細胞が生じる分子基盤を解明し、それらを駆逐する手法を確立することができれば、多くの癌患者の救命に繋がる。化学療法剤の致死的ストレス下において癌細胞が生き延びる現象は「パーシスタンス」と呼ばれる。同現象は、化学療法剤に晒された癌細胞のうちのごく一部が偶発的、かつ一過的に抗癌剤耐性の性質を獲得する現象と理解されているが［1］、現時点では、化学療法剤によって誘導されるパーシスタンスの分子基盤は不明である。最近、腫瘍内、さらに患者間の癌の不均一性を *in vitro* に再現しうる新たな非臨床ヒト癌モデルとして、「患者由来癌オルガノイド」の有用性が多くの癌種で示されている［2］。我々もこれまでに、独自に確立した手法を用い、舌癌患者腫瘍組織に由来するヒト扁平上皮癌オルガノイド株を樹立している（論文投稿中）。興味深いことに、樹立した患者ごとの癌オルガノイド株は、臨床治療に使用される化学療法剤に対する感受性が極めて多様であり、化学療法剤存在下で生き延びる癌細胞を、特に多く含むオルガノイド株を複数得ている。本研究では、パーシスタンス誘導の分子基盤解明を目指し、化学療法剤抵抗性のヒト扁平上皮癌オルガノイドモデルの解析から、パーシスタンス誘導を担う細胞集団を同定する。

方　法

1. 化学療法剤耐性舌癌の細胞表面抗原プロファイル検出

化学療法耐性舌癌細胞の細胞表面抗原を網羅的に検出するため、まずすでに取得済みの化学療法剤耐性舌癌オルガノイドの網羅的遺伝子発現解析（バルク CAGE-seq）データを活用し、タンパク発現の想定される細胞表面分子を抽出した。解析したオルガノイド株の平均 cpm 値が 30 以上をカットオフ値とした場合、59 遺伝子が候補分子として選定された。BioLegend 社のヒト抗体パネル（LEGENDScreen™ Human PE Kit, # 700011）には、これらの候補分子のうち 36 種類の細胞表面抗原に対する特異的抗体が含まれていたことから、これらを用いて癌オルガノイド細胞を抗体染色後、フローサイトメーター解析を行った。フローサイトメーター解析には、FACS AriaⅢ（BD Biosciences）を用いた。

2. 舌癌オルガノイドのシングルセルマルチオーム解析

化学療法剤耐性オルガノイド株、および化学療法剤感受性オルガノイド株、各 2 種類ずつについて、シングルセルマルチオーム解析（10x Genomics 社）を実施した。データの二次解析は Seurat ソフトウエアを用い、東京理科大学生命医科学研究所の波江野洋准教授との共同研究により実施した。4 種類のオルガノイド株の snRNA-seq データを統合した後、UMAP クラスタリングを行った。その上で、頭頸部癌組織のシングルセル遺伝子発現解析の結果から、癌幹細胞様集団において強く発現されることが知られている遺伝子（*CD44*、*EPCAM*、*CD276*、*CD47*、*SOX2*）［3］や、薬剤排出に関わることが知られている ABC トランスポーター遺伝子［4］）について、

各クラスターでの発現レベルを解析した。一方、これら遺伝子マーカーを指標にした癌幹細胞同定とは別に、細胞分化の方向性を推定しうる RNA velocity 解析を実施し、オルガノイド形成の起点細胞分画（つまり癌幹細胞分画）を予測した。

結果および考察

1. 化学療法剤耐性舌癌の細胞表面抗原プロファイル検出

遺伝子発現データにおいて抗体検出可能と想定された抗原に絞って、抗体パネルを用いたフローサイトメーター解析を行った結果、それらのほとんどは抗体染色陽性となった。しかしながら、いずれの抗体染色においても、各細胞表面分子の発現は、細胞間で概ね均一（シングルピークの蛍光プロファイル）であったことから、仮に、これらの抗体を組み合わせた染色を行っても、オルガノイド細胞の多様性を見いだすことは難しいと考えられた。一方、興味深いことに、同様の染色を化学療法剤処理後のオルガノイドでも実施した結果、多くの細胞表面抗原の発現量（mean fluorescence intensity : MFI）が化学療法剤処理前に比べ増加していることがわかった（図 1）。現在、タイムラプスイメージングも合わせて用いることで、パーシスターに特徴的な「細胞表面分子の経時的発現変化」から同細胞を特定可能か検討中である。

