

令和 4 年 6 月 21 日現在

機関番号：82606

研究種目：基盤研究(B)（一般）

研究期間：2019～2021

課題番号：19H03718

研究課題名（和文）人為的がん組織構築による膵癌-間質相互作用の解明と制御

研究課題名（英文）Elucidation and control of pancreatic cancer-stroma interaction by artificial cancer tissue construction

研究代表者

関根 圭輔（Sekine, Keisuke）

国立研究開発法人国立がん研究センター・研究所・ユニット長

研究者番号：00323569

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 13,300,000円

研究成果の概要（和文）：本研究では、膵癌細胞-間質相互作用を明らかにすることを目的にin vivoでの空間的オミックス解析を行った。さらに、臨床検体からプライマリ細胞を樹立し、樹立したプライマリ細胞に対するシングルセルレベルの網羅的遺伝子発現解析を実施した。これらのデータを統合的したインフォマティクス解析を実施することで転写因子ネットワークや細胞間相互作用に関わるリガンド-レセプター解析、細胞内シグナルネットワーク解析を実施し、膵癌細胞-間質相互作用に関与すると考えられる転写因子ネットワークの同定と複数の膵癌細胞-間質相互作用の候補分子の同定に成功した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

膵癌は極めて予後の悪い難治癌であり、本邦では肝癌を抜いて第4位となっており、2030年までには第2位となるとの予測もあるなど、予後の改善に向けた開発が社会的要求が高いといえる。本研究では膵癌の進展に必須と考えられる膵癌細胞と間質の間におこる相互作用に関与すると考えられる転写因子ネットワークの同定と複数の膵癌細胞-間質相互作用の候補分子の同定に成功した。今後これらの分子を標的とした機能解析と創薬開発により、膵癌の予後改善に貢献する可能性が期待される。

研究成果の概要（英文）：In this study, we performed in vivo spatial omics analysis for the purpose of clarifying pancreatic cancer cell-stromal interactions. Furthermore, primary cells were established from clinical specimens, and a single-cell level comprehensive gene expression analysis was performed on the established primary cells. By conducting informatics analysis that integrates these data, we carried out ligand-receptor analysis and intracellular signal network analysis related to transcription factor networks and cell-cell interactions. We succeeded in identifying a possible transcription factor network and candidate molecules for multiple pancreatic cancer cell-interstitial interactions.

研究分野：腫瘍細胞生物学、幹細胞生物学

キーワード：オルガノイド 癌

1. 研究開始当初の背景

膵癌は、罹患者数と死亡者数がほぼ同数であり、5年生存率が8-10%と極めて予後不良の難治癌である。さらに、膵癌は増加傾向が続いており、本邦では肝癌を抜いて第4位となっており、2030年までには第2位となるとの予測もあるなど、予後の改善に向けた開発に対する社会的要求が高いといえる。

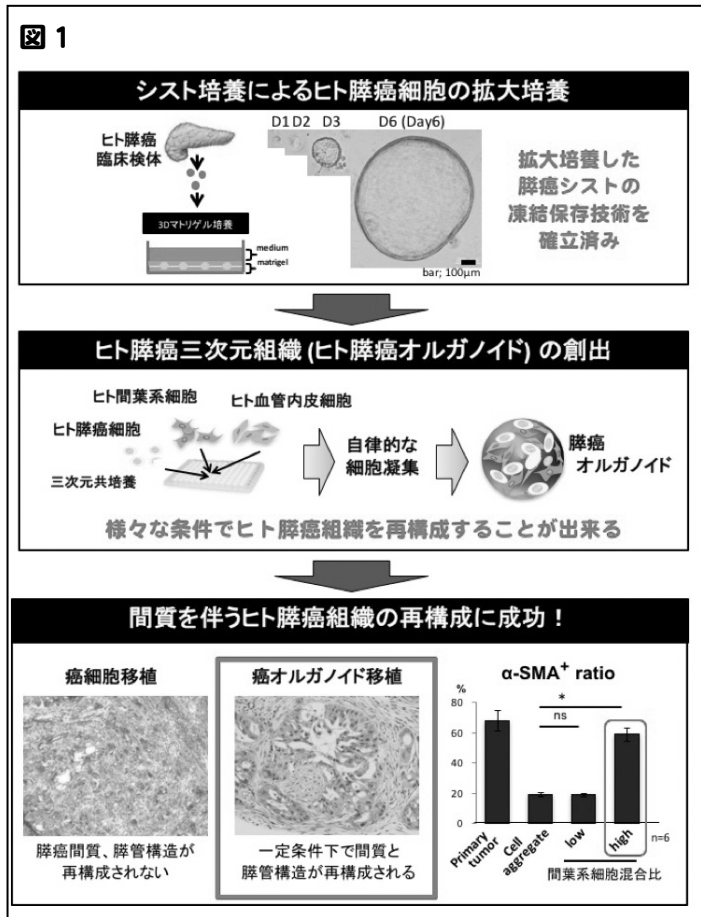
では、なぜこれまで優れた抗癌剤が開発されていないのか？膵癌は豊富な間質を有する癌であり、間質が癌の進展および予後に深く関与することが明らかとなっている。しかしながら、創薬開発において間質を含む培養法が無く、膵癌の薬剤応答を正確に再現する評価が不可能であったことに起因すると考えられる。一方、近年、間質のみを標的とした治療はむしろ膵癌を増悪させることが明らかとなってきた。そのため、膵癌の治療は単に間質を標的とするのではなく、膵癌細胞-間質相互作用をその成り立ちから、進展・薬剤耐性能の獲得・転移能に獲得に至るまでの過程を理解し、それを制御することが重要であると考えられる。したがって、膵癌細胞-間質相互作用を解析し、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。

