

令和 3 年 5 月 27 日現在

機関番号：32622

研究種目：基盤研究(C)（一般）

研究期間：2018～2020

課題番号：18K08610

研究課題名（和文）膵臓がん微小環境に長期生存するがん間質幹細胞を標的とした新規治療法の開発

研究課題名（英文）Development of Novel Therapies Targeting Cancer Stromal Stem Cells that Survive Long-Term in the Pancreatic Cancer Microenvironment

研究代表者

和田 聡 (WADA, SATOSHI)

昭和大学・大学共同利用機関等の部局等・教授

研究者番号：30420102

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,400,000円

研究成果の概要（和文）：膵臓がんPDXを17系統作製した。腫瘍組織を上皮と間質マーカーとに分けて染色し、間質マーカー陽性細胞をFACSソーティングして次世代シーケンサーにて解析した。その結果、長期継代したPDXにおいて発現の高い遺伝子Xを同定した。同じPDXにおける遺伝子Xの発現解析を行い、遺伝子Xはがん細胞には全く発現を認めない事を確認した。次に同じPDXの腫瘍組織を用いて遺伝子Xの免疫染色を行い、腫瘍の一部の間質細胞にのみ発現を認めた。そこで遺伝子Xを標的とした治療法の開発を行うため、遺伝子Xに対する抗体を作製してCAR分子を構築した。それをT細胞に遺伝子導入してCAR-T細胞を作製し抗腫瘍効果について検討した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究は、難治性がん中最も予後不良である膵臓がん患者を対象とした新規治療法の開発を目的とした研究である。本研究が成功すれば、膵臓がんて苦しむ多くの患者さんに恩恵がもたらされる。これまでのがん治療は腫瘍細胞を標的とした治療法が多く開発されているが、本研究の特徴は、がん細胞を標的とするのではなく、がん間質細胞を標的とするところにある。本研究では、間質細胞の中でもがん間質幹細胞を標的とした治療法の開発であり、新しい着眼点のがん治療法開発となる。

研究成果の概要（英文）：We generated 17 lines of pancreatic cancer PDX. Tumor tissues were stained with epithelial and stromal markers, and stromal marker-positive cells were sorted by FACS and analyzed by next-generation sequencing. From the results of the analysis, we identified gene X that was highly expressed in the long-succeeded PDX. The expression of gene X in cancer cells of the same PDX was analyzed, and it was found that gene X was not expressed in cancer cells at all, but only in stromal cells. Next, we performed immunostaining for gene X using tumor tissue of the same PDX, and found that gene X was expressed only in some stromal cells of the tumor. In order to start the development of therapies targeting gene X, we generated antibodies against gene X and constructed CAR molecules. The CAR-T cells were generated by gene transfer to T cells, and their anti-tumor effects were examined.

研究分野：腫瘍免疫、消化器がん

キーワード：膵臓がん がん間質幹細胞 膵臓がんPDX 次世代シーケンサー CAR-T療法

1. 研究開始当初の背景

腫瘍を形成する細胞の中には、ごく少数の がん幹細胞 (Cancer Stem Cells: CSCs) と、CSCs から分化・派生したがん細胞 (非がん幹細胞) とが存在し、正常組織の発生段階で見られるような幹細胞を頂点とする分化の階層が残されていることを示唆する多数の報告がある (Reya et al. Nature, 2001, Batlle et al. Nat Med, 2017)。近年の見解では、CSCs は抗癌剤や放射線などあらゆる治療に抵抗性の性格を有しており、局所浸潤・遠隔転移、再発などがんの悪性的特徴の中心的役割を担っていると考えられていて、真の治療標的細胞として多くの研究が進められている。一方、腫瘍の発生や進展には、腫瘍細胞を取り囲む間質の微小環境が重要な役割を果たすことが数々の研究で証明されてきた。一部の腫瘍では間質量や線維芽細胞増殖性の高さがその悪性度や患者の予後と強く相関していることが示唆されており、新しいがん診断や治療標的として注目されている。がん間質を構成する細胞としては、血管内皮細胞や周皮細胞、マクロファージ (tumor associated macrophage: TAM) などの免疫担当細胞、線維芽細胞/筋線維芽細胞をはじめとする組織特有のがん関連線維芽細胞 (Cancer associate fibroblast: CAF) など多くの細胞が存在するが、これらが特殊な微小環境を構成し、そこから供給される誘導因子が上皮間葉転換 (Epithelial-Mesenchymal Transition: EMT) を含む浸潤・転移・増殖などがんの進展を促進する根源となっていると考えられている (Calabrese et al. Cancer Cell, 2007)。またこれらの間質細胞ががん細胞の化学療法や放射線治療に対する抵抗性を強めることも明らかとなっており、**間質を制御することはがんを治療するうえでとても重要であると考えられるが、がん間質に対する治療法については未だに確立されていないのが現状である。**

