

令和 5 年 6 月 22 日現在

機関番号：15501

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2020～2022

課題番号：20K08956

研究課題名(和文) 血中循環腫瘍細胞由来のオルガノイドを応用した転移性膵がんに対する新規免疫療法開発

研究課題名(英文) Development of new immunotherapy for metastatic pancreatic cancer by applying organoids derived from circulating tumor cells in blood.

研究代表者

田邊 剛 (Tanabe, Tsuyoshi)

山口大学・大学院医学系研究科・教授

研究者番号：80260678

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,300,000円

研究成果の概要(和文)：本研究では、転移巣モデルとして血中循環腫瘍細胞(CTC)からオルガノイドを作製し、それを標的に免疫療法を開発して転移の治療に応用するという独自の着想のもとに以下の研究を進めた。(1) CTCからのオルガノイド樹立が困難であったため、マウス膵がんモデルから樹立した膵がんオルガノイドをマウスに移植し、転移モデルを確立した。(2) 初期転移巣で発現される遺伝子を同定するため、全ての免疫細胞の種類をシングルセルレベルで同定できる空間的シングルセル解析法を用いた方法を樹立した。(3) CTCオルガノイドと末梢血を共培養し、膵がんに特異的に反応するリンパ球の誘導に成功した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

膵がんは早期転移のため5年生存率は、全がんのなかで最低の12%であり、転移の治療法は確立していない。免疫療法は有力な治療候補であるが、何を標的に免疫を誘導するかが問題となる。本研究において樹立した解析系により、転移巣初期形成過程で発現する遺伝子をシングルセルRNAシーケンスで同定し、免疫治療の標的にできると考えられる。転移巣初期形成過程に特異的に発現する遺伝子は、膵臓がんの患者間で共通の可能性もある。そのような分子を標的にした抗体医薬や、CAR-T細胞は、膵がんの転移を抑制することが期待できる。

研究成果の概要(英文)：In this study, we conducted the following studies based on the original conception of producing organoids from circulating tumor cells (CTCs) in the blood as a model of metastases and developing immunotherapy targeting them for the treatment of metastases.

(1) Since it was difficult to establish organoids from CTCs, we transplanted pancreatic cancer organoids established from a mouse pancreatic cancer model into mice and established a metastasis model. (2) To identify genes expressed in early metastases, we established a method using a spatial single-cell analysis method that can identify all immune cell types at the single-cell level. (3) Co-cultured CTC organoids with peripheral blood and successfully induced lymphocytes that specifically respond to pancreatic cancer.

研究分野：疫学、免疫学、生化学

キーワード：膵がん オルガノイド

1. 研究開始当初の背景

(1) 膵がんの生存率向上には、転移巣に対する抗腫瘍免疫能を高める治療法の開発が必要である。

膵がんは早期に転移するため、発見時に手術が可能な例は2割であり、5年生存率は12.5%と予後不良である。このため転移が認められない早期の例でも、転移を抑制する治療が必要となる。膵がんは化学療法や放射線療法に対する応答性が低いため、免疫療法が候補となる。

近年、免疫チェックポイント阻害剤の有効性が多くのがんで報告されている。しかし、膵がんは遺伝子変異が少ないために免疫原性が低く、T細胞の浸潤も乏しいため、免疫チェックポイント阻害剤の有効性が低い。膵がんの予後の改善のためには、転移巣に対する抗腫瘍免疫能を高める治療法の開発が必須である。

(2) CTCは転移の基となるがん幹細胞は数が少なく治療法開発への応用は限られていた

がん転移の免疫療法を開発する際、何を標的に免疫を誘導するかが問題となる。我々はこれまで肝がんについて、血中のがん組織を利用するリキッドバイオプシーの手法により早期診断法開発を進めてきた(2017-19年度科研費基盤C代表)。リキッドバイオプシーの対象の1つである血中循環腫瘍細胞(CTC: circulating tumor cell)は原発巣から血中に遊離し、転移巣を形成するがん幹細胞として機能する。そこで我々は、このCTCに対して有効な免疫療法を開発することにより、膵がん転移に対する効果的な治療を樹立できると着想した。CTCは採血により、バイオプシーよりも低い侵襲性で頻回に採取できるという利点がある。しかし得られるCTCは非常に少数であるため(数個/10ml血液)、CTCに対するがん免疫の誘導や治療効果判定への応用が困難であった。