2. 研究の目的

我々は、これまでに間質を伴う正常組織の人為的再構成法 (Nature, 2013, Nature 2017) を基盤とし、日本人膵癌患者より分離したプライマリ膵癌細胞を用いて、膵癌微小環境を再現可能なヒトプライマリ膵癌オルガノイド作製法を開発した。ヒトプライマリ膵癌オルガノイドは *in vitro* および *in vivo* において高い抗癌剤耐性を示すことから、膵癌患者の高い治療抵抗性を再現するための手法を確立したと言える(図1)。

より具体的には膵癌オルガノイドから再構成されたゼノグラフトの組織内では、膵癌検体で見られる間質量と近似した組織が再現されていた。そこで、作製した膵癌オルガノイドに対する抗がん剤の薬剤感受性を検討したところ、従来の二次元培養あるいは癌細胞単独の3次元培養系と比べて高い抵抗性を示すことを見出した。また、膵癌オルガノイドを移植した免疫不全マウスにおいても薬剤感受性が大きく低下したことから、豊富な間質を有する膵癌オルガノイドは生体に近似した薬剤感受性を再現しうることを示された(図2)。本技術は、間質量を人為的に操作することや、癌細胞/間質細胞を独立に遺伝子発現制御した細胞による再構成、由来の異なる間質細胞を用いた再構成するなどにより膵癌細胞-間質相互作用を制御し、解析することが可能である。そこで、本研究では我々が開発したヒトプライマリ膵癌オルガノイドを用いて、膵癌細胞-間質相互作用を明らかにし、膵癌制圧のための膵癌細胞-間質相互作用の制御を試みる。

図1



3. 研究の方法

プライマリ膵癌オルガノイドおよびオルガノイド由来ゼノグラフトを対象としてシングルセル RNA シークエンス解析を実施する。申請者らが確立した独自インフォマティクスを活用し、膵癌細胞-間質相互作用を明らかにする。抽出した因子については、膵癌細胞/間質細胞それぞれ独立に遺伝子発現制御した細胞を用いて膵癌オルガノイドを再構成することにより機能解析を実施する。なお、プライマリ膵癌細胞に対する遺伝子発現制御はレンチウイルスを用いることで高

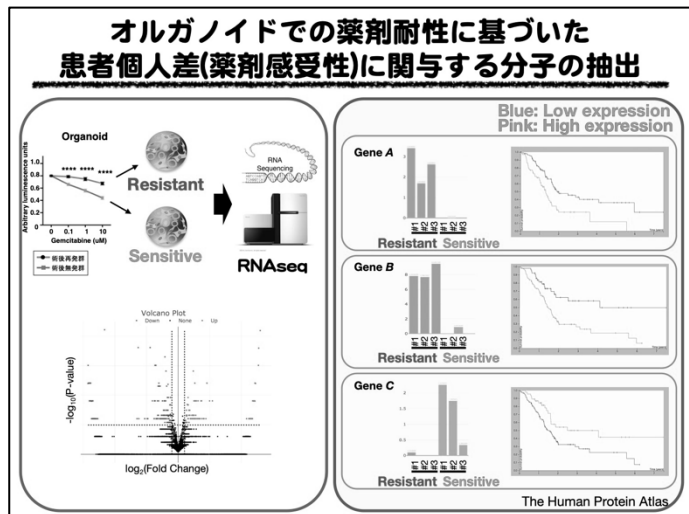
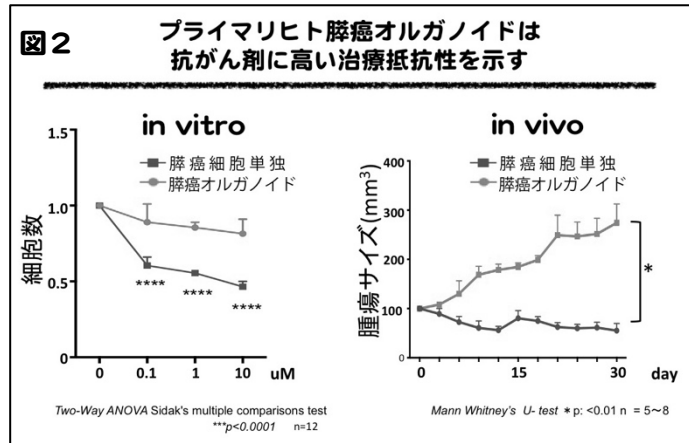
率に遺伝子導入できることを確認している。