間葉系幹細胞 (Mesenchymal Stem Cells: MSCs) は骨髄をはじめ、脂肪組織や諸臓器に存在し、骨・軟骨・脂肪など間葉系細胞に分化しうる多分化能細胞である。また体内の免疫調整能を有することも知られている。更に組織の維持や修復などに際し補助的な役割を担うなど多様な特徴を持つが、がん細胞に対してはがん組織に動員され多くのがん間質構成細胞へと変化し、腫瘍進展に大きく関与している可能性が高いことが報告されている (Karnoub et al. Nature, 2007, Mishra et al. Can Res, 2009)。がんの発生部位や転移部位に集積する特性を有するとも報告されているが、集積することの意義、集積した細胞の役割 (特にがんの進展への関与) についてはまだ明らかではない。**本研究では、間質細胞特に腫瘍増悪に強く関与する間葉系幹細胞を標的とした新規がん治療法の開発に取り組む。**

2. 研究の目的

がん微小環境の重要性が年々高まっているがその本質についてはまだ解明されていない。特にその根幹をなすがんの悪性度に関与する間葉系幹細胞 (がん間質幹細胞) の役割についてはまだ議論が始まったばかりであり、今後更なる研究が期待されている。**本研究の目的は、がん微小環境に長期生存し、がんの進展に関与する間質細胞 (がん間質幹細胞) に着目して、その細胞の機能と役割を明らかとし、その細胞を標的とした新規がん治療法を可能とするための技術的・知的基盤を確立することである。**また本研究では、**患者腫瘍組織移植モデル (Patient derived xenograft: PDX) を用いる事により、間質が患者細胞からマウス細胞に置きかわる現象を利用する事ができ、がん間質に長期生存する患者由来の間質細胞に焦点を当てた研究が可能となる。このような研究はこれまでに報告がなく我々オリジナルの研究である。本研究の成果として、がんの進展に関与するがん間質幹細胞を同定しそれを標的とした新規治療法が開発できれば、これまでのアプローチとは異なる正に革新的治療法の開発となり、特にがん間質が豊富である膵臓がんに対する新規治療アプローチを提供できるものと期待される。**

3. 研究の方法

本研究では、膵臓がん PDX を用いて早期継代 (G2) と長期継代 (継代 8 回, G8) したそれぞれ同じ 3 系統の PDX を用いて下記のように実験を行う (**下図参照**)。

