

平成 30 年 6 月 20 日現在

機関番号：22701

研究種目：基盤研究(B) (一般)

研究期間：2015～2017

課題番号：15H04922

研究課題名(和文)1細胞レベルでの膵癌幹細胞の特性変化の細胞系譜的解析

研究課題名(英文)Dissecting pancreatic cancer cell evolution at single cell level.

研究代表者

関根 圭輔 (SEKINE, Keisuke)

横浜市立大学・医学部・助教

研究者番号：00323569

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 12,800,000円

研究成果の概要(和文)：膵癌は、特徴的な臨床症状が乏しいために早期発見が非常に困難で、また治療を行った場合でも再発率および転移率が高く極めて予後の悪い難治性癌である。本研究では、膵癌の発生から進展・薬剤耐性能の獲得、転移能の獲得に至るまでの過程を理解・制御を目指し、膵癌微小環境を再現可能なin vitro培養系を開発した。抗がん剤に対する治療抵抗性に関与する可能性があり、かつ癌幹細胞と微小環境の細胞間相互作用に関与する可能性のある候補分子を複数抽出することに成功した。

研究成果の概要(英文)：Pancreatic cancer is a refractory cancer with extremely poor prognosis because it has poor characteristic clinical symptoms and it is very difficult to detect early. Even when treatment is performed patient with pancreatic cancer exhibit a high recurrence rate and metastasis rate. In this study, we developed an in vitro culture system capable of reproducing pancreatic cancer microenvironments with the aim of understanding and controlling the process from the development of pancreatic cancer to acquisition of drug resistance ability and acquisition of metastatic potential. We succeeded in extracting multiple candidate molecules possibly involved in the resistance to treatment against anticancer drugs and possibly involved in intercellular interaction between cancer stem cells and microenvironment.

研究分野：幹細胞生物学

キーワード：膵癌 オルガノイド

1. 研究開始当初の背景

膵癌は、特徴的な臨床症状が乏しいために早期発見が非常に困難で、また治療を行った場合でも再発率および転移率が高く極めて予後の悪い難治性癌である。事実、発症数と死亡数がほぼ同数で、我が国の癌による死亡数の第5位に位置することから膵癌の診断および治療応用へ向けた基盤研究の推進が急務であるといえる。これまでの研究から、膵癌の発癌・転移・再発には癌幹細胞(cancer stem cell)が関与すると言われており、膵癌幹細胞が転移や化学放射線療法に抵抗性を示すことが高い再発率を示す原因であると考えられている。

癌幹細胞は癌組織内に存在し自己複製能をもつ幹細胞としての性質を有し、自己複製と分化を繰り返すことにより、不均一な癌組織を形成していることが明らかとなってきた。これまでに白血病の解析から、癌幹細胞は組織幹細胞に変異が蓄積することにより発生することが明らかにされており、固形組織においても分化細胞よりも組織中に長く生存する幹細胞に変異が蓄積することによって発生する可能性が高いと考えられるが、その詳細は不明な点が多い。癌幹細胞を取り巻くいわゆる微小環境が幹細胞ニッチとして機能すると考えられ、癌幹細胞を考える上で微小環境を理解することが重要である。

2. 研究の目的

膵癌の治療法および診断法の開発を目指す上で、膵癌幹細胞の発生プロセスおよび腫瘍の増悪に伴う細胞生物学的特性変化を追跡することが重要な基盤となると考えられる。しかし、膵臓の組織幹細胞研究は海外を含め糖尿病治療を標的とした細胞の再生医療を目指した研究が中心となり膵幹細胞の視点から膵癌幹細胞を捉えた研究は行われていないのが現状である。そこで、膵癌幹細胞の出現プロセスとその後の転移能獲得までの幹細胞特性に焦点を絞り、膵癌の発生母地および転移、化学放射線療法耐性の本態と考えられる膵癌幹細胞の基盤研究を進め膵癌を克服するための知見の蓄積を目的とする。癌幹細胞を標的とした治療には、一口に癌幹細胞といってもどのような性状の癌幹細胞を標的としなければならないのか、ということを知る必要が有る。すなわち、発

癌初期の癌幹細胞は癌の進行に伴い変異(ジェネティックおよびエピジェネティックな変異)されより一部が悪性度の高い癌幹細胞へと進化する。さらに癌が進行すると転移能を持つ癌幹細胞へと進化すると考えられる。例えば、膵癌は肝臓に高率に転移することが知られているが、肝転移した転移性肝癌中の癌幹細胞がどのような特性を持つのか全く明らかにされていない。そこでこれら進行度の異なる複数の癌幹細胞の違いおよびそれぞれの癌幹細胞集団におけるヘテロジェネティを細胞系譜を追って明らかにすることが極めて重要である。その一方で、膵癌は豊富な間質を有する癌であり、間質が癌の進展および予後に深く関わることを考えられてきた。しかしながら、近年、間質のみを標的とした治療はむしろ膵癌を増悪させることが明らかとなってきた。そのため、膵癌の治療は単に間質を標的とするのではなく、膵癌幹細胞-間質相互作用をその成り立ちから、進展・薬剤耐性能の獲得・転移能に獲得に至るまでの過程を理解し、それを制御することが重要であると考えられる。膵癌幹細胞-間質相互作用を解析し、検証するためには、膵癌微小環境を再現可能な *in vitro* 培養系が必須である。

