

令和 3 年 6 月 22 日現在

機関番号：14301

研究種目：挑戦的研究（萌芽）

研究期間：2019～2020

課題番号：19K22619

研究課題名（和文）ヒト膵がん幹細胞動態の生体「内外」ライブイメージング

研究課題名（英文）Live imaging of human pancreatic cancer stem cell dynamics

研究代表者

妹尾 浩（Seno, Hiroshi）

京都大学・医学研究科・教授

研究者番号：90335266

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）：本研究では、ヒト膵がん組織を用いた生体「内外」実験系を構築し、独自のイメージング・システムにより、DCLK1陽性ヒト膵がん幹細胞の動態を経時的に検討した。まず、ヒト膵がんオルガノイドを作成し、DCLK1-CreERTコンストラクトおよびCMV-LSL-tdTomatoレポーターコンストラクトを挿入した。これらオルガノイドおよびそこから作成したxenograftにおいて細胞系譜解析を行った。その結果、DCLK1陽性膵がん細胞がヒト膵がんにおいてもがん幹細胞としての性質を持つことが示唆された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究は、難治がんの代表であるヒト膵がんの発育進展過程を独自の生体内外モデルで可視化する試みである。膵がんのバイオロジーと新規治療法を探索する過程で、「マウスからヒトへ」さらに「ヒトにおける実用化」を視野に入れた知見を獲得し、発展させる可能性を有する。またDCLK1陽性がん細胞は、膵がん以外のヒト消化器がんにひろく存在している。そのため、将来的により普遍性の高い「消化器がん幹細胞標的療法」という新しい治療コンセプトへの道を拓く挑戦性も備えた研究と思われた。

研究成果の概要（英文）：The aim of this study was to establish in vitro and in vivo experimental systems that mimic human pancreatic cancer development process and to observe cancer "stem" cell behaviors in those systems. We established human pancreatic cancer organoids and inserted DCLK1-CreERT and CMV-LAL-tdTomato constructs to them. In these organoids and subsequently established xenografts, lineage tracing experiments showed that DCLK1-positive pancreatic cancer cells have a potential of cancer "stem" cells. Thus, DCLK1-positive pancreatic cancer cell might be a novel therapeutic target.

研究分野：腫瘍生物学

キーワード：膵臓 難治がん

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19（共通）

1．研究開始当初の背景

膵がんは罹患数と死亡数が増加の一途をたどる代表的な難治がんのひとつである。そのため、膵がんが進行する過程の経時的解析、時間軸に沿って変化を続ける膵がん進展のメカニズム、バイオロジーの解明、それらの知見に基づいた新しい治療法の解析など、解決すべき喫緊の課題は多岐にわたっている。

一般に、がん難治性の原因のひとつとして、がん幹細胞の存在が想定されている。がん幹細胞は、自己複製能と多分化能を有するとともに、多くが dormant な細胞であるために、従来広く用いられてきた抗がん剤や放射線治療に抵抗性を有するためである。研究代表者らは本申請に先立つ検討で、マウス腸腫瘍において Dclk1 陽性腫瘍幹細胞の動態を明らかにし、さらにそれらの細胞をターゲットとするがん幹細胞標的治療の有望性を示してきた。それに留まらず、研究代表者らは膵がんにおいても、Dclk1 陽性がん幹細胞から膵がん子孫細胞が供給されること、Dclk1 陽性膵がん幹細胞の排除により正常膵に障害なく膵がんが劇的に退縮することをマウスモデルで確認することができた。そこで、これらの知見をヒト膵臓がんを用いたモデルで検証する必要性を感じていた。

2．研究の目的

1．で述べた背景にもとづいて、本研究では、ヒト膵がん組織から作成した生体「内外」実験系を構築し、独自のイメージング・システムにより DCLK1 陽性ヒト膵がん幹細胞の動態を経時的に観察しようと考えた。さらに、膵がん幹細胞の排除が、ヒト膵がんの有効な治療法になりうることを示す実験環境の整備も目指した。それらの検討を通じて、DCLK1 陽性膵がん幹細胞を標的とした新規ヒト膵がん治療法開発につながる知見の獲得を目指すこととした。

3．研究の方法

本研究は、がん幹細胞からの細胞系譜解析と二光子顕微鏡を用いたライブイメージングを合体させた独自の生体「内外」ヒト膵がん実験系を用い、がん幹細胞を頂点とするヒト膵がん組織の動態を可視化するものである。そのため具体的には、以下の(1)～(3)の項目を設定し、各々について検討を行うこととした。

