慶應義塾大学学術情報リポジトリ
Keio Associated Repository of Academic resouces

Title	神経内分泌前立腺がんのシングルセル解析による病態解明と新規治療戦略の確立
Sub Title	Single-cell analysis of neuroendocrine prostate cancer to elucidate pathophysiology and establish novel treatment strategy
Author	小坂, 威雄(Kosaka, Takeo) 植田, 幸嗣(Ueda, Koji) 西原, 広史(Nishihara, Hiroshi) 北野, 滋久(Kitano, Shigehisa)
Publisher	
Publication year	2023
Jtitle	科学研究費補助金研究成果報告書 (2022.)
JaLC DOI	
Abstract	治療誘導型神経内分泌がん（treatment-emergent Neuroendocrine Prostate Cancer: tNEPC）の出現が臨床上問題となってきている。NEPC検体での最新の空間的遺伝子発現解析システムによる全トランスクリプトーム解析ではアンドロゲン受容体の発現が残存し、その下流のPSAを含むAR標的因子の発現の差も不均一であり、またAR陰性かつNEPCマーカー陰性の部分も不均一に存在していた。血液循環腫瘍細胞(CTC)のシングルセル解析により患者ごとにCTCの1細胞ごとのRNA発現の不均一性を見出し、神経内分泌化に特徴的なバイオマーカー候補を数種類同定した。 The emergence of treatment-emergent Neuroendocrine Prostate Cancer (tNEPC) has become a clinical problem. Whole-transcriptome analysis using the latest spatial gene expression analysis system in NEPC specimens shows residual expression of the androgen receptor, heterogeneous differences in the expression of downstream AR target factors including PSA, and AR-negative. In addition, NEPC marker-negative portions were also heterogeneously present. By single-cell analysis of circulating tumor cells (CTCs), we found heterogeneity of RNA expression in CTCs among patients and identified several candidate biomarkers characteristic of neuroendocrine transformation.
Notes	研究種目：挑戦的研究 (萌芽) 研究期間：2021～2022 課題番号：21K19579 研究分野：シングルセル解析
Genre	Research Paper
URL	https://koara.lib.keio.ac.jp/xoonips/modules/xoonips/detail.php?koara_id=KAKEN_21K19579seika

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.

様　式　Ｃ－１９、Ｆ－１９－１、Ｚ－１９　（共通）

科学研究費助成事業　　研究成果報告書

令和　５ 年　 ５ 月 ２９ 日現在

機関番号：３２６１２
研究種目：挑戦的研究（萌芽）
研究期間：2021～2022
課題番号：２１Ｋ１９５７９

研究課題名（和文）神経内分泌前立腺がんのシングルセル解析による病態解明と新規治療戦略の確立

研究課題名（英文）Single-cell analysis of neuroendocrine prostate cancer to elucidate pathophysiology and establish novel treatment strategy

研究代表者

小坂　威雄（Kosaka, Takeo）

慶應義塾大学・医学部（信濃町）・講師

研究者番号：３０４４５４０７

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費）　　5,000,000円

研究成果の概要（和文）：治療誘導型神経内分泌がん（treatment-emergent Neuroendocrine Prostate Cancer: tNEPC）の出現が臨床上問題となってきている。NEPC検体での最新の空間的遺伝子発現解析システムによる全トランスクリプトーム解析ではアンドロゲン受容体の発現が残存し、その下流のPSAを含むAR標的因子の発現の差も不均一であり、またAR陰性かつNEPCマーカー陰性の部分も不均一に存在していた。血液循環腫瘍細胞(CTC)のシングルセル解析により患者ごとにCTCの1細胞ごとのRNA発現の不均一性を見出し、神経内分泌化に特徴的なバイオマーカー候補を数種類同定した。