2. 研究の目的

膵がんは早期に転移し、免疫治療に抵抗性を示す。このような特徴を持つ膵がんを克服するため、本研究の目的は、CTC由来オルガノイドを転移巣モデルとして活用することで、がん転移に対する革新的がん免疫療法を確立することである。具体的には、[1] CTCオルガノイドによる転移巣モデルを構築し、治療法開発と効果判定への有用性を検証する。[2] CTCオルガノイド特異的キラーT細胞を誘導し、転移に対する免疫細胞療法を樹立する。[3] CTCオルガノイドに発現するネオ抗原を同定し、転移に対する新規ペプチド免疫療法を確立する。

3. 研究の方法

CTCオルガノイドを転移巣モデルとして活用し、がん転移に対する免疫療法を確立する。オルガノイドは三次元培養で作製される立体臓器であり、基になった細胞の組織学的遺伝子的特性を維持するため、創薬や治療効果判定に応用されている。我々はこれまでに膵がん原発巣や大腸がん原発巣からオルガノイドを作製し、腫瘍微小環境の解析を進めている[2019-20年度科研費挑戦的研究(萌芽)]。この手法を応用して、CTCからオルガノイドを作製すれば、転移巣モデルとして活用できると想定した。

CTCオルガノイドの利点は、CTCは頻回に採取できるため、転移巣形成前後や治療前後の様々な段階で作製することが可能な点であり、転移を抑制する治療法の開発に応用できる。したがって、このCTCオルガノイドを殺傷するキラーT細胞の樹立や、CTCオルガノイドに発現するネオ抗原の同定により、転移巣に対する抗腫瘍活性を高めることが可能になると考えた。

このように、CTCオルガノイドは転移に対する新規治療法を評価する系として応用する。

そこで、血中CTCからオルガノイドを作製し、これを膵がん転移巣モデルとして、殺傷能の高いキラーT細胞を誘導する。さらに、CTCオルガノイドに発現する転移性膵がん特異的ネオ抗原を同定することにより、新規がん免疫療法の確立までを行う。

(1) CTCオルガノイドによる転移巣モデルの構築時計治療法開発と効果判定への有用性の検証

CTCオルガノイドの作製：膵がん症例の末梢血からCTCを分離し、我々が確立したオルガノイド作製条件（膵がんおよび大腸がん原発巣、前立腺がん尿中CTC等）で培養する。

CTCオルガノイドの転移モデルとしての有用性の検証：(1) で作製したCTCオルガノイドについて、治療効果に影響する因子（上皮間葉転換や細胞周期の関連遺伝子発現、抗がん剤への応答性）を解析する。さらに、免疫チェックポイント阻害剤の効果に影響する因子（PDL-1や2ミクログロブリンの遺伝子発現量、HLAのヘテロ接合性、遺伝子変異量等）を解析し、治療効果判定への有用性を検証する。

膵がん転移モデル動物の作成：CTCオルガノイドを免疫不全マウスに移植し、生着を確認する。

(2) CTCオルガノイド特異的キラーT細胞を誘導による転移巣に対する免疫細胞療法の樹立

CTCオルガノイド反応性リンパ球の増殖法の検証：CTCオルガノイド培養上清にIFN- γ を加え、がん抗原提示を増加させる。続いて、末梢血単核球との共培養を、IL-2添加抗CD28抗体固相化プレートで行い、リンパ球が十分に増殖する培養条件を明らかにする。

CTCオルガノイド特異的キラーT細胞の増殖法の検証：共培養後のリンパ球について、IFN- γ の産生量と、キラーT細胞の脱顆粒マーカーCD107aの発現量を解析し、細胞障害性キラーT細胞が高い頻度で得られる培養条件を明らかにする。

キラーT細胞のがん退縮能の検証：(2) で得られたキラーT細胞について、CTCオルガノイドに対する細胞障害活性を確認する。さらにin vivoでの効果判定として、(1) で作成した膵がん転移モデルマウスに静注した後、移植したCTCオルガノイドの体積および重量の変化を解析することにより、キラーT細胞の腫瘍退縮能を明らかにする。

(3) CTCオルガノイドからのネオ抗原同定による転移巣に対する新規ペプチド免疫療法の確立

CTCオルガノイドに特異的発現するRNAの選択：CTCオルガノイドと膵がん切除例非がん部組織についてRNA seqを行い、解析結果を比較してがん特異的RNAを選抜する。コンピューター上で3フレーム翻訳を行い、タンパクデータベースを得る。

がん細胞表面に提示されるペプチドの同定：CTCオルガノイドと膵がん切除例非がん部組織について、酸処理あるいは免疫沈降によって細胞表面ペプチドを回収し、質量分析法（LCMS/MS）により同定する。

ウェット及びドライ解析による膵がん特異的抗原の同定：(3) で得られた質量データを(3) で作成した膵がん特異的タンパクデータベースで検索し、MHC-I結合ペプチドの同定を行う。