(1) 外科的手術または超音波内視鏡下穿刺吸引法で採取したヒト膵がん組織から、ヒト膵がんオルガノイドを作成し、DCLK1高発現オルガノイド系統を絞り込む。

(2) 上記(1)で絞り込んだヒト膵がんオルガノイド系統に、DCLK1-CreERTコンストラクトをCRISPR/Cas9技術により、CMV-LSL-tdTomatoレポーターコンストラクトをレンチウイルスにより挿入する。これら生体外ヒト膵がんオルガノイドで、細胞系譜解析と二光子顕微鏡を用い、tdTomato陽性のDCLK1陽性ヒト膵がん幹細胞が、同様にtdTomato陽性の子孫がん細胞を供給する動態を経時的に観察する。

(3) ヒト膵がん組織を模倣した新しい生体内実験系として、上記(2)で作成した細胞系譜解析可能なヒト膵がん細胞を免疫不全マウスの脇腹皮下にxenograftとして植え込む。その表面に独自に作成したイメージング・ウィンドウを設置し、ウィンドウ越しに二光子顕微鏡を用いて、間質が存在する条件下での、DCLK1陽性膵がん幹細胞からの細胞系譜解析を行う。

4．研究成果

本研究では、以下の（１）～（３）の検討を行った。

（１）すでに樹立済みのヒト膵がんオルガノイドに加え、本研究で新たに作成したヒト膵がんオルガノイドを用い、ヒト生体内と同頻度にDCLK1陽性膵がん細胞を認めるオルガノイド系統を複数絞り込み、以下の検討に使用するマテリアルを確保した。

（２）上記（１）で絞り込んだヒト膵がんオルガノイド系統に、DCLK1-CreERTコンストラクトをCRISPR/Cas9技術により、CMV-LSL-tdTomatoレポーターコンストラクトをレンチウイルスにより挿入した。それらの細胞系譜解析オルガノイドを用いて、二光子顕微鏡下にDCLK1陽性ヒト膵がん幹細胞が子孫がん細胞を供給する動態を経時的に観察することができた。

（３）さらにヒト膵がん組織を模倣した新しい生体内実験系として、免疫不全マウスの脇腹皮下に上記（２）で作成した細胞系譜解析可能なヒト膵がん細胞をxenograftとして植え込んだ。これにより、ヒト膵がん細胞は、マウス由来の繊維芽細胞、血管など、ヒト膵がんにも存在する様々な間質の細胞、組織と混在した腫瘍塊を形成した。その表面に独自に作成したイメージング・ウィンドウを設置し、ウィンドウ越しに二光子顕微鏡を用いて、タモキシフェン投与によるDCLK1陽性膵がん幹細胞からの細胞系譜を観察した。また、xenograftを摘出して腫瘍組織でも細胞系譜解析を追加した。その結果、ヒト膵がんにおいてもDCLK1陽性がん細胞から子孫がん細胞が供給されることが示され、同細胞が「膵がん幹細胞」としての性質を持つことが示唆された。

以上のように、本研究は従来行われてきたオルガノイド培養系のみでは困難であった膵がんの豊富な間質の存在を部分的とはいえ生体内で再現し、さらに3次元で細胞系譜解析を行うことに成功したものである。すなわち、xenograft内で時々刻々と変化するヒトがん幹細胞と子孫がん細胞の動態を、間質との相互作用も加味して解析することが可能となり、今後様々な利用法が考えられる。

ライブイメージング技術は勃興しつつある新興領域であるものの、同一xenograft内で時々刻々と変化するがん幹細胞動態を経時的に可視化した研究はこれまでに無く、独自のイメージング・ウィンドウを用いた本研究は新しい治療・創薬シーズの評価系として、今後の発展が期待できる萌芽的試みと考えられる。さらに、DCLK1陽性細胞は、ヒト膵がんだけでなく、胃がん、胆嚢がん、大腸がんなど、多くのヒト消化器がんにひろく存在している。そのため将来的には、より普遍性の高い、臓器横断的な「消化器がん幹細胞標的療法」という新しい治療コンセプトへの道を拓く挑戦的な展開が期待される。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計10件（うち査読付論文 10件／うち国際共著 2件／うちオープンアクセス 2件）