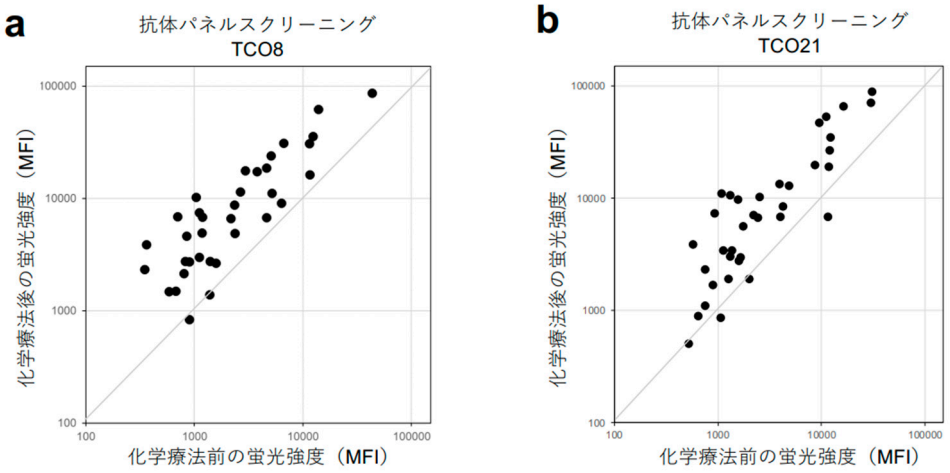


図 1. 抗体パネルを用いたフローサイトメーター解析の結果

化学療法剤に晒す前後の 2 例の化学療法剤耐性舌癌オルガノイド株について、36 種類の細胞表面抗原に対する抗体によるフローサイトメーター解析を実施した。横軸は化学療法剤処理前の癌オルガノイド細胞の蛍光強度（MFI）、縦軸は化学療法剤処理後の蛍光強度（MFI）を示す。各シンボルは一つの抗体での染色結果。

a）TCO8 株。

b）TCO21 株。

2. 舌癌オルガノイドのシングルセルマルチオーム解析

取得した snRNA-seq データをもとに UMAP 解析を行った結果、遺伝子発現プロファイルの類似性から、各細胞は 8 種類のクラスターに分類されることがわかった（図 2a）。頭頸部癌組織の癌幹細胞様集団で強く発現されることが知られている遺伝子（*CD44*、*EPCAM*、*CD276*、*CD47*、*SOX2* ）［3］について、各クラスターでの発現レベルを解析、比較したが、これらの遺伝子を特徴的に発現する細胞集団は見出されなかった（図 2b）。同様に、薬剤の細胞外への排泄を介して、抗癌剤耐性に関わることが知られている多様な ABC トラスポーター遺伝子（*ABCA1*、*ABCC1*、*ABCC3*、*ABCC4*、*ABCG2*）［4］についても、顕著に発現が亢進しているクラスターは

なかった（図 2c）。以上の結果は、既知の癌幹細胞マーカー遺伝子や薬剤耐性に関わる遺伝子のみでは、オルガノイドの中に含まれる、癌幹細胞の特定が難しいことを示唆する。そこで、マーカー遺伝子発現によらず、癌幹細胞、つまりオルガノイド形成の“起点”となる細胞集団を特定するため RNA velocity 解析を実施した。その結果、図 2d に示すクラスター4、5、8 がオルガノイド形成の起点となることが推定された。しかしながら、当該細胞分画は、化学療法剤耐性オルガノイド株、および感受性オルガノイド株のいずれにおいても同程度存在していたことから（図 2e）、各オルガノイド株の化学療法剤反応性の性質は、癌幹細胞の頻度に依存するというよりもむしろ、患者ごとの癌の持つ性質の違いに大きく影響されることが示唆された。