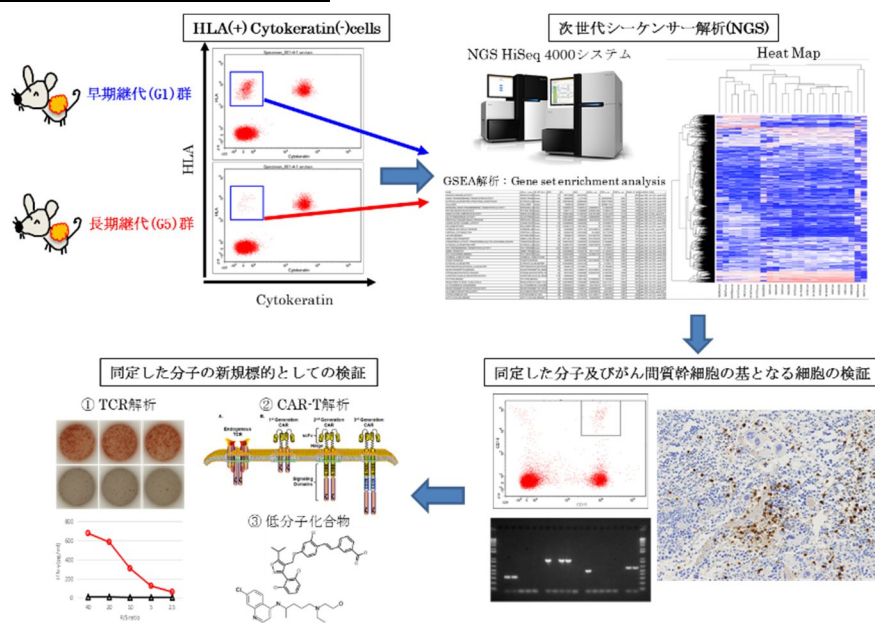
腫瘍組織からマウス由来の細胞 (EGFP+, HLA-) 及びがん細胞 (HLA+, cytokeratin+) を取り除いて患者由来の間質細胞 (HLA+, cytokeratin-) のみを抽出する。

患者由来の間質細胞を早期継代 (G2) と長期継代 (G8) したものとに分けて次世代シー

ケンサー解析 (NGS) を行い、それぞれのデータの比較解析を行う。
 長期継代した腫瘍の患者由来間質細胞 (がん間質幹細胞) に強く発現する遺伝子を同定すると共に、間質細胞由来の発現パネル (Gene Set Enrichment Analysis (GSEA)) に照らし合わせてがん間質幹細胞の基となる細胞を探索する。
 同定した遺伝子及びがん間質幹細胞の基となる細胞に着目し、腫瘍組織における間質細胞の免疫組織染色、FACS解析又はRT-PCR解析を施行する。
 これらの解析から患者由来の長期生存するがん間質細胞 (がん間質幹細胞) の特徴を明らかとし、がん間質幹細胞を標的とした新規標的分子として検証を行う。

- 1) 標的分子が細胞内分子である場合には、これまで我々が行ってきた免疫解析法を駆使してepitope peptideを同定する。更にはpeptide特異的CTLクローンを樹立してT cell Receptor (TCR)解析を行う。
- 2) 標的分子が細胞膜分子である場合には、その分子に対する抗体を作成し、抗体療法又はChimeric Antigen Receptor(CAR)T細胞療法へと応用させる。
- 3) 1), 2)と並行して企業と提携し低分子阻害剤の開発に取り組む。

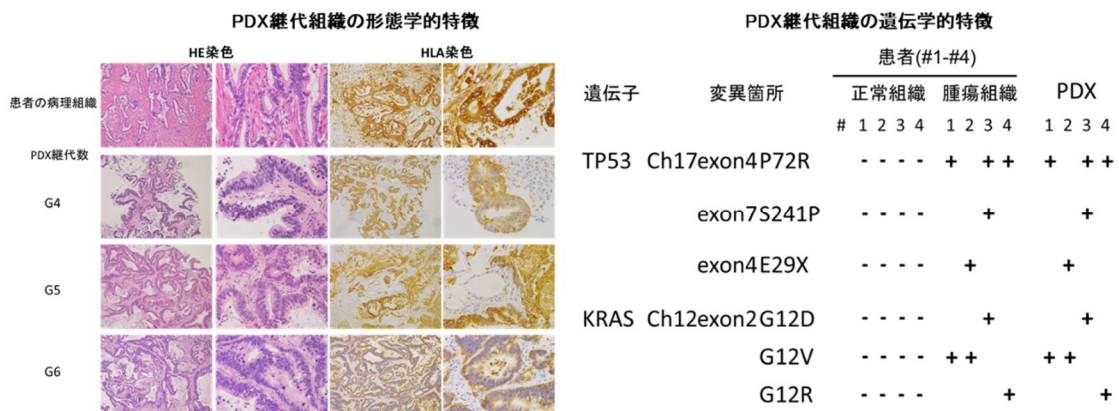
以上の解析を行うことによりがん間質幹細胞の特徴を明らかにすると共に多角的な新規治療法の開発に繋がると期待される。