| | |
|--|---------------------------|
| 1. 著者名 Matsumoto Y, Nakanishi Y, Yoshioka T, Yamaga Y, Masuda T, Fukunaga Y, Sono M, Yoshikawa T, Nagao M, Araki O, Ogawa S, Goto N, Hiramatsu Y, Breyer RM, Fukuda A, Seno H. | 4. 巻 9 |
| 2. 論文標題 Epithelial EP4 plays an essential role in maintaining homeostasis in colon. | 5. 発行年 2019年 |
| 3. 雑誌名 Sci Rep. | 6. 最初と最後の頁 15244 |
| 掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1038/s41598-019-51639-2 | 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 該当する |
| 1. 著者名 Goto N, Fukuda A, Yamaga Y, Yoshikawa T, Maruno T, Maekawa H, Inamoto S, Kawada K, Sakai Y, Miyoshi H, Taketo MM, Chiba T, Seno H. | 4. 巻 116 |
| 2. 論文標題 Lineage tracing and targeting of IL17RB+ tuft cell-like human colorectal cancer stem cells. | 5. 発行年 2019年 |
| 3. 雑誌名 Proc Natl Acad Sci U S A. | 6. 最初と最後の頁 12996-13005 |
| 掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1073/pnas.1900251116 | 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 Nishikawa Y, Kodama Y, Shiokawa M, Matsumori T, Marui S, Kuriyama K, Kuwada T, Sogabe Y, Kakiuchi N, Tomono T, Mima A, Morita T, Ueda T, Tsuda M, Yamauchi Y, Sakuma Y, Ota Y, Maruno T, Uza N, Uesugi M, Kageyama R, Chiba T, Seno H. | 4. 巻 38 |
| 2. 論文標題 Hes1 plays an essential role in Kras-driven pancreatic tumorigenesis. | 5. 発行年 2019年 |
| 3. 雑誌名 Oncogene. | 6. 最初と最後の頁 4283-4296 |
| 掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1038/s41388-019-0718-5 | 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 Yoshioka T, Fukuda A, Araki O, Ogawa S, Hanyu Y, Matsumoto Y, Yamaga Y, Nakanishi Y, Kawada K, Sakai Y, Chiba T, Seno H. | 4. 巻 248 |
| 2. 論文標題 Bmi1 marks gastric stem cells located in the isthmus in mice. | 5. 発行年 2019年 |
| 3. 雑誌名 J Pathol. | 6. 最初と最後の頁 179-190 |
| 掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1002/path.5244 | 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 Yamauchi Y, Kodama Y, Shiokawa M, Kakiuchi N, Marui S, Kuwada T, Sogabe Y, Tomono T, Mima A, Morita T, Matsumori T, Ueda T, Tsuda M, Nishikawa Y, Kuriyama K, Sakuma Y, Ota Y, Maruno T, Uza N, Masuda A, Tatsuoka H, Yabe D, Minamiguchi S, Masui T, Inagaki N, Uemoto S, Chiba T, Seno H | 4. 巻 80 |
| 2. 論文標題 Rb and p53 execute distinct roles in the development of pancreatic neuroendocrine tumors. | 5. 発行年 2020年 |
| 3. 雑誌名 Cancer Res | 6. 最初と最後の頁 3620-3630 |
| 掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1158/0008-5472.CAN-19-2232 | 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 Morita T, Kodama Y, Shiokawa M, Kuriyama K, Marui S, Kuwada T, Sogabe Y, Matsumori T, Kakiuchi N, Tomono T, Mima A, Ueda T, Tsuda M, Yamauchi Y, Nishikawa Y, Sakuma Y, Ota Y, Maruno T, Uza N, Nagasawa T, Chiba T, Seno H | 4. 巻 80 |
| 2. 論文標題 CXCR4 in tumor epithelial cells mediates desmoplastic reaction in pancreatic ductal adenocarcinoma. | 5. 発行年 2020年 |
| 3. 雑誌名 Cancer Res | 6. 最初と最後の頁 4058-4070 |
| 掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1158/0008-5472.CAN-19-2745 | 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 Utsumi T, Horimatsu T, Nishikawa Y, Teramoto A, Hirata D, Iwatate M, Sano Y, Seno H. | 4. 巻 32 |
| 2. 論文標題 Short educational video to improve the accuracy of colorectal polyp size estimation: Multicenter prospective study. | 5. 発行年 2020年 |
| 3. 雑誌名 Dig Endosc | 6. 最初と最後の頁 1074-1081 |
| 掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1111/den.13638 | 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 Matsumori T, Kodama Y, Takai A, Shiokawa M, Nishikawa Y, Matsumoto T, Takeda H, Marui S, Okada H, Hirano T, Kuwada T, Sogabe Y, Kakiuchi N, Tomono T, Mima A, Morita T, Ueda T, Tsuda M, Yamauchi Y, Kuriyama K, Sakuma Y, Ota Y, Maruno T, Uza N, Marusawa H, Kageyama R, Chiba T, Seno H | 4. 巻 80 |
| 2. 論文標題 Hes1 is essential in proliferating ductal cell-mediated development of intrahepatic cholangiocarcinoma. | 5. 発行年 2020年 |
| 3. 雑誌名 Cancer Res | 6. 最初と最後の頁 5305-5316 |
| 掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1158/0008-5472.CAN-20-1161 | 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 Tsuda M, Fukuda A, Kawai M, Araki O, Seno H. | 4. 巻 112 |
| 2. 論文標題 The role of the SWI/SNF chromatin remodeling complex in pancreatic ductal adenocarcinoma. | 5. 発行年 2021年 |
| 3. 雑誌名 Cancer Sci | 6. 最初と最後の頁 490-497 |
| 掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1111/cas.14768 | 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 Maruno T, Fukuda A, Goto N, Tsuda M, Ikuta K, Hiramatsu Y, Ogawa S, Nakanishi Y, Yamaga Y, Yoshioka T, Takaori K, Uemoto S, Saur D, Chiba T, Seno H | 4. 巻 10 |
| 2. 論文標題 Visualization of stem cell activity in pancreatic cancer expansion by direct lineage tracing with live imaging. | 5. 発行年 2021年 |
| 3. 雑誌名 Elife | 6. 最初と最後の頁 e55117 |
| 掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.7554/eLife.55117 | 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10件 (うち招待講演 1件 / うち国際学会 1件)