研究成果の学術的意義や社会的意義
組織切片における空間的遺伝子発現解析による活性化遺伝子の3次元地図情報と、NEPC患者の血液循環腫瘍細胞(CTC)のシングルセル解析を統合解析することで、NEPCに存在するITHの理解と、ITHの制御を可能とする標的分子を同定した。今後の新規治療戦略確立のための基盤となる研究成果である

研究成果の概要（英文）：The emergence of treatment-emergent Neuroendocrine Prostate Cancer (tNEPC) has become a clinical problem. Whole-transcriptome analysis using the latest spatial gene expression analysis system in NEPC specimens shows residual expression of the androgen receptor, heterogeneous differences in the expression of downstream AR target factors including PSA, and AR-negative. In addition, NEPC marker-negative portions were also heterogeneously present. By single-cell analysis of circulating tumor cells (CTCs), we found heterogeneity of RNA expression in CTCs among patients and identified several candidate biomarkers characteristic of neuroendocrine transformation.

研究分野：シングルセル解析

キーワード：神経内分泌がん　リキッドバイオプシー　シングルセル解析　次世代シーケンサー　前立腺癌

※科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属します。

様　式　Ｃ－１９、Ｆ－１９－１、Ｚ－１９（共通）

１．研究開始当初の背景

本邦における前立腺癌の罹患数は近年男性の癌の第 1 位と上昇傾向にある。前立腺癌有転移症例においては、主にアンドロゲン遮断療法（androgen deprivation therapy; ADT）が施行される。ADT は当初は奏効するものの、次第にアンドロゲン非依存性増殖能を獲得し、去勢抵抗性前立腺癌（castration-resistant prostate cancer; CRPC）となる。CRPC に対する治療薬として 2014 年以降新たにアンドロゲン受容体シグナル阻害剤(Androgen Receptor Pathway inhibitor; ARPI)が登場したが、患者の予後が延長しているという恩恵と相反する臨床上の課題が浮き彫りとなった。それは治療誘導型神経内分泌がん（treatment-emergent Neuroendocrine Prostate Cancer: tNEPC)の出現である。tNEPC に対してはプラチナ系抗がん剤が選択されるが、極めて予後不良で前立腺がんの最大のアンメットメディカルニーズとして臨床上問題になってきている。

それでは NEPC の由来はどこにあるのだろうか？腫瘍はがん幹細胞を始め、多様な性質を有する細胞が存在し不均一性（intratumor heterogeneity: ITH）を有する。ARPI による強力な長期の阻害による治療選択圧や、抗がん剤のストレス・変異誘導によりゲノム・エピゲノム修飾を受けて多様性を獲得することで NEPC の ITH は益々複雑化されると考える。

NEPC におけるバイオマーカーや革新的な治療法の開発のためには、患者個体内での NEPC に内在する ITH を１細胞（シングルセル）レベルで理解することが重要である。

２．研究の目的

そこで本研究では、組織切片における空間的遺伝子発現解析による活性化遺伝子の 3 次元地図情報と、NEPC 患者の血液循環腫瘍細胞(CTC)のシングルセル解析を統合解析することで、NEPC の ITH の理解と、ITH の制御を可能とする標的分子を同定し、新規治療戦略の確立を目的とする。

３．研究の方法

（１）NEPC 検体での空間的遺伝子発現解析システムによる全トランスクリプトーム解析

初期診断時の生検や手術検体、転移巣（実質臓器として肝転移や肺転移）生検が実施し得る患者では、最新の空間的遺伝子発現解析システム（Visium 空間的遺伝子発現ソリューション）を用いて ITH を解析する。本システムはスライドガラス上にポリ T のオリゴ配列を並べ、分子バーコードを付与した塩基を使って RNA 解析する画期的な技術である。NEPC 生検検体切片における全トランスクリプトームを空間的な位置情報を保ったままマッピングすることで、組織切片上で活性化している遺伝子の地図を入手することができる。標的分子については最新の免疫多重染色機（Vectra Polaris）を用いて蛋白レベルで発現解析し、分子病理学的バイオマーカーの導出と、がん免疫微小環境の特徴を解明する。

