



Title	Spatial and single-cell transcriptomics decipher the cellular environment containing HLA-G+ cancer cells and SPP1+ macrophages in colorectal cancer
Author(s)	大里, 祐樹
Citation	大阪大学, 2023, 博士論文
Version Type	
URL	https://hdl.handle.net/11094/92065
rights	
Note	やむを得ない事由があると学位審査研究科が承認したため、全文に代えてその内容の要約を公開しています。全文のご利用をご希望の場合は、 〈a href="https://www.library.osaka-u.ac.jp/thesis/#closed"〉 大阪大学の博士論文について 〈/a〉 をご参照ください。

The University of Osaka Institutional Knowledge Archive : OUKA

<https://ir.library.osaka-u.ac.jp/>

The University of Osaka

論 文 内 容 の 要 旨
Synopsis of Thesis

氏 名 Name	大里 祐樹
論文題名 Title	Spatial and single-cell transcriptomics decipher the cellular environment containing HLA-G+ cancer cells and SPP1+ macrophages in colorectal cancer (空間的トランスクリプトームとシングルセルトランスクリプトームが明らかにする大腸がんにおけるHLA-G陽性癌細胞とSPP1+マクロファージの相互作用の解明)
論文内容の要旨	
〔目的(Purpose)〕	
<p>大腸癌の治療標的はがん細胞を対象に探索されてきたが、罹患率と致死率は依然として高い。この為、大腸癌に対する新たな治療戦略の開発が求められている。近年1つの組織検体から空間情報を維持しながらトランスクリプトームを解析する手法としてVISIUMが開発され、このデータと単一細胞転写産物データを統合解析すると、腫瘍組織の局所における細胞間相互作用(腫瘍細胞同士もしくは腫瘍細胞と間質細胞)を解析する事が可能となった。本法のデータと単一細胞転写産物データを統合解析する事によって、本研究ではがん細胞のみならず腫瘍微小環境、特に浸潤先進部における細胞間相互作用に関する理解を深めることで真の標的細胞ないしは標的分子を同定する事を目的とした。</p>	
〔方法ならびに成績(Methods/Results)〕	
<p>大腸癌1例/4切片の空間的転写産物(VISIUM)法を実施し、公開された単一細胞転写産物データ(アジア人:23人、合計:65,362細胞)を対象に解析ツール「Seurat」、「cell2location」、「NicheNet」を用いて統合解析を行った。その結果、浸潤先進部における細胞種を特定し、それらの細胞間相互作用を解明した。すなわち全ての上皮細胞は14種のクラスター(細胞集団)/全ての間質細胞は27種類のクラスターに分類され、その内浸潤先進部に集簇している大腸癌細胞集団が2種類存在している事、この癌細胞集団と共に局在する間質細胞(SPP1+マクロファージ)を同定した。浸潤先進部に存在している2種類の大腸癌細胞の内一方の細胞集団は癌幹細胞様(幹細胞マーカー(LGR5、SOX2、MYC、EPCAM等)が高発現、増殖能が高い、幹細胞scoreが高い)の癌細胞集団であり、もう一方の細胞集団は分化した癌細胞集団であった。この内癌幹細胞様の細胞集団はHLA-Gを分泌し、SPP1+マクロファージ(HLA-Gの受容体であるLILRB1、LILRB2高発現)を産生する。又、SPP1+マクロファージはCCL2、MMP9、AREG、ADAM17を分泌する事で大腸癌細胞に増殖能・浸潤能を高める一方で、IL10を分泌する事で免疫細胞に対して免疫寛容を誘導する可能性が示された。又、上記現象が起こっている事を確認する目的にて、VISIUMを施行した検体に対して蛍光多重免疫染色(SPP1、CD68、HLA-G、DAPI)を施行し、腫瘍中心部にはSPP1+マクロファージ、HLA-G陽性癌細胞が殆ど存在していないが、腫瘍浸潤先進部にはSPP1+マクロファージ、HLA-G陽性癌細胞が多く存在している事を確認した。また、今回解析したイベントが大腸癌浸潤先進部において普遍的なイベントである事を示す為、九州大学病院別府病院にて1994年4月から2002年10月までに切除された大腸癌切除検体(20例)の免疫組織化学染色(SPP1、CD68、HLA-G)を施行した。その結果、SPP1+マクロファージが大腸癌中心部と比較して有意に浸潤先進部(特にBudding部)に優位に多く存在している事とHLA-G陽性癌細胞がSPP1+マクロファージと有意に関連を認める事を確認した。</p> <p>続いて、HLA-Gの機能解析を行った。今回の空間的転写産物データと公開された単一細胞転写産物データを統合解析する事によって、HLA-G発現とSPP1+マクロファージに正の相関関係を認め腫瘍免疫寛容・腫瘍の増殖能・浸潤能が高まる可能性が示唆された。マウス大腸癌細胞株(MC38)、マウス(8週齢、雄、C57BL/6J、N=10)を用いたin vivo実験ではHLA-GはSPP1+マクロファージを介した腫瘍増殖能に関連している事/蛍光多重免疫染色(SPP1、CD68、DAPI)を施行し腫瘍免疫寛容に関連している事についても検証した。</p>	
〔総括(Conclusion)〕	
<p>大腸癌の新たな治療標的として、HLA-G、LILRB1、LILRB2、SPP1+マクロファージを同定した。又、これらの分子や細胞は大腸癌において腫瘍細胞の増殖能・浸潤能の亢進/免疫寛容に寄与する事が示唆された。この様に、がん微小環境を対象にした空間的シングルセルレベルの解析は、新たな治療標的探索ツールとしての有用性が期待される。</p>	

論文審査の結果の要旨及び担当者

(申請者氏名) 大里 祐樹			
論文審査担当者	(職)	氏 名	
	主 査	大阪大学教授	土岐 祐一郎 署名
	副 査	大阪大学教授	野々村 祝夫 署名
	副 査	大阪大学教授	高井 英一 署名
<p>論文審査の結果の要旨</p> <p>大腸癌の致死率は依然として高く、新しい治療戦略が求められている。本研究では癌細胞と腫瘍微小環境の細胞間相互作用の理解を深める事で真の標的を同定する。</p> <p>大腸癌の空間的転写産物法を実施し、公開された単一細胞転写産物データを対象に統合解析を行った。その結果、上皮細胞は14種の細胞集団に分類され浸潤先進部に存在する大腸癌細胞集団とこの癌細胞集団と共局在する間質細胞集団(SPP1+ mΦ)を同定した。この癌細胞集団はHLA-Gを分泌し、SPP1+ mΦを分化誘導する一方、SPP1+ mΦは大腸癌細胞に増殖能・浸潤能を高め、免疫寛容を誘導する可能性が示された。又、大腸癌切除検体の免疫組織化学染色によりSPP1+ mΦの浸潤先進部特異的な局在を確認し、HLA-GのKO株を用いたin vivo実験によりSPP1+ mΦを介した腫瘍増殖能・腫瘍免疫寛容も検証した。空間的シングルセルレベルの解析は、大腸癌の新たな治療標的探索ツールとしての有用性が期待される。このような結果を導出する研究をされた為に学位の授与に値すると考えられる。</p>			