4. 研究成果

手術検体より樹立した膵癌細胞とヒト臍帯静脈内皮細胞 (HUVEC)、ヒト間葉系幹細胞 (hMSC) あるいは iPS 細胞由来間質細胞の共培養を行い、間質が豊富なプライマリ膵癌オルガノイドを作出した。作製した間質を豊富に含む癌オルガノイドは in vitro および in vivo で癌細胞単独と比較して、膵癌の第一選択薬である Gemcitabine に対して治療抵抗性を示すことが確認された。間質を豊富に含む癌オルガノイドでも、使用する患者検体によって治療抵抗性が高い細胞と比較的感受性のある細胞があることから、これらの細胞、各 3 検体ずつを用いて作製した間質を豊富に含む癌オルガノイドに対して複数の Gemcitabine 濃度を処理した細胞より、RNA を抽出した。抽出した RNA より次世代シーケンス用のライブラリーをそれぞれバーコードを付して作製し、RNA シーケンスを実施した。Gemcitabine 抵抗性の有無により差が有る遺伝子を抽出に成功した。これらが治療抵抗性に関連する分子と考えられた。そこで、さらにこれらの分子について、公共のデータベースを用いて患者予後との相関を評価するため、それぞれの因子の発現強度によって公共データベースを分け、評価した。すると、間質を豊富に含む癌オルガノイドにおける治療抵抗性の違いによる発現の高さと、発現の高さで層別化した公共データの患者予後との間に有意な相関がある分子を複数抽出することに成功した。

さらに、より患者検体における癌細胞-間質細胞間相互作用に関連する因子を抽出する目的で、患者組織における空間的トランスクリプトームを実施するとともに、間質が豊富なプライマリ膵癌オルガノイドのシングルセルレベルのトランスクリプトーム解析を実施することで、癌細胞-間質細胞間相互作用に関連すると考えられる複数の分子の抽出に成功した。

今後これらの分子の解析を進めることで、膵癌において治療抵抗性および患者予後を規定すると考えられる癌細胞-間質細胞間相互作用を明らかにし、膵癌の治療成績の改善につながると期待される。



さらに、より患者検体における癌細胞-間質細胞間相互作用に関連する因子を抽出する目的で、患者組織における空間的トランスクリプトームを実施するとともに、間質が豊富なプライマリ膵癌オルガノイドのシングルセルレベルのトランスクリプトーム解析を実施することで、癌細胞-間質細胞間相互作用に関連すると考えられる複数の分子の抽出に成功した。

今後これらの分子の解析を進めることで、膵癌において治療抵抗性および患者予後を規定すると考えられる癌細胞-間質細胞間相互作用を明らかにし、膵癌の治療成績の改善につながると期待される。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計6件（うち査読付論文 6件/うち国際共著 1件/うちオープンアクセス 2件）

1. 著者名 Takada K, Aizawa Y, Sano D, Okuda R, Sekine K, Ueno Y, Shoji Nakayama S, Jun Aoyama J, Sato K, Kuwahara T, Hatano T, Takahashi H, Arai Y, Nishimura G, Taniguchi H, Oridate N.	4. 巻 148
2. 論文標題 Establishment of PDX-derived salivary adenoid cystic carcinoma cell lines using organoid culture method.	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Int J Cancer .	6. 最初と最後の頁 193-202
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1002/ijc.33315.	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -
1. 著者名 Sekine K, Ogawa S, Tsuzuki S, Kobayashi T, Ikeda K, Nakanishi N, Takeuchi K, Kanai E, Otake Y, Okamoto S, Kobayashi T, Takebe T, Taniguchi H	4. 巻 10
2. 論文標題 Generation of human induced pluripotent stem cell-derived liver buds with chemically defined and animal origin-free media	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Scientific Reports	6. 最初と最後の頁 7937
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1038/s41598-020-73908-1.	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 Sekine K, Tsuzuki S, Yasui R, Kobayashi T, Ikeda K, Hamada Y, Kanai E, Camp JG, Treutlein B, Ueno Y, Okamoto S, Taniguchi H	4. 巻 10
2. 論文標題 Robust detection of undifferentiated iPSC among differentiated cells	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Scientific Reports	6. 最初と最後の頁 10293
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1038/s41598-020-66845-6.	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 Yasui R, Sekine K*, Kiyoshi Yamaguchi, Yoichi Furukawa, Taniguchi H.	4. 巻 39
2. 論文標題 Robust parameter design of human iPSC differentiation protocols defines lineage-specific induction of anterior posterior gut tube endodermal cells	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Stem Cells	6. 最初と最後の頁 429-442
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1002/stem.3326	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Sekine K	4. 巻 12
2. 論文標題 Human Organoid and Supporting Technologies for Cancer and Toxicological Research	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Front Genet.	6. 最初と最後の頁 759366
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3389/fgene.2021.759366	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Yasui R, Sekine K*, Taniguchi H	4. 巻 10
2. 論文標題 Clever Experimental Designs: Shortcuts for Better iPSC Differentiation.	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Cells	6. 最初と最後の頁 3540
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3390/cells10123540	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