（２）NEPC 患者の血液循環腫瘍細胞(CTC)のシングルセル解析

CTC はがんの転移に直接的に関与し、低侵襲的に最も純粋ながん細胞の情報を取得できる解析対象であると考えられて来たが、血液 1ml の中にわずか数個から数百程度しか存在しないその希少性から遺伝子情報を取得するためには、シングルセルレベルで血液中から分離する技術の登場を待つ必要があった。申請者らは次世代の新規 CTC 回収システムに着目し、教室に導入した。本システムは専用のマイクロ流路チップを利用して、流体力学に基づき CTC がサイズ依存性に他の血球成分と分離され、抗体を用いることなくラベルフリーで CTC が濃縮可能なシステムある。人工的な影響が最小限で回収以降の解析や培養が可能で、上皮性マーカーの発現が乏しいがんにおいても CTC が効率よく回収でき、他のシステムに比して有利で独自性があり、既に臨床応用している。本研究では NEPC 患者の進行度や時間軸に沿って CTC を回収し、CTC シングルセル RNA シークエンスを実施する。シングルセル RNA 解析はそれぞれ単一細胞に含まれる微量 mRNA から、定量的な RNA シークエンスを可能にした画期的な研究手法である。シングルセル解析により ITH の制御を可能とする標的分子を同定する。

４．研究成果

研究期間はコロナの影響もあり、入院や外来通院などが規制され、経時的な検体採取が困難な症例もあった。また、臨床検体の輸送に制限があったことで、研究の進捗が予定通り進まないこともあった。しかし以下のように成果を得ることができた。

（１）NEPC 検体での全トランスクリプトーム解析

NEPC の生検検体と手術検体の切片においては、検体の質と解析対象とする場所の選定が解析の精度を担保するために重要である。検体採取の方法や保存法によって、RNA の質にも相違があることが明らかになった。そこで、質が保たれ、解析可能な症例 6 例における全トランスクリプトームを空間的な位置情報を保ったままマッピングすることで、組織切片上で活性化している遺伝子の地図を得ることができた。病理学的に NEPC と診断されていても、アンドロゲン受容体が発現が残存し、その下流の PSA を含む AR 標的因子の発現の差も不均一であることが明らかになった。また AR 陰性で NEPC マーカー陰性の部分も不均一に存在しておりそれらの解析から、有望な分子マーカー候補を抽出できた。今後、引き続き機能解析を含めて研究を進めていく。

（２）NEPC 患者の血液循環腫瘍細胞(CTC)のシングルセル解析

シングルセル化のためのプラットフォームは分子バーコード法を用いる。シングルセル解析の感度・特異度を高くしたハイスループットの次世代シーケンサーシステム（Chromium システム）を使用し、ITH の制御を可能とする標的分子を同定する。CTC のシングルセル解析は、シングルセル化のためのプラットフォームが重要であるが、分子バーコード法を用いるハイスループットの次世代シーケンサーシステムを使用し、標的分子を探索した。6 例の NEPC 患者のシングルセル RNA シークエンスを実施できた。これらの検体では、患者ごとに CTC の１細胞ごとの RNA 発現の不均一性を見出し、特に急速進行例でその傾向は顕著であった。腺癌ではなく、神経内分泌化に特徴的なバイオマーカー候補を数種類同定した。空間的遺伝子発現解析システムによる全トランスクリプトーム解析も同時に施行できた症例においては、その CTC の由来との位置関係の解析も併せて継続して進めている

研究期間はコロナの影響もあり、入院や外来通院などの規制により、経時的な検体採取が困難な症例もあったこと、臨床検体の輸送に制限があったことで、研究の進捗が予定通り進まないこともあったが、

