

Title	腫瘍浸潤ダイナミクスの解明と治療開発
Sub Title	Elucidation of tumor invasion dynamics and therapeutic development
Author	戸ヶ崎, 和博(Togasaki, Kazuhiro)
Publisher	慶應義塾大学
Publication year	2024
Jtitle	学事振興資金研究成果実績報告書 (2023.)
JaLC DOI	
Abstract	本研究では、びまん性胃がんオルガノイドを免疫不全マウスの胃へ同所移植することにより、腫瘍浸潤モデルを作成し、腫瘍浸潤細胞の機能性と動態について明らかにすることを目的とした。浸潤モデルのシングルセルRNA-seq解析から、腫瘍浸潤に寄与している細胞の遺伝子マーカーを同定した。複数の患者由来サンプルを統合解析し、同様の浸潤細胞集団が存在することを確認した。移植組織および患者検体にて、遺伝子マーカーの免疫染色から、浸潤先端部やtumor buddingにおいて、発現が上昇していることが見出された。このマーカー遺伝子を用いて、細胞の蛍光可視化および遺伝学的系譜解析を行った。蛍光可視化した細胞をマウスの胃壁に移植した後、胃を腹壁まで挙上して生体窓デバイスを取り付け、長波長多光子顕微鏡を用いて移植細胞の動態を経時的に観察した。すると移植直後はびまん性に分布していた蛍光細胞が、移植後1週間で浸潤先端部に集積するダイナミクスが確認された。またマーカー遺伝子を蛍光可視化したオルガノイドを利用し、in vitroで浸潤関連マーカーの発現が上昇する条件を同定した。 さらに浸潤細胞集団に特徴的な遺伝子の中から、25個の遺伝子をピックアップし、CRISPR sgRNAライブラリーを作成し、レンチウイルスに導入した。 今後、これを胃癌オルガノイドに感染させ、マウスに同所移植したあと浸潤した腫瘍に含まれるsgRNAをtarget sequenceによって定量することを計画している。こうして同定された遺伝子が治療標的となる可能性を探索する。 In this study, we aimed to establish a tumor invasion model by orthotopically transplanting diffuse gastric cancer organoids into the stomachs of immunodeficient mice, and to elucidate the functionality and dynamics of tumor-infiltrating cells. Single-cell RNA-seq analysis of the invasion model identified gene markers of the cells contributing to tumor invasion. Through the integrated analysis of multiple patient-derived samples, we confirmed the presence of similar infiltrating cell populations. IHC of the transplanted tissues and patient samples revealed increased expression of these gene markers at the invasion front and in tumor budding. Using these marker genes, we performed fluorescence visualization and genetic lineage tracing of the cells. After transplanting the fluorescently labeled cells into the stomach wall of the mice, we lifted the stomach to the abdominal wall and attached a window device, allowing us to observe the dynamics of the transplanted cells over time using long-wavelength multiphoton microscopy. Fluorescent cells that were diffusely distributed immediately after transplantation accumulated at the invasion front one week after transplantation. In addition, we identified conditions in vitro that increased the expression of invasion-related markers using organoids with fluorescence-labeled marker genes. Furthermore, from the genes characteristic of the infiltrating cell population, we picked 25 genes and created a CRISPR sgRNA library, which was introduced into lentiviruses. We plan to infect gastric cancer organoids with this library, orthotopically transplant them into mice, and quantify the sgRNAs present in the invasive tumors using target sequences. In this way, we will explore the potential of the identified genes as therapeutic targets.
Notes	
Genre	Research Paper
URL	https://koara.lib.keio.ac.jp/xoonips/modules/xoonips/detail.php?koara_id=2023000010-20230280

慶應義塾大学学術情報リポジトリ(KOARA)に掲載されているコンテンツの著作権は、それぞれの著作者、学会または出版社/発行者に帰属し、その権利は著作権法によって保護されています。引用にあたっては、著作権法を遵守してご利用ください。

The copyrights of content available on the Keio Associated Repository of Academic resources (KOARA) belong to the respective authors, academic societies, or publishers/issuers, and these rights are protected by the Japanese Copyright Act. When quoting the content, please follow the Japanese copyright act.