〔学会発表〕 計5件 (うち招待講演 5件 / うち国際学会 3件)

1. 発表者名 Keisuke Sekine
2. 発表標題 Elucidation and control of cancer ecosystem using artificial cancer tissue.
3. 学会等名 The 79th Annual Meeting of the Japanese Cancer Association (招待講演) (国際学会)
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 Keisuke Sekine
2. 発表標題 Generation of human liver using iPSC cells for regenerative therapies
3. 学会等名 American Association for the Study of Liver Diseases(AASLD) (招待講演) (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Keisuke Sekine
2. 発表標題 Generation of functional human liver from pluripotent stem cell.
3. 学会等名 26th East Asia Joint Symposium on Biomedical Research (招待講演) (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Keisuke Sekine
2. 発表標題 Multicellular cancer organoid cultures for recapitulating cancer ecosystems
3. 学会等名 The 78th Annual Meeting of the Japanese Cancer Association (招待講演)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 関根圭輔
2. 発表標題 Recapitulating pancreatic cancer ecosystems by multicellular cancer organoid cultures based on patient-derived cancer cells
3. 学会等名 患者由来がんモデル (招待講演)
4. 発表年 2019年

〔図書〕 計1件

1. 著者名 関根圭輔	4. 発行年 2019年
2. 出版社 羊土社	5. 総ページ数 294
3. 書名 患者由来がんモデルを用いたがん研究実践ガイド、佐々木博己 / 編	

〔出願〕 計7件

産業財産権の名称 再構成癌組織を用いた薬剤評価方法	発明者 関根圭輔、谷口英樹、上野康晴、奥田諒、森永聡一郎、宮	権利者 同左
産業財産権の種類、番号 特許、PCT/JP2019/16421	出願年 2019年	国内・外国の別 外国

産業財産権の名称 上皮間葉転換関連分子を用いた癌評価法	発明者 関根圭輔、谷口英樹、上野康晴、奥田諒、森永聡一郎、宮	権利者 同左
産業財産権の種類、番号 特許、PCT/JP2019/16420	出願年 2019年	国内・外国の別 外国
産業財産権の名称 未分化細胞検出法	発明者 関根圭輔、谷口英樹、安居良太	権利者 同左
産業財産権の種類、番号 特許、特願2019-207002	出願年 2019年	国内・外国の別 国内
産業財産権の名称 未分化マーカー遺伝子高感度検出法	発明者 関根圭輔、谷口英樹、安居良太、松井貴香	権利者 同左
産業財産権の種類、番号 特許、特願2019-207004	出願年 2019年	国内・外国の別 国内
産業財産権の名称 未分化細胞の分化抵抗性評価法	発明者 関根圭輔、谷口英樹	権利者 同左
産業財産権の種類、番号 特許、PCT/JP2020/001417	出願年 2020年	国内・外国の別 外国
産業財産権の名称 多能性幹細胞からの立体臓器の構築	発明者 谷口英樹、武部貴則、関根圭輔	権利者 同左
産業財産権の種類、番号 特許、特願2019-557347	出願年 2020年	国内・外国の別 国内
産業財産権の名称 未分化細胞検出法	発明者 関根圭輔、谷口英樹	権利者 同左
産業財産権の種類、番号 特許、PCT/JP2019/23599	出願年 2019年	国内・外国の別 外国

〔取得〕 計0件

〔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
研究分担者	谷口 英樹 (Taniguchi Hideki) (70292555)	東京大学・医科学研究所・教授 (12601)	

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			
ドイツ	Max Planck Inst for Evol Anthropol			
スイス	ETH Zurich	IOB, Basel		