4. 研究成果

膵臓がん患者より腫瘍組織を採取し、それを超免疫不全マウス(NOG マウス)に移植する事で膵臓がん PDX を 17 系統作製した。作製した膵臓がん PDX を継代しても**膵臓がん組織の特徴が保たれている事を形態学及び遺伝学的に証明した (図 1)。**

図 1

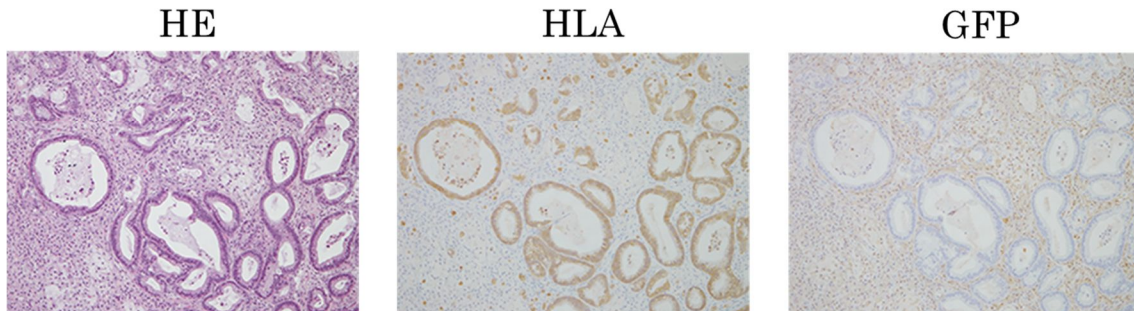


また本研究で用いたマウスの特徴として NOG-EGFP マウスを使用しており、このマウスの使用により、**患者由来細胞とマウス由来細胞とを分けて解析することが可能となった (図**

2) がん細胞もがん間質細胞も元は患者由来であるが、マウス継代を行うことによりがん細胞は患者由来のままであるが、がん間質細胞はマウス由来に置換されていく。この現象を利用して、がん間質がマウス由来に置換されていく中で残存する患者由来のがん間質細胞に着目して解析を行った。更に本研究では、この間質細胞を次世代シーケンサー(NGS)にて解析を行ったが、そこでもマウスのシーケンスとヒトのシーケンスとを完全に分けて解析を行った。

図 2

NOG-EGFPマウスに移植した膵臓がん組織(G4)



膵臓がん PDX 腫瘍組織を上皮マーカーと間質マーカーとで染色し、間質マーカー陽性細胞を FACS ソーティングして次世代シーケンサー(NGS)にて解析を行った。得られたデータをマウス由来のシーケンスとヒト由来のシーケンスとに完全に分けて解析し、ヒト由来のシーケンスのみデータ解析を施行した。この解析を若い世代の PDX(G2)と多く継代した PDX(G8)とを用いて比較検証した。その発現解析結果から、長期継代した PDX において発現が高く維持されている遺伝子 X を同定した。同定した遺伝子 X が間質細胞に特異的であるかを検証するため、同じ PDX モデルのがん細胞における遺伝子発現と比較解析を行った結果、同定した遺伝子 X はがん細胞には全く発現を認めず、間質細胞にのみ発現している事が判明した。またその遺伝子 X 由来の蛋白質発現を同じ PDX モデルの腫瘍組織を用いて免疫染色を行った結果、腫瘍の一部の間質細胞にのみ発現を認めた。そこでこの遺伝子を標的としての治療法の開発に着手した。遺伝子 X 由来の抗原蛋白に対する抗体を作製して CAR 分子を構築した。それを T 細胞に遺伝子導入して CAR-T 細胞を作製し抗腫瘍効果について検討した。