4. 研究成果

膵がんは早期転移のため5年生存率は12.5%であり全がんで最低である。転移の治療法は確立しておらず、免疫療法は有力な治療法候補であるが、何を標的に免疫を誘導するかが問題となる。我々はリキッドバイオプシーによるがん早期診断法開発を進めており、血中循環腫瘍細胞(CTC)は原発巣から血中に遊離し転移巣を形成する。本研究では、転移巣モデルとして

CTC からオルガノイドに作製し、それを標的に免疫療法を開発して転移の治療に応用するという独自の着想から研究を進めた。

(1) 膵がん転移モデルの樹立

まず、転移モデル作製を目的として、ヒト膵がんおよび、KTC膵がんモデルマウスのCTCの両方を用いてオルガノイドの条件検討を重ねたが、樹立が困難であった。そこで代わりに、KTCマウス膵がんモデルから樹立した膵がんオルガノイドを用いた。マウスに移植した膵がんオルガノイドは生着し転移がみられた。

(2) CTC オルガノイド特異的キラーT 細胞誘導法の確立

マウス膵がんオルガノイドを、末梢血と共培養し膵臓がんの特異的に反応するリンパ球の誘導を行った。さまざまな培養条件の検討により、膵臓がん特異的リンパ球の誘導ができた。共培養7日で、CD8陽性のキラーT細胞が増加し、活性化マーカーCD69の増加から、活性化が起こっていると考えられた。より詳細なリンパ球のマーカー解析が進行中である。興味深いことに、共培養に用いる末梢血としては、正常より、担がんマウス由来の末梢血の方が、膵臓がん特異的リンパ球の誘導の効率が高かったことから、担がんマウスでは、膵臓がん特異的リンパ球のプライミングが起こっていると考えられた。しかし、キラーT細胞誘導の再現性が安定しなかった。

CTC オルガノイド作成の困難は、血中の多数の CTC のうち、転移先で増殖し転移巣を形成するのは稀であることを反映している可能性がある。そこで、CTC 全体ではなく、CTC のうち初期転移巣を形成したものを標的とする着想を得た。転移巣形成に必要な遺伝子が同定できれば、CTC を用いた転移の可能性の診断にも役立つ。そこで、2つの解析系を構築した。

(3) 転移初期細胞同定系の確立

これまでの解析から、転移がん細胞を標的にした免疫療法を開発するために、初期転移巣を同定するアプローチを取るとの着想を得た。そのために、マウス膵がんオルガノイドから樹立した膵がんオルガノイドのマウスへの移植により転移モデルを確立し、初期転移巣の2つの同定法を樹立した。

初期転移巣同定のための空間的シングルセル解析系の樹立

初期転移巣で発現される遺伝子を同定するために、実際のがん組織でキラーT 細胞だけでなく全ての免疫細胞の種類をシングルセルレベルで同定できる空間的シングルセル解析法を樹立した。初期転移巣が同定できれば、それらの細胞を切り出しトランスクリプトーム解析により、neo-antigen が同定できる可能性がある。

空間的シングルセルプロテオームシステムである Hyperion 装置の導入を検討したが、解析できる組織の範囲が狭いなどの問題があった。そこで、Akoya 社の Phenocycler 機器を導入し、前立腺がんの去勢療法前後の標本を用いて、がんへの浸潤免疫細胞の空間的シングルセル解析法を確立した。

初期転移巣同定のための長期ミニ臓器培養系の樹立

樹立した転移形成マウス解析系で転移巣形成初期過程の解析が困難であった。そこで、オルガノイド細胞を用いて1か月にわたり転移巣形成過程をライブイメージングで追跡できるミニ臓器培養系の樹立を進めている。オルガノイドは5日程度しか培養できないために、転移巣形成過程のイメージングには適さない。

そこで、Lutolf らの報告を参考にして、小腸の間質の硬さと小腸陰窩の形を付与したマトリゲルに、小腸オルガノイドを播種すると、管腔を持ち再生が起こるため1ヶ月の長期培養ができるミニ腸管培養系を樹立した。これに免疫細胞を持たせるために、人工毛細血管を導入した。

これにより、血管と免疫細胞をもつミニ腸管で、蛍光標識した膵がんオルガノイド細胞が転移巣を形成する初期過程をライブイメージングにより観察できると考えられる。本解析系で、転移巣の初期形成過程で発現する遺伝子の同定し、免疫治療の標的にできると期待できる。

結語

本研究の目的であるがん転移を標的にした免疫治療法開発のために、当初は転移能を持つと考えられる CTC 細胞を用いて免疫治療の標的分子の同定を試みた。しかし、キラーT細胞誘発の再現性が低かった。それは、CTC 細胞の中で、転移を起こす細胞の割合が低いためと考えられた。