| |
|--|
| 1. 発表者名 妹尾浩、後藤規弘、福田晃久 |
| 2. 発表標題 The role of tuft cell-like tumor/cancer cells in intestinal tumors. |
| 3. 学会等名 第78回日本癌学会総会 (招待講演) |
| 4. 発表年 2019年 |

| |
|--|
| 1. 発表者名 Makoto Sono, Akihisa Fukuda, Motoyuki Tsuda, Hiroshi Seno |
| 2. 発表標題 Bmi1 is required for pancreatic cancer formation through regulating PI3K/AKT pathway in mice. |
| 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 長尾宗政、福田晃久、尾松万悠紀、並川実桜、園誠、福永裕一、益田朋典、荒木理、吉川貴章、小川智、平松由紀子、津田喬之、丸野貴久、中西祐貴、妹尾浩 |
| 2. 発表標題 KrasおよびWntシグナルは幽門腺型胆嚢腺腫BiiINの形成に重要である |
| 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 Makoto Sono, Akihisa Fukuda, Motoyuki Tsuda, Hiroshi Seno |
| 2. 発表標題 Bmi1 is required for pancreatic cancer formation through regulating PI3K/AKT pathway in mice. |
| 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 長尾宗政、福田晃久、尾松万悠紀、並川実桜、園誠、福永裕一、益田朋典、荒木理、吉川貴章、小川智、平松由紀子、津田喬之、丸野貴久、中西祐貴、妹尾浩 |
| 2. 発表標題 KrasおよびWntシグナルは幽門腺型胆嚢腺腫BiiINの形成に重要である |
| 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 Osamu Araki, Akihisa Fukuda, Motoyuki Tsuda, Hiroshi Seno |
| 2. 発表標題 Brg1, a subunit of the SWI/SNF complex, is critical for growth and metastasis of pancreatic cancer cells in mice. |
| 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 Satoshi Ogawa, Akihisa Fukuda, Araki Osamu, Munemasa Nagao, Takaaki Yoshikawa, Yukiko Hiramatsu, Motoyuki Tsuda, Takahisa Maruno, Yuki Nakanishi, Hiroshi Seno |
| 2. 発表標題 Setdb1 deletion protects against formation of pancreatic ductal adenocarcinoma by inducing p53-mediated apoptosis. |
| 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 Takaaki Yoshikawa, Akihisa Fukuda, Hiroshi Seno |
| 2. 発表標題 Intestinal tumor stem cell specific ablation of Brg1 resulted in reduction of intestinal tumors with increased apoptosis. |
| 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 長尾宗政、福田晃久、妹尾浩 |
| 2. 発表標題 KrasおよびWntシグナルは幽門腺型胆嚢腺腫，幽門腺形質をもつBillINの形成に重要である |
| 3. 学会等名 第28回日本消化器関連学会週間 |
| 4. 発表年 2020年 |

| |
|---|
| 1. 発表者名 Satoshi Ogawa, Akihisa Fukuda, Araki Osamu, Munemasa Nagao, Takaaki Yoshikawa, Yukiko Hiramatsu, Motoyuki Tsuda, Takahisa Maruno, Yuki Nakanishi, Hiroshi Seno |
| 2. 発表標題 SETDB1 IS REQUIRED FOR FORMATION OF PANCREATIC DUCTAL ADENOCARCINOMA BY INHIBITING APOPTOSIS THROUGH REGULATION OF P53 EXPRESSION. |
| 3. 学会等名 51st Annual Meeting of the American Pancreatic Association (国際学会) |
| 4. 発表年 2020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 | | | |
|---------|---------------|--|--|--|
| ドイツ | DKFZ and DKTK | | | |