

平成30年 5月15日現在

機関番号：32644

研究種目：基盤研究(B) (一般)

研究期間：2015～2017

課題番号：15H04287

研究課題名(和文) がん幹細胞 微小環境相互作用の高機能疾患モデル「がんゼノ患者」による多面的解析

研究課題名(英文) Multidimensional Analysis of Cancer Stem Cell - Microenvironment Interaction with Patient Derived Xenografts (PDX) or Cancer Xenopatients

研究代表者

中村 雅登 (NAKAMURA, Masato)

東海大学・医学部・教授

研究者番号：00164335

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 12,900,000円

研究成果の概要(和文)：がん患者由来ゼノグラフト(Patient Derived Xenograft, PDX)とヒトがんの臨床情報を系統的に一体化し、擬似的に各患者とみなして新世代の疾患モデル(がんゼノ患者: Cancer Xenopatient, CXP)として解析した。PDX/NOGのインタラクトーム解析を実施した。特に、CXPについて解析しCSC-niche/PDXにおける相互作用を解析した。インタラクトーム解析から相互作用を遺伝子発現の量、強さ、向き(CSC依存性、niche依存性)を明らかにし、依存性の高い相互作用分子の抽出を試みた。インタラクトーム解析結果をCXPシステムにより多面的・総合的に考察した。

研究成果の概要(英文)：Mice bearing Patient-derived xenografts (PDXs) with clinical information (so-called "Cancer Xenopatients") are remarkable systems for personalized medicine of cancer. The NOG mice were appropriate immunodeficient host animals for direct xenografting due to preserving cancer-stem-cells (CSCs). Using PDX/NOG models same as surgical samples are stably provided. The PDX/NOG models could simulate for personalized cancer chemotherapy. Collagen gel droplet culture-drug sensitivity tests (CD-DST) between original and PDX/NOG specimen were well correlated. Interactome analyses showed tumor-stroma interactions of PDX/NOG comprehensively in gene-expression level by distinguishing gene-arrangement of human tumor from mice stroma. Interactome profiles were closely reflected to clinical effectiveness. The interactome analyses in PDX/NOG were reliable to simulate clinical courses. The interactome profiles well reflecting chemosensitivity could contribute to personalized anticancer therapies.

研究分野：病理学

キーワード：がん幹細胞 微小環境 幹細胞ニッチ相互作用 インタラクトーム 免疫不全マウス 患者由来ゼノグラフト 癌ゼノ患者 個別化医療

1. 研究開始当初の背景

本研究で用いる NOG マウスを用いた患者由来ゼノグラフト(PDX/NOG)は従来のヒトがんゼノグラフトと異なりがん幹細胞 CSC をその微小環境と共に維持できることを特色とする(CSC-niche/PDX)。同時に、この PDX および CSC-niche/PDX は、ヒトがん患者材料(血清、がん組織、病理組織材料など)の保存から臨床情報(治療経過、化学療法など)までを系統的に一体化し、擬似的に各患者と同等とみなして各種創薬研究に応用展開可能な新世代の疾患モデル(がんゼノ患者: Cancer Xenopatient, CXP)である。本研究はこの CSC-niche/PDX および CXP を単にヒトがん幹細胞材料として用いるだけでなく、CSC-niche 相互作用網羅的分子解析データの効率的標的分子絞込みのための高機能疾患モデルシステムとして展開し、がん幹細胞およびその維持に必要な微小環境間(CSC-niche)相互作用機序の解明に役立てる。更に CSC-niche 相互作用を標的とした新規創薬基盤技術として確立しようとする意欲的なものである。研究期間を3年以内に以下の研究テーマについて研究を実施することとした。

2. 研究の目的

超免疫不全 NOG マウスを用いて作出されるがん患者ゼノグラフト(Patient-Derived Xenograft, PDX)はがん幹細胞(Cancer Stem Cell, CSC)を *in vivo* 微小環境(niche)内で維持可能なヒト型化高機能実験動物モデルである(CSC-niche/PDX)。さらに、この CSC-niche/PDX に臨床情報および網羅的解析情報(特にインタラクトーム解析情報)を一体化したがんゼノ患者(Cancer Xenopatient, CXP)モデルは CSC-niche の機能を *in vivo* で再現可能な、そしてヒトがんの進行・転移における CSC-niche 相互作用分子機構を解明することを可能にする画期的な高機能ヒト型化疾患マウスモデル動物である。本研究は、この CXP 疾患モデルコホートの多面的(多次元、系統的)インタラクトーム解析により CSC 維持・制御に必要な CSC-niche 相互作用を明らかにすることを目的とする。