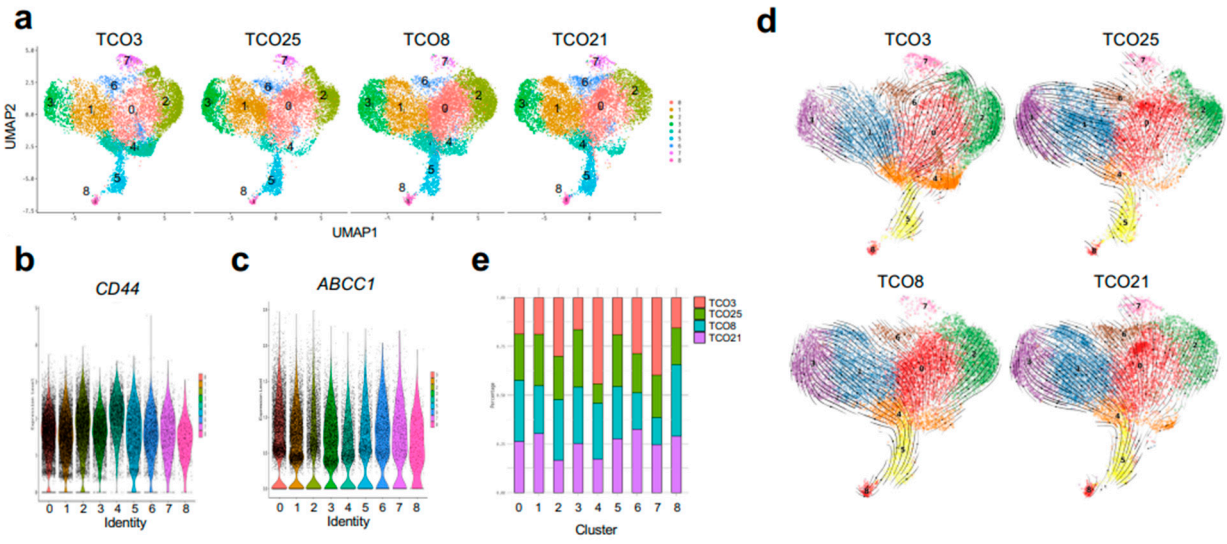


図 2. 舌癌オルガノイドのシングルセルマルチオーム解析

化学療法剤感受性オルガノイド株（TCO3、TCO25）、および耐性オルガノイド株（TCO8、TCO21）のシングルセルマルチオーム解析を実施した。

a）各オルガノイド株の遺伝子発現データを統合して UMAP 解析を行った結果。

b）頭頸部癌の癌幹細胞マーカーにひとつである *CD44* の各クラスターでの発現レベルを示したバイオリンプロット。

c）ABC トランスポーターのひとつである *ABCC1* の各クラスターでの発現レベルを示したバイオリンプロット。

d）RNA velocity 解析結果。

e）各クラスター頻度の比較。

謝　辞

単一細胞マルチオーム解析の二次解析は、東京理科大学生命医科学研究所の波江野洋准教授との共同研究で実施した。

文　献

1) Shen S, Vagner S, Robert C. Persistent Cancer Cells: The Deadly Survivors. Cell. 2020 Nov 12;183(4):860-874. doi: 10.1016/j.cell.2020.10.027. PMID: 33186528.

2) Drost J, Clevers H. Organoids in cancer research. Nat Rev Cancer. 2018 Jul;18(7):407-418. doi: 10.1038/s41568-018-0007-6. PMID: 29692415.

3) Xiao M, Zhang X, Zhang D, Deng S, Zheng A, Du F, Shen J, Yue L, Yi T, Xiao Z, Zhao Y. Complex interaction and heterogeneity among cancer stem cells in head and neck squamous cell carcinoma revealed by single-cell sequencing. Front Immunol. 2022 Nov 14;13:1050951. doi: 10.3389/fimmu.2022.1050951. PMID: 36451812; PMCID: PMC9701714.

4) Ohashi R, Kawahara K, Namimatsu S, Okamura R, Igarashi T, Sugitani I, Naito Z. Expression of MRP1 and ABCG2 is associated with adverse clinical outcomes of papillary thyroid carcinoma with a solid component. Hum Pathol. 2017 Sep;67:11-17. doi: 10.1016/j.humpath.2017.03.012. Epub 2017 Apr 11. PMID: 28411177.