５．主な発表論文等

〔雑誌論文〕　計4件（うち査読付論文　4件／うち国際共著　0件／うちオープンアクセス　4件）

１．著者名 Kobayashi Hiroaki、Kosaka Takeo、Nakamura Kohei、Shojo Kazunori、Hongo Hiroshi、Mikami Shuji、Nishihara Hiroshi、Oya Mototsugu	４．巻 14
２．論文標題 A first case of ductal adenocarcinoma of the prostate having characteristics of neuroendocrine phenotype with PTEN, RB1 and TP53 alterations	５．発行年 2021年
３．雑誌名 BMC Medical Genomics	６．最初と最後の頁 1-4
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1186/s12920-021-01093-9	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 －

１．著者名 Kosaka Takeo、Hongo Hiroshi、Hayashi Hideyuki、Nakamura Kohei、Nishihara Hiroshi、Mikami Shuji、Beltran Himisha、Oya Mototsugu	４．巻 24
２．論文標題 Germline BRCA2 mutation in a case of aggressive prostate cancer accompanied by spinal bulbar muscular atrophy	５．発行年 2022年
３．雑誌名 Asian Journal of Andrology	６．最初と最後の頁 116～116
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.4103/aja.aja_37_21	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 －

１．著者名 Omura Minami、Kosaka Takeo、Aimono Eriko、Nakamura Kohei、Hongo Hiroshi、Mikami Shuji、Nishihara Hiroshi、Oya Mototsugu	４．巻 5
２．論文標題 First successful case of platinum‐based chemotherapy for neuroendocrine prostate cancer with BRCA2 and PTEN alterations	５．発行年 2021年
３．雑誌名 IJU Case Reports	６．最初と最後の頁 41～44
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1002/iju5.12383	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 －

１．著者名 Hongo Hiroshi、Kosaka Takeo、Nakatsuka Seishi、Oya Mototsugu	４．巻 10(3)
２．論文標題 A long-term survivor of metastatic neuroendocrine prostate cancer treated with multimodal therapy: genetic consideration from next-generation sequencing	５．発行年 2021年
３．雑誌名 International Cancer Conference Journal	６．最初と最後の頁 1-4
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1007/s13691-021-00482-2	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 －

〔学会発表〕　計3件（うち招待講演　3件／うち国際学会　0件）

１．発表者名
小坂　威雄

２．発表標題
前立腺癌におけるBRCA1/2遺伝学的検査と遺伝カウンセリング　遺伝性乳癌卵巣癌(HBOC)診療ガイドライン2021と前立腺癌

３．学会等名
第109回 日本泌尿器科学会総会（招待講演）

４．発表年
2021年

１．発表者名
小坂　威雄

２．発表標題
前立腺神経内分泌がんにおける血中循環腫瘍細胞のシングルセル解析と空間的遺伝子発現解析システムを統合した腫瘍内不均一性の解明と革新的新規治療戦略の確立

３．学会等名
第109回 日本泌尿器科学会総会（招待講演）

４．発表年
2021年

１．発表者名
大家基嗣、小坂威雄

２．発表標題
若手臨床医が基礎研究に携わる意義と方法

３．学会等名
第80回　日本癌学会総会（招待講演）

４．発表年
2021年

〔図書〕　計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕
慶應義塾大学医学部泌尿器科学教室
http://www.keio-urology.jp/

6．研究組織

	氏名 （ローマ字氏名） （研究者番号）	所属研究機関・部局・職 （機関番号）	備考
研究分担者	植田　幸嗣 (Ueda Koji) (10509110)	公益財団法人がん研究会・がんプレシジョン医療研究センター　がんオーダーメイド医療開発プロジェクト・プロジェクトリーダー (72602)	
研究分担者	西原　広史 (Nishihara Hiroshi) (50322805)	慶應義塾大学・医学部（信濃町）・教授 (32612)	
研究分担者	北野　滋久 (Kitano Shigehisa) (60402682)	公益財団法人がん研究会・有明病院　がん免疫治療開発部・部長 (72602)	

7．科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕　計0件

8．本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関