3. 研究の方法

がん手術材料の採取: 神奈川県立がんセンターおよび東海大学医学部付属病院にて治療目的手術で採取された各種進行がん(大腸

癌・膵臓癌・乳癌・悪性リンパ腫・多発性骨髄腫などの原発巣あるいは転移巣)を倫理委員会承認およびインフォームドコンセントを得られた症例において、がん切除後直ちに材料採取を開始した。材料はがん切除材料から病理診断などに支障の無い範囲で採取された。採取した組織の一部から凍結切片標本作製し、がん組織が適切に採取できていることを確認した。確認できたがん組織からがん細胞材料を調整した。基本的に本研究の作業は材料採取から動物移植実験まで、無菌環境下で行う必要があるため、手術材料からの腫瘍材料の採取以下の作業はすべて安全キャビネット内または密封容器内にて行われた。

がん患者ゼノグラフト株(Patient Derived Xenograft; PDX/NOG): 得られた臨床がん材料を速やかに NOG マウス皮下または静脈内に移植した。移植後4週(1ヶ月)以内にがん細胞の生着を判定し、生着した腫瘍については継代移植と凍結保存を実施した。継代の際には免疫組織化学的にがん細胞・組織の形態学的変化の有無を確認した。継代移植3代を経たものを PDX 株として樹立と判定した。また十分に生育したゼノグラフトから分子病理学的解析用に材料を採取した。

がん幹細胞-微小環境(CSC-niche)の細胞生物学的解析: がん幹細胞 CSC がどのような性格を有しているかを解析する目的で CSC-niche/PDX を細胞生物学的あるいは免疫学的に分画し評価した。がん組織を小組織片まで細断し、組織片あるいは単一遊離細胞状態のどちらが CSC の保持に適しているかを検討した。分画したがん組織を更に短期培養し壁付着性の有無の影響を解析した。付着細胞についてはヒト CSC を含むか、niche の機能を再現できるかを解析した。また、薬物排出能による違いで分画(セルソーター法/SP, Side population など)し CSC 分画を評価する。既知の分化抗原(表面抗原)をもとにセルソーター法、マイクロビーズ法によって癌細胞集団を分画し、CSC 分画の性格を絞り込んだ。更に、単離された癌細胞/培養癌細胞株と線維芽細胞/間質マトリックスの共培養複合体(CSC-niche)の作出を試みた。

PDX/NOG CSC-niche/PDX の樹立(がん幹細胞の *in vivo* 濃縮): 樹立された PDX/NOG をさらに繰り返し継代移植することにより CSC-niche を濃縮した CSC-niche/PDX の樹立を進めた。対象は症例数の多い大腸癌・肺

癌から行ったが、難治性の膵癌・乳癌および多発性骨髄腫なども対象とした。通常、十分量まで CSC を濃縮するには NOG マウスを用いても 10 継代以上・数年間を要する。我々はすでにがん転移巣を移植材料とすることや移植法を工夫することなどにより他施設よりはるかに短時間で CSC を *in vivo* 濃縮できるようになっているが、本研究では更に初代移植ヒトがん細胞数やがん材料の調整方法の改善、継代移植時期、新規に開発された複合免疫不全マウスとの比較検討も行い、更なる迅速化を目指した。CSC-niche/PDX 樹立の迅速化(1年以内)を目標とし、100株/年近くのPDXを樹立することを目標とする。がん幹細胞に適した微小環境を解析するために、NOG マウス移植部位による癌組織の生着性・増殖性の差を解析する。正所性移植(肺癌 肺胞内移植など)・異所性移植(皮下移植、尾静脈移植など)を行い、CSC 維持の微小環境 niche 依存性も合わせて検討した。

がん幹細胞(CSC-niche)の同定: PDX 標本および臨床病理標本について、既知の相互作用分子(主として増殖因子 EGFR, VEGF, HER2, c-kit などとその受容体)の発現を免疫組織学的に検討し、臨床経過と標的分子局在の整合性検討を行う。また各種幹細胞マーカーなどの免疫組織学的検討(HLA, LGR5, ALDH, CD133, CD44, EpCAM, Dclk1, CD166, CD24, CD26, CD29 など)により CSC-niche/PDX を選択的にフォローアップする技術の確立を試みた。CSC-niche を組織学的に解析し、その形態、免疫組織化学的特性(分裂能、表面抗原発現)を解析することを目指した。また、継代移植ごとに自己複製能と多能性が保持されるかを解析し CSC-niche を同定するとともに、CSC-niche を最適に維持できる移植条件(移植組織量、正所性移植・異所性移植など)を調整した。がん細胞依存性(ヒト)の因子および微小環境依存性(マウス)の因子それぞれに対する特異抗体を用い、ゼノグラフト内における因子(抗原)局在を解析し、後述するインタラクトーム解析結果と照合しその妥当性を考察した。