そこで、実際に転移を起こしつつある細胞を同定し、標的分子を同定するアプローチを取るアプローチを取った。(1)膵がんの転移形成マウス解析系を確立し、(2)本マウスで初期転移形成細胞を同定するための、空間的シングルセル解析系を樹立した。更に、リアルタイムに培養系で初期転移形成細胞を同定するために、(3)初期転移巣同定のためのミニ腸管培養系を樹立した。本解析系で、転移巣初期形成過程で発現する遺伝子をシングルセル RNA シーケンスにより同定し、免疫治療の標的にできると考えられる。転移巣初期形成過程に特異的に発現する遺伝子は、膵臓がんの患者間で共通の可能性もある。そのような分子を標的にした抗体医薬や、CAR-T 細胞は、膵がんの転移を抑制することが期待できる。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計13件（うち査読付論文 13件／うち国際共著 0件／うちオープンアクセス 9件）

1. 著者名 Takahashi Ken, Takahashi Hideyuki, Furuichi Takuya, Toyota Masatsugu, Furutani-Seiki Makoto, Kobayashi Takeshi, Watanabe-Takano Haruko, Shinohara Masahiro, Numaga-Tomita Takuro, Sakaue-Sawano Asako, Miyawaki Atsushi, Naruse Keiji	4. 巻 7
2. 論文標題 Gravity sensing in plant and animal cells	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 npj Microgravity	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1038/s41526-020-00130-8	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 Fujiwara Yasuhiro, Tsunedomi Ryouichi, Yoshimura Kiyoshi, Matsukuma Satoshi, Fujiwara Nobuyuki, Nishiyama Mitsuo, Kanekiyo Shinsuke, Matsui Hiroto, Shindo Yoshitaro, Tokumitsu Yukio, Yoshida Shin, Iida Michihisa, Suzuki Nobuaki, Takeda Shigeru, Ioka Tatsuya, Hazama Shoichi, Nagano Hiroaki	4. 巻 50
2. 論文標題 Pancreatic Cancer Stem-Like Cells With High Calreticulin Expression Associated With Immune Surveillance	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Pancreas	6. 最初と最後の頁 405 ~ 413
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1097/MPA.0000000000001772	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 Shibata Kensuke, Motozono Chihiro, Nagae Masamichi, Shimizu Takashi, Ishikawa Eri, Motooka Daisuke, Okuzaki Daisuke, Izumi Yoshihiro, Takahashi Masatomo, Fujimori Nao, Wing James B., Hayano Takahide, Asai Yoshiyuki, Bamba Takeshi, Ogawa Yoshihiro, Furutani-Seiki Makoto, Shirai Mutsunori, Yamasaki Sho	4. 巻 13
2. 論文標題 Symbiotic bacteria-dependent expansion of MR1-reactive T cells causes autoimmunity in the absence of Bcl11b	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Nature Communications	6. 最初と最後の頁 6948
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1038/s41467-022-34802-8	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 D'Angelo Alberto, Shibata Kensuke, Tokunaga Masayuki, Furutani-Seiki Makoto, Bagby Stefan	4. 巻 32
2. 論文標題 Generation of murine tumour-reactive T cells by co-culturing murine pancreatic cancer organoids and peripheral blood lymphocytes	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Biochemistry and Biophysics Reports	6. 最初と最後の頁 101365 ~ 101365
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.bbrep.2022.101365	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 Nakagami Yuki, Hazama Shoichi, Suzuki Nobuaki, Yoshida Shin, Tomochika Shinobu, Matsui Hiroto, Shindo Yoshitaro, Tokumitsu Yukio, Matsukuma Satoshi, Watanabe Yusaku, Iida Michihisa, Tsunedomi Ryouichi, Takeda Shigeru, Tanabe Tsuyoshi, Ueno Tomio, Nagano Hiroaki	4. 巻 22
2. 論文標題 CD4 and FOXP3 as predictive markers for the recurrence of T3/T4a stage II colorectal cancer: applying a novel discrete Bayes decision rule	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 BMC Cancer	6. 最初と最後の頁 1071
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1186/s12885-022-10181-7	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 -

〔学会発表〕 計0件

〔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
研究分担者	浅井 義之 (Asai Yoshiyuki) (00415639)	山口大学・大学院医学系研究科・教授 (15501)	
研究分担者	山口 奈津 (Yamaguchi Natsu) (40450671)	山口大学・大学院医学系研究科・助教 (15501)	
研究分担者	清木 誠 (Seiki Makoto) (50226619)	山口大学・大学院医学系研究科・教授 (15501)	
研究分担者	碓 彰一 (Hazama Shoichi) (50253159)	山口大学・医学部・特別医学研究員 (15501)	

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