



Title	Spatial and single-cell colocalisation analysis reveals MDK-mediated immunosuppressive environment with regulatory T cells in colorectal carcinogenesis
Author(s)	橋本, 雅弘
Citation	大阪大学, 2024, 博士論文
Version Type	
URL	<a href="https://hdl.handle.net/11094/98743">https://hdl.handle.net/11094/98743</a>
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	橋本 雅弘
論文題名 Title	Spatial and single-cell colocalisation analysis reveals MDK-mediated immunosuppressive environment with regulatory T cells in colorectal carcinogenesis (大腸発癌における空間的および単一細胞共局在解析による制御性T細胞とMDKを介した免疫抑制環境の同定)
論文内容の要旨(Abstract of Thesis)	
[目的(Purpose)]	
<p>大腸癌における多段階発癌(adenoma-carcinoma sequence)は腺腫から散発性大腸癌への進展するモデルとして広く知られている。MSI-high大腸癌に対する免疫療法は、本邦でも広く使用されているが、散発性大腸癌に対する治療効果が乏しい。また、正常から前癌(腺腫)、癌へと進行していくにあたって、癌微小環境(Tumor Microenvironment: TME)における細胞間相互作用に関する重要なメディエーターは不明な点が多い。本研究は、早期大腸癌(腺腫内癌)に着目し、散発性大腸癌における癌細胞の進展を助ける細胞とクロストークする細胞を同定し、新たな治療標的細胞および分子を探索、さらに予後を含めた臨床病理学的意義を明らかにすることを目的とした。</p>	
[方法ならびに成績(Methods/Results)]	
<p>大腸癌の多段階発癌に応じた癌微小環境の構築を捉えるために5例の正常組織、腺腫、癌が混在する粘膜内癌および1例の進行大腸癌に対して空間的トランスクリプトーム(ST-seq)と、公共データベースにおける33サンプルの大腸癌のシングルセルRNAシークエンスデータ(scRNA-seq)を用いて、深層学習フレームワーク(DeepCOLOR)を用いた統合解析を行った。scRNA-seqデータを参照細胞集団として、空間データの各スポットをデコンボリューションし、空間ニッチにおける単一細胞間の共局在ネットワークを解読することができる。腫瘍細胞は、癌腺腫境界部において制御性T細胞(Treg)と共局在しており、細胞間相互作用においてMidkine(MDK)が腫瘍細胞からTregへと作用する重要なシグナル分子であることを同定した。一方、共局在するTregは免疫チェックポイント分子である、T cell immunoreceptors with Ig and ITIM domains (TIGIT)を介して腫瘍細胞へと作用しており、Tregによる腫瘍細胞への免疫寛容が示唆された。さらにMDK高発現腫瘍細胞は、SPP1+マクロファージ(M2マクロファージ)や間質細胞に対して免疫抑制分子を介して作用しておりTMEの形成が示唆された。進行癌においては、MDK高発現および腫瘍細胞とTregの共局在は浸潤先進部に認めた。MDKを介した腫瘍増殖とTreg誘導を明らかにするためにin vivoによる検証を行った。マウス大腸癌細胞株MC38を用いて、Mdk過剰発現で増殖能が増加し、フローサイトメトリーにて腫瘍組織においてTregを有意に誘導した。また、Tregと共に局在するMDKの受容体として、Syndecan4(SDC4)を同定した。腺腫内癌および進行癌における切除標本を用いた免疫組織化学染色、免疫蛍光染色を施行し、癌腺腫境界部および癌近傍の腺腫領域におけるMDKの腫瘍細胞および間質の発現を確認し、MDK発現する間質領域にてFOXP3およびSDC4の共発現を認め、共局在解析と同様の結果であることを示した。</p> <p>続いて、MDKとSDC4のリガンド・レセプターの相互作用におけるMDKシグナル伝達経路が、大腸癌におけるTreg誘導することを検証するために、MDKをノックダウンしたヒト大腸癌細胞株(RKO)とSDC4をノックダウンしたヒトTreg様細胞(MT-2)を作成した。RKO細胞のMDKおよびMT-2細胞のSDC4のノックダウンは、MT-2細胞の遊走を有意に減少させた。さらに、MDKノックダウンRKO細胞のコンディショニング培地へのMDKタンパク質の添加は、MT-2の遊走に有意な効果を示した。大腸癌で分泌されるMDKはSDC4を介して相互作用し、Tregの遊走運動を促進し、免疫抑制環境をもたらす可能性が示唆された。</p> <p>最後に大腸癌切除症例コホートデータ(137例)とThe Cancer Genome Atlas Program (TCGA)データ(372例)を用いて、臨床病理学的検討を行った。当コホートデータにおいて、MDK発現は正常組織に比べ癌組織にて有意に高発現であり、T Stage毎でのTN比においてTis/T1の早期癌でTN比は高値を示した。また、MDK癌組織高発現群は予後不良で、MDK癌組織高発現は多変量解析にて独立予後規定因子となった。TCGAデータにおいても同様に、MDK高発現群は予後不良であった。2つのコホートデータにおいてSDC4高発現群は予後不良であり、MDK高発現かつSDC4高発現群はMDK低発現かつSDC4低発現群に対して有意に予後不良であった。</p>	
[総括(Conclusion)]	
<p>本研究では、早期癌組織における空間的かつ単一細胞レベルでの上皮細胞と間質細胞の共局在解析によりMDK-SDC4を介した免疫寛容経路を明らかにした。予後との関連を考慮すると、MDKシグナル伝達が、散発性大腸癌における免疫療法の治療標的となるメディエーターとなる可能性が示唆された。</p>	

## 論文審査の結果の要旨及び担当者

(申請者氏名) 橋本 雅弘		
論文審査担当者	(職) 主査	氏名 大阪大学教授 木坂 亮一 氏名
	副査	大阪大学教授 木村 実一 氏名
	副査	大阪大学教授 木島 靖彦 氏名
論文審査の結果の要旨		
<p>大腸癌における多段階発癌 (adenoma-carcinoma sequence) は腺腫から散発性大腸癌への進展するモデルとして広く知られている。高頻度マイクロサテライト不安定性 (MSI-high) 大腸癌に対する免疫療法は、本邦でも広く使用されているが散発性大腸癌の多くを占める、マイクロサテライト安定性 (MSS) 大腸癌に対する治療効果が乏しい。また、正常から前癌(腺腫)、癌へと進行していくにあたって、癌微小環境 (Tumor Microenvironment: TME) における細胞間相互作用に関する重要なメディエーターは不明な点が多い。そこで、本研究では、早期大腸癌(腺腫内癌)に着目し、癌細胞の進展を助ける細胞とクロストークする細胞を同定し、新たな治療標的細胞および分子を探索、さらに予後を含めた臨床病理学的意義を明らかにすることを目的とした。</p> <p>本研究は、腺腫内癌5例と進行大腸癌1例の空間的トランスクリプトームとPublicのアジア人大腸癌23例のシングルセルRNAシーケンスに対して、深層生成モデルを用いた統合解析を行った。そこで、早期癌組織における腫瘍細胞と制御性T細胞とのMDK-SDC4を介した免疫寛容経路を明らかにした。さらにMDKシグナル伝達が、予後不良との関連することを示した。大腸癌における免疫療法の治療標的となる可能性を示す研究成果をあげており、学位の授与に値すると考えられる。</p> <p>尚、本研究は2024年4月にEBioMedicine誌に掲載された。</p>		