インタラクトーム解析: PDX/NOG の細胞全 RNA を抽出し、継代移植ごとにインタラクトーム解析を実施した。CSC-niche/PDX の樹立過程における相互作用の変化を解析する。インタラクトーム解析では、まずヒトがん細胞とマウス微小環境(間質)それぞれの由来を遺伝子配列から振り分け、遺伝子発現プロファイルを

構築した。この結果とタンパク質相互作用データベースよりバイオインフォマティック処理にて約 3000 種のインタラクトームデータベースを作成する。このインタラクトームデータベースでは相互作用を遺伝子発現の量、強さ、向き(CSC 依存性、niche 依存性)で表すことができ、依存性の高い相互作用分子を抽出することを目指した。既に、一部の PDX/NOG についての解析結果から、既存の抗癌剤・分子標的薬の効果予測となりうるデータや新規標的分子候補が明らかになりつつある。本研究では PDX/NOG から CSC-niche/PDX に至る過程における相互作用の変化を多面的に解析する。CSC-niche/PDX(CXP)樹立された症例を継続的に集積・解析し、CSC-niche 相互作用(依存性を含めて)を明らかにする。本研究では、インタラクトーム解析を CXP システムにより多面的に解析し、がん幹細胞の環境依存性の本質に迫る重要な相互作用を探索した。また、同時に、病理組織学的検討等を踏まえ、がんの形質転換・薬剤耐性の獲得などに関連する CSC-niche 相互作用を明らかにすることを目指した。

上記の研究成果をもとに、CSC-niche 相互作用のがん進展における役割を解析し、確立されたヒトがん細胞株/NOG マウス肝転移移植実験系に、PDX/NOG の移植実験を展開し CSC-niche の *in vivo* 肝転移における意義を解析した。以下の研究への展開を計画 3 年度内(平成 29 年度中)に 3)の段階まで進める予定で研究を実施し、CSC-niche 相互作用関連分子が既知のものについては研究を前倒し実施し臨床病理学的研究への展開を図った。

4. 研究成果

がんゼノ患者モデル作出は順調に進捗し過去約 5 年間に渡り継続・実施してきたがん材料からの PDX の樹立結果をまとめ、報告した(雑誌論文 1)。神奈川県立がんセンター/東海大学医学部付属病院にて治療目的手術で採取される各種進行がん材料(約 100 症例)を NOG マウスに移植した。生着した腫瘍については継代移植と凍結保存を実施した。

ヒトがん幹細胞-微小環境(CSC-niche)相互作用に関連する分子探索: 濃縮した CSC-niche/PDX より分離した CSC-niche の網羅的分子解析(インタラクトーム・プロテオーム)解析結果の比較検討を行い、CSC の

生存・維持に関連する候補分子の抽出を行う。ゲノムおよびプロテオーム解析の相互比較を有効なものとするために解析は多面的に実施する。計画年度内に、がん 10 種類以上ごとに 25 症例以上、全体で 250 症例以上の解析を目標とし、継代毎のインタラクトーム解析結果の発現有意差を検討した。CSC-niche 相互作用候補分子が既知の因子(分化誘導因子、増殖因子など)の場合はこれらの因子を PDX/NOG マウス実験モデルにフィードバックし、CSC-niche 相互作用に対する効果を *in vivo* において解析した。また、CSC-niche 相互作用候補分子が未知の場合はこれらの分子に対する抗体、アンチセンス核酸分子の効果を解析した。さらに、今後、候補分子の遺伝子のクローニングを行う。クローニングされた遺伝子を癌細胞株あるいは繊維芽細胞株に遺伝子導入し、CSC あるいは niche の機能を再現できるかを CXP モデルシステムにより解析する予定である。

プロテオーム解析およびメタボローム解析研究への展開: 我々は細胞株ゼノグラフトのプロテオミクス解析研究から、大腸癌/膵癌の肝転移関連物質を発見し報告した。研究進展に合わせ、CSC-niche/PDX を用いたインタラクトーム解析結果を、より特定の CSC-niche 相互作用に対応する蛋白レベル及び代謝産物レベルの解析をマイクロダイセクション 顕微質量分析・顕微メタボローム解析技術などに展開し、蛋白発現レベル・代謝レベルでの相互作用の解析を目指した。

臨床材料における CSC-niche 相互作用関連分子の発現解析: 以上の研究計画・方法により得られた結果から、ヒトがん幹細胞 / 微小環境の相互作用機能維持に関連する候補分子について臨床病理学的解析を実施した。候補分子が癌の増殖・遠隔転移のマーカー(診断指標)となりうるか、癌の増殖・遠隔転移の予防・治療のための標的となりうるかについて総合的に考察し、インタラクトーム解析から相互作用を遺伝子発現の量、強さ、向き(CSC 依存性、niche 依存性)を明らかにし、依存性の高い相互作用分子の抽出を試みた。インタラクトーム解析結果を CXP システムにより多面的・総合的に考察した。(学会発表 3 および 5)。