3. 研究の方法

マウスモデルは膵癌で見られる特徴的な遺伝子変異である 1st hit の遺伝子変異(KrasG12D)とさらに 2nd hit の遺伝子変異(CDKN2A 欠損)を導入した遺伝子変異膵癌モデルを用いた。このモデルマウスでは生後 9 週前後で膵癌は発症するため、生後 4-10 週のマウスを解剖し、様々な発癌段階の膵癌組織を得た。ヒト膵癌は横浜市立大学医学部および検体取得医療機関における倫理審査の承認を得て、患者の同意が得られたものに関し取得を行った。膵癌細胞はマトリゲルに包埋した状態で培養を行い、血管内皮細胞および間葉系細胞との共培養を実施し、抗がん剤に対する感受性の検討などの解析を実施した。

4. 研究成果

膵癌組織を酵素処理により単細胞化し、網羅的遺伝子発現解析を実施した。ヒト膵癌細胞については膵癌に特徴的な間質を豊富に含む癌微小環境を再現するための培養条件を検討し、癌細胞単独では見られない、抗が

ん剤に対する抵抗性を in vitro で再現する培養条件を見出した。さらに、網羅的遺伝子発現解析および培養液中に分泌されるタンパク質の網羅的解析であるセクレトーム解析を実施した。その結果、抗がん剤に対する治療抵抗性に関与する可能性があり、かつ癌幹細胞と微小環境の細胞間相互作用に関与する可能性のある候補分子を複数抽出することに成功した。

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文](計 6件)

- 1 Zhang RR, Koido M, Tadokoro T, Ouchi R, Matsuno T, Ueno Y, Sekine K, Takebe T, Taniguchi H.
Human iPSC-derived posterior gut progenitors are expandable and capable of forming gut and liver organoids 査読有
Stem Cell Reports. 10: 780-793. (2018) doi: 10.1016/j.stemcr.2018.01.006. Epub 2018 Feb 8.
- 2 †*Sekine K, †Camp JG, Gerber T, Loeffler-Wirth H, Binder H, Gac M, Kanton S, Kageyama J, Damm G, Seehofer D, Belicova L, Bickle M, Barsacchi R, Okuda R, Yoshizawa E, Kimura M, Ayabe H, Taniguchi H, *Takebe T, *Treutlein B
† equal contribution., * corresponding author.
Multilineage communication regulates human liver bud development from pluripotency 査読有
Nature. 546:533-538. (2017)
doi: 10.1038/nature22796. Epub 2017 Jun 14.
- 2 Takahashi Y, Sekine K, Kin T, Takebe T, Taniguchi H
Self-condensation culture enables vascularization of tissue fragments for efficient therapeutic transplantation 査読有
Cell Reports. 23:1620-1629. (2018)
doi: 10.1016/j.celrep.2018.03.123.
- 3 Takebe T, Sekine K, Kimura M, Yoshizawa E, Ayano S, Koido M, Funayama S, Nakanishi N, Hisai T, Kobayashi T, Kasai T, Kitada R, Mori A, Ayabe H, Ejiri Y, Amimoto N, Yamazaki Y, Ogawa S, Ishikawa M, Kiyota Y, Sato Y, Nozawa K, Okamoto S, Ueno Y, Taniguchi H.
Massive and reproducible production of liver buds entirely from human pluripotent stem cells 査読有
Cell Reports 21: 2661-2670. (2017)
doi: 10.1016/j.celrep.2017.11.005.
- 4 Sekine K, Takebe T, Taniguchi H.
Liver Regeneration Using Cultured Liver Bud 査読無

Methods Mol Biol. 1597: 207-216. (2017) doi: 10.1007/978-1-4939-6949-4_15. PMID: 28361320

- 5 Chang PH, Sekine K, Chao HM, Hsu S, Chern E
Chitosan promotes cancer progression and stem cell properties through Wnt signaling in colon and hepatocellular carcinoma cells 査読有
Scientific Reports 8, Article number: 45751 (2017)
doi: 10.1038/srep45751.
- 6 Koike H, Zhang RR, Ueno Y, Sekine K, Zheng YW, Takebe T, Taniguchi H
Nutritional modulation of mouse and human liver bud growth through a branched-amino acid metabolism. 査読有
Development. 144: 1018-1024. (2017) doi: 10.1242/dev.143032.