2023年度 学事振興資金（個人研究）研究成果実績報告書

研究代表者	所属	医学部基礎教室	職名	助教（有期・医学部）	補助額	500千円 （特B）
	氏名	戸ヶ崎 和博	氏名（英語）	Kazuhiro Togasaki		
研究課題（日本語）						
腫瘍浸潤ダイナミクスの解明と治療開発						
研究課題（英訳）						
Elucidation of tumor invasion dynamics and therapeutic development						
1. 研究成果実績の概要						
本研究では、びまん性胃がんオルガノイドを免疫不全マウスの胃へ同所移植することにより、腫瘍浸潤モデルを作成し、腫瘍浸潤細胞の機能性と動態について明らかにすることを目的とした。 浸潤モデルのシングルセルRNA-seq解析から、腫瘍浸潤に寄与している細胞の遺伝子マーカーを同定した。複数の患者由来サンプルを統合解析し、同様の浸潤細胞集団が存在することを確認した。移植組織および患者検体にて、遺伝子マーカーの免疫染色から、浸潤先端部やtumor buddingにおいて、発現が上昇していることが見出された。このマーカー遺伝子を用いて、細胞の蛍光可視化および遺伝学的系譜解析を行った。蛍光可視化した細胞をマウスの胃壁に移植した後、胃を腹壁まで挙上して生体窓デバイスを取り付け、長波長多光子顕微鏡を用いて移植細胞の動態を経時的に観察した。すると移植直後はびまん性に分布していた蛍光細胞が、移植後1週間で浸潤先端部に集積するダイナミクスが確認された。またマーカー遺伝子を蛍光可視化したオルガノイドを利用し、in vitroで浸潤関連マーカーの発現が上昇する条件を同定した。 さらに浸潤細胞集団に特徴的な遺伝子の中から、25個の遺伝子をピックアップし、CRISPR sgRNA ライブラリーを作成し、レンチウイルスに導入した。 今後、これを胃癌オルガノイドに感染させ、マウスに同所移植したあと浸潤した腫瘍に含まれるsgRNAをtarget sequenceによって定量することを計画している。こうして同定された遺伝子が治療標的となる可能性を探索する。						
2. 研究成果実績の概要（英訳）						
In this study, we aimed to establish a tumor invasion model by orthotopically transplanting diffuse gastric cancer organoids into the stomachs of immunodeficient mice, and to elucidate the functionality and dynamics of tumor-infiltrating cells. Single-cell RNA-seq analysis of the invasion model identified gene markers of the cells contributing to tumor invasion. Through the integrated analysis of multiple patient-derived samples, we confirmed the presence of similar infiltrating cell populations. IHC of the transplanted tissues and patient samples revealed increased expression of these gene markers at the invasion front and in tumor budding. Using these marker genes, we performed fluorescence visualization and genetic lineage tracing of the cells. After transplanting the fluorescently labeled cells into the stomach wall of the mice, we lifted the stomach to the abdominal wall and attached a window device, allowing us to observe the dynamics of the transplanted cells over time using long-wavelength multiphoton microscopy. Fluorescent cells that were diffusely distributed immediately after transplantation accumulated at the invasion front one week after transplantation. In addition, we identified conditions in vitro that increased the expression of invasion-related markers using organoids with fluorescence-labeled marker genes. Furthermore, from the genes characteristic of the infiltrating cell population, we picked 25 genes and created a CRISPR sgRNA library, which was introduced into lentiviruses. We plan to infect gastric cancer organoids with this library, orthotopically transplant them into mice, and quantify the sgRNAs present in the invasive tumors using target sequences. In this way, we will explore the potential of the identified genes as therapeutic targets.						
3. 本研究課題に関する発表						
発表者氏名 （著者・講演者）		発表課題名 （著書名・演題）		発表学術誌名 （著書発行所・講演学会）		学術誌発行年月 （著書発行年月・講演年月）