継代の際には免疫組織化学的にがん細胞・組織の形態学的変化の有無を確認する。継代移植3代を経たものをPDX (Patient Derived

Xenograft)株として樹立した(約80株)。このPDXとヒトがんの臨床情報を系統的に一体化し、擬似的に各患者と同等とみなして各種創薬研究に応用展開可能な新世代の疾患モデル(がんゼノ患者: Cancer Xenopatient, CXP)として確立した。また一部のPDX標本 / 臨床病理標本について、相互作用分子(主として増殖因子とその受容体)の発現を免疫組織学的に検討し、臨床経過と標的分子局在の整合性検討を行った。また各種幹細胞マーカーの免疫組織学的検討によりCSC-niche/PDXを選択的に追跡する技術を確立することを目指し、CSC-nicheを組織学的・免疫組織化学的に解析した。更に、一部のPDX/NOGについて、細胞全RNAを抽出し、継代移植ごとにインタラクトーム解析の実施を試みたが十分か解析数に至らなかった。

5. 主な発表論文等

(雑誌論文) (計 5 件)

1. Yohei Miyagi et al., The collagen gel droplet-embedded culture drug sensitivity test in relapsed hepatoblastoma. *Journal of Pediatric Hematology and Oncology*, 2017, 395-401 (査読あり)
2. Yohei Miyagi et al., HEG1 is a novel mucin-like membrane protein that serves as a diagnostic and therapeutic target for malignant mesothelioma. *Science Report*, 2017, 45768 (査読あり)
3. Yukari Muguruma, Takashi Yahata, Kiyoshi Ando et al., Jagged 1-induced Notch activation contributes to the acquisition of bortezomib resistance in myeloma cells. *Blood Cancer Journal*, 7, 2017, 1408, DOI: 10.1038/s41408-017-0001-3 (査読あり)
4. Shunpei Ishikawa et al., CASTIN: a system for comprehensive analysis of cancer-stromal interactome. *BMC Genomics*, 17(1), 2017, 899 (査読あり)
5. Tsuyoshi Chijiwa, Kenji Kawai, Yohei Miyagi, Masato Nakamura, et al., Establishment of patient-derived cancer xenografts, *International Journal of Oncology*, 47, 2015, 61-70, DOI: 10.3892/ijo.2015.2997 (査読あり)

[学会発表](計 5 件)

1. Tsuyoshi Chijiwa, Shunpei Ishikawa, Yohei Miyagi, Masato Nakamura et al., An interactome analysis for personalized chemotherapy using PDX/NOG models of non-small cell lung cancer. American Association for Cancer Research Annual Meeting, 2017, USA
2. Tsuyoshi Chijiwa, Shunpei Ishikawa, Yohei Miyagi, Masato Nakamura et al., The prevention of lymphoproliferative lesions arising in patient -derived cancer xenografts by anti-graft versus-host disease agents. AACR Advances in Modeling Cancer in Mice: Biology, and Beyond, 2017, USA
3. Tsuyoshi Chijiwa, Shunpei Ishikawa, Masato Nakamura, Yohei Miyagi et al., The possibility of personalized chemotherapy for non-small cell lung cancer using interactome analysis of PDX/NOG models. ESMO Asia, 2017, Singapore
4. Tsuyoshi Chijiwa et al., Clinical applications of PDX/NOG models for personalized chemotherapy, Possible use in chemo-sensitivity testing and clinical sequencing. American Association for Cancer Research: Special Conference on Patient-Derived Cancer Models, 2016. New Orleans, LA, USA
5. Daisuke Furukawa, Tsuyoshi Chijiwa, Masato Nakamura, et al., Clinical significance of ZNF185 intracellular localization in pancreatic ductal carcinoma. American Association for Cancer Research, Annual Meeting, 2016, New Orleans, Louisiana, USA

[図書](計 0 件)

[産業財産権]

○出願状況(計 0 件)

取得状況(計 0 件)

[その他]

ホームページ等

6. 研究組織

(1)研究代表者

中村 雅登(NAKAMURA, Masato)

東海大学・医学部・教授

研究者番号:00164335

(2)研究分担者

宮城 洋平(MIYAGI, Yohei)

地方独立行政法人神奈川県立がんセンター

(臨床研究所)・総括部長

研究者番号:00254194

石川 俊平(ISHIKAWA, Shunpei)

東京医科歯科大学・難治疾患研究所・教授

研究者番号:50418638

安藤 潔(ANDO, Kiyoshi)

東海大学・医学部・教授

研究者番号:70176014

千々和 剛(CHIJIWA, Tsuyoshi)

自治医科大学・医学部・講師

研究者番号:70642180

(3)連携研究者

なし

(4)研究協力者

なし