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 4件/うちオープンアクセス 4件）

1. 著者名 Ohkuma R, Yada E, Ishikawa S, Komura D, Ishizaki H, Tamada K, Kubota Y, Hamada K, Ishida H, Hirasawa Y, Ariizumi H, Satoh E, Shida M, Watanabe M, Onoue R, Ando K, Tsurutani J, Yoshimura K, Yokobori T, Sasada T, Aoki T, Murakami M, Norose T, Ohike N, Takimoto M, Izumizaki M, Kobayashi S, Tsunoda T, Wada S.	4. 巻 10
2. 論文標題 High expression of olfactomedin-4 is correlated with chemoresistance and poor prognosis in pancreatic cancer.	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 PLoS One	6. 最初と最後の頁 e0226707
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1371/journal.pone.0226707	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 該当する
1. 著者名 Yada E, Wada S, Yoshida S, Sasada T.	4. 巻 4
2. 論文標題 Use of patient-derived xenograft (PDX) mouse models in cancer research and treatment	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Future Sci OA	6. 最初と最後の頁 FS0271
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.4155/fsoa-2017-0136	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 該当する
1. 著者名 Ohkuma R, Yada E, Ishikawa S, Komura D, Kubota Y, Hamada K, Horiike A, Ishiguro T, Hirasawa Y, Ariizumi H, Shida M, Watanabe M, Onoue R, Ando K, Tsurutani J, Yoshimura K, Sasada T, Aoki T, Murakami M, Norose T, Ohike N, Takimoto M, Kobayashi S, Tsunoda T, Wada S	4. 巻 44
2. 論文標題 High Expression Levels of Polymeric Immunoglobulin Receptor Are Correlated With Chemoresistance and Poor Prognosis in Pancreatic Cancer	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Oncol Rep	6. 最初と最後の頁 252-262
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3892/or.2020.7610	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 該当する
1. 著者名 Ohkuma R, Yada E, Ishikawa S, Komura D, Kubota Y, Hamada K, Horiike A, Ishiguro T, Hirasawa Y, Ariizumi H, Shida M, Watanabe M, Onoue R, Ando K, Tsurutani J, Yoshimura K, Sasada T, Aoki T, Murakami M, Norose T, Ohike N, Takimoto M, Kobayashi S, Tsunoda T, Wada S	4. 巻 58
2. 論文標題 High levels of human epididymis protein 4 mRNA and protein expression are correlated with chemoresistance and poor prognosis in pancreatic cancer	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Int J Oncol	6. 最初と最後の頁 57-69
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3892/ijo.2020.5147	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 該当する

〔学会発表〕 計3件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 1件）

1. 発表者名 大熊遼太郎, 矢田英理香, 石川俊平, 河村大輔, 久保田祐太郎, 濱田和幸, 堀池篤, 安藤清宏, 鶴谷純司, 吉村清, 笹田哲朗, 村上雅彦, 瀧本雅文, 角田卓也, 和田 聡
2. 発表標題 Human epididymis protein4の発現が膵臓癌における抗癌剤耐性・予後不良に与える影響
3. 学会等名 第79回日本癌学会学術総会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 大熊遼太郎, 久保田祐太郎, 濱田和幸, 石田博雄, 平澤優弥, 有泉 裕嗣, 佐藤悦子, 志田みどり, 渡邊 真, 鶴谷純司, 吉村清, 青木武士, 村上雅彦, 野呂瀬智子, 大池信之, 瀧本雅文, 角田卓也, 和田 聡
2. 発表標題 Expression of Olfactomedin-4 in pancreatic cancer and its clinical significance
3. 学会等名 第17回日本臨床腫瘍学会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 yotaro Ohkuma, Erica Yada, Yutaro Kubota, Kazuyuki Hamada, Hiroo Ishida, Yuya Hirasawa, Hirotsugu Ariizumi, Etsuko Satoh, Junji Tsurutani, Kiyoshi Yoshimura, Tetsuro Sasada, Takeshi Aoki, Masahiko Murakami, Tomoko Norose, Nobuyuki Ohike, Masafumi Takimoto, Takuya Tsunoda, Satoshi Wada
2. 発表標題 High expression of Olfactomedin-4 correlates with chemoresistance and poor prognosis for pancreatic cancer
3. 学会等名 AACR(American Association for Cancer Research) 110th Annual Meeting (国際学会)
4. 発表年 2019年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

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
---------------------------	-----------------------	----

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
---------	---------