[学会発表](計 13件)

- 1 濱田 侑希, 園根 圭輔, 都築 周作, 小林 達也, 安居 良太, 上野 康晴, 武部 貴則, 池田 一貴, 谷口 英樹: ヒト iPSC 肝芽の臨床応用に向けた安全性評価手法の確立
第 17 回日本再生医療学会総会
2018 年 3 月 22 日
- 2 園根圭輔, 奥田諒, 井上達也, 金子千夏, 碓井彩華, 上野康晴, 谷口英樹: 腫瘍微小環境を模倣するヒト膵癌オルガノイドは薬剤耐性を示す。
第 76 回日本癌学会学術総会 口頭
Sep.28-30(29),2017 横浜
- 3 奥田諒, 園根圭輔, 上野康晴, 佐藤準也, 高橋正希, 井上達也, 金子千夏, 碓井彩華, 谷口英樹: 癌微小環境を模倣した患者由来ヒト膵がんオルガノイドの創出。
第 76 回日本癌学会学術総会 口頭
Sep.28-30(29),2017 横浜
- 4 碓井彩華, 奥田諒, 園根圭輔, 上野康晴, 佐藤準也, 高橋正希, 井上達也, 金子千夏, 谷口英樹: 腫瘍微小環境を伴う膵癌オルガノイドは薬剤耐性を示す。
第 76 回日本癌学会学術総会 ポスター
Sep.28-30(29),2017 横浜
- 5 上野康晴, 奥田諒, 金子千夏, 碓井彩華, 園根圭輔, 谷口英樹: 微小環境を伴うヒト膵癌オルガノイドの再構築に基づく新規膵癌薬剤評価系の構築。
第 76 回日本癌学会学術総会 ポスター
Sep.28-30(29),2017 横浜
- 6 金子千夏, 奥田諒, 園根圭輔, 上野康晴, 佐藤準也, 高橋正希, 井上達也, 碓井彩華, 谷口英樹: 腫瘍微小環境を伴う膵癌オルガノイドは in vitro で治療抵抗性を示す。
第 76 回日本癌学会学術総会 ポスター
Sep.28-30(29),2017 横浜

- 7 Taniguchi H, Sekine K, Okuda R, Ueno Y: Development of a human pancreatic cancer organoid recapitulating the tumor microenvironment. The 41st Naito Conference, Cancer Heterogeneity and Plasticity: Relevance to Therapeutic Resistance Invited Speaker Jul.5-8, 2016 Hokkaido, Japan
- 8 佐藤準也、奥田諒、濱中香織、高橋正希、**関根圭輔**、上野康晴、谷口英樹: 膵癌組織中の微小環境を有する膵癌オルガノイドを用いた新規薬剤評価系の構築
第 15 回日本再生医療学会(大阪)、口頭発表
- 9 高橋禎暢、武部貴則、小池直人、**関根圭輔**、谷口英樹: 血管化膵島移植による革新的糖尿病治療の確立.
第 16 回日本再生医療学会総会 ポスター Mar. 7- 9, 2017 国内
- 10 高橋禎暢、武部貴則、小池直人、**関根圭輔**、谷口英樹: 血管化膵島移植による革新的糖尿病治療の確立. 第 44 回日本膵・膵島移植研究会 口頭 Mar. 10-11, 2017 国内
- 11 奥田諒、**関根圭輔**、上野康晴、佐藤準也、高橋正希、祖父江瑤子、井上直、濱中香織、谷口英樹: 腫瘍微小環境を模倣するヒト膵癌オルガノイドの創出.
第 39 回分子生物学会, Nov.30-Dec.2,2016 国内
- 12 **関根圭輔**, J. Gray Camp, Barbara Treutlein, 武部貴則、谷口英樹: シングルセルレベルでの iPSC 肝芽構成細胞のポピュレーションヘテロジェネシティ解析
第 39 回分子生物学会, Nov.30-Dec.2,2016 国内
- 13 奥田諒、高橋正希、佐藤準也、**関根圭輔**、上野康晴、谷口英樹: 腫瘍微小環境を模倣するヒト膵癌オルガノイドの創出
第 75 回日本癌学会総会、2016.10.6-10.8,パシフィコ横浜 国内

〔図書〕(計 1 件)

Organ Regeneration Based on Developmental Biology
Springer book; Editors: Tsuji, Takashi (Ed.)
ISBN: 978-981-10-3766-5 (Print)
978-981-10-3768-9 (Online)
DOI10.1007/978-981-10-3768-9
Number of Pages XIII, 257
Liver Regeneration Using Cultured Liver Bud
Pages 223-235
Keisuke Sekine, Takanori Takebe, Hideki Taniguchi

〔産業財産権〕

出願状況(計 1 件)

名称: 腫瘍組織再現法
発明者: 関根圭輔
権利者: 公立大学法人 横浜市立大学
種類: 特許願
番号: 特願 2017- 50769
出願年月日: 平成 29 年 3 月 16 日
国内外の別: 国内

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

関根 圭輔 (SEKINE, Keisuke)
横浜市立大学・医学部・助教
研究者番号: 00323569

(2) 研究分担者

谷口 英樹 (TANIGUCHI, Hideki)
横浜市立大学・医学部・教授
研究者番号: 70292555

武部 貴則 (TAKEBE, Takanori)

横浜市立大学・先端医科学研究センター・
教授
研究者番号: 20612625

(3) 連携研究者

なし

(4) 研究協力者

なし