

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

令和 6 年 5 月 28 日現在

機関番号：13301

研究種目：若手研究

研究期間：2020～2023

課題番号：20K17044

研究課題名（和文）がん免疫療法研究に寄与する革新的な肝胆膵がん免疫系ヒト化マウスモデルの開発

研究課題名（英文）Development of innovative humanized mouse models for immuno-oncology research of hepatobiliary and pancreatic cancer

研究代表者

丹尾 幸樹（Nio, Kouki）

金沢大学・附属病院・助教

研究者番号：80807397

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,200,000円

研究成果の概要（和文）：8種類の肝胆膵がん由来PDXモデルを作製した。その内2種類の新たな膵がん細胞株を樹立した。腹水中の膵がん細胞を由来とする細胞株は皮下腫瘍の他に腹膜播種モデルとしても使用可能であった。PDXモデルが作製し得た2症例の末梢血液からiPS細胞を樹立し、培養皿上で造血幹細胞への分化誘導を行った。iPS細胞由来造血幹細胞の移植による肝胆膵がん免疫系ヒト化マウスモデルの確立は期間内に達成できなかったが、がん免疫研究のプラットフォームとなる新規肝がんシンジェニックマウスモデルを開発した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

肝胆膵がんに対する薬物治療効果は未だ十分ではなく、免疫チェックポイント阻害剤などがん免疫療法にかかる期待は大きい。そのため、がん免疫療法の効果を正しく評価できる実験動物モデル開発が必要と考えられている。研究期間内には同一患者を由来とするがん検体と免疫細胞を有するがん免疫系ヒト化モデルの確立は達成し得なかったものの、将来の作製資源となる数種類のPDXモデルの作製ならびに同一患者からのiPS細胞樹立を行った。さらには造血幹細胞分化誘導の知見を得た。また、がん免疫研究のプラットフォームとして新規肝がんシンジェニックマウスモデルを開発した。本モデルは今後のがん免疫研究に有用なモデルとして期待される。

研究成果の概要（英文）：Eight PDX models from hepatobiliary and pancreatic cancer tissues were created. From two of these, new pancreatic cancer cell lines were established. A cell line derived from pancreatic cancer cells in ascites was usable not only for subcutaneous tumors but also as a peritoneal dissemination model. From the peripheral blood of two of the eight PDX models, iPS cells were established, and differentiation into CD34-positive hematopoietic stem cells was induced in culture dishes. Although we could not develop a humanized mouse model of the immune system for hepatobiliary and pancreatic cancer through the transplantation of iPS cell-derived hematopoietic stem cells within the study period, we developed a novel syngeneic mouse model of liver cancer that serves as a platform for immuno-oncology research.

研究分野：肝胆膵がん

キーワード：肝胆膵がん がん免疫療法 ヒト化マウス PDXマウスモデル iPS細胞 シンジェニックマウスモデル

## 1. 研究開始当初の背景

わが国の主要な疾患であり、死因の第1位を占める悪性腫瘍(がん)の中で消化器がんは最も多いがん腫である。消化器がんの中でも、肝胆膵がんは特に予後不良ながん種であり、有効な治療法の開発が求められている。我々はこれまで、肝がんに対する新たな治療法の開発を行うために肝がん切除検体を免疫不全マウスに移植する患者腫瘍組織移植(Patient-derived xenograft: PDX)モデルを樹立し、肝がんに対する新規治療法の効果検討に用いてきた。一方、近年がん治療において注目を集めるがん免疫療法は、肝胆膵がん領域においてもその効果が期待されている。しかしながら、これまでのPDXマウスモデルはヒトの免疫機構を有していないため、がん免疫療法の治療評価には使用できなかった。そのため、ヒトのがんと免疫機能を同時に有し、がん免疫療法の治療効果を正しく評価する事が可能な新たな動物モデル開発が必要と考えられた。

ヒト免疫機構をマウスに再現する免疫系ヒト化マウス(ヒト化マウス)は、胎児肝や臍帯血から分離された造血幹細胞を、新生仔期の免疫不全マウスに移植することで作製され、特にヒト先天性免疫不全症などの免疫疾患やウイルス感染の研究および治療開発の分野で、実験動物モデルとして重用されている。我々は以前にヒトの造血幹細胞ならびに肝前駆細胞を移植したヒト化肝キメラマウスを作製し、ウイルス肝炎の病態研究に用いてきた(Bility MT, Nio K, et al. Sci Rep. 2016 Dec 21; 6: 39520.)。現在、ヒトのがん免疫研究に応用可能なモデルとして、ヒト化マウスにPDX腫瘍細胞を移植したモデルが作製されている(Onco-Hu® models; Jackson Laboratory, USA)。このモデルでは、マウス生体内にヒトがん細胞と免疫システムが共有している事から、免疫チェックポイント阻害剤の評価に使用されている(Wang et al. FASEB J. 2018 Mar 9.)ものの、別固体から採取された造血幹細胞とがん細胞を用いているために、HLA不一致等の問題により、患者固有のがん免疫環境を完全に再現し得ないと考えられる。他方、同一患者検体を用いたがん免疫マウスモデルとして、PDXマウス作製後に同一患者の末梢血単核細胞(PBMC)を移植するモデルが考えられるが、このモデルでは成熟した機能的なヒトリンパ球の生着により容易にgraft-versus host disease (GVHD)を発症するため、ごく短期間しか研究応用できないという問題を有している。

## 2. 研究の目的

本研究では、これまでのPDXマウスやヒト化マウス作製や応用研究の実績を活かし、さらに既存のがん免疫系ヒト化モデルの問題を解決するために、同一患者のがん検体と血液細胞由来iPS細胞を用い、革新的な肝胆膵がん免疫系ヒト化マウスモデルを確立することを目的とした。また、ヒト化マウスの確立は挑戦的課題であり、同時にがん免疫研究に有用な肝がんシンジェニックマウスモデルの樹立も行うことを目的とした。

## 3. 研究の方法

1. 肝胆膵がん患者検体を用いたPDXマウスモデルの作製: 肝胆膵がん患者の腫瘍生検検体や超音波内視鏡下針生検(EUS-FNA)検体、腹水検体の内、診断用以外の余剰検体を回収し、速やかに免疫不全マウスに移植しPDXモデルを作成する。
2. がん患者由来iPS細胞からの造血幹細胞作製: PDXモデル樹立が可能であった同一肝胆膵がん患者の血液検体より分離したPBMCからiPS細胞作製キット(Cytotune®-iPS)を用いiPS細胞を作製する。iPS細胞を低接着ディッシュ上で播種・培養し、胚様体を作製する。作製された胚様体をマウスストローマ細胞株であるOP9細胞と共培養し、CD34陽性造血幹細胞へ分化誘導する。
3. マウスへの造血幹細胞移植ならびに生着効率確認: CD34陽性造血幹細胞を、ブスルファンにより骨髄抑制された4-6週の免疫不全マウスに対し経静脈的に移植する。移植後にマウス血液を採取し、血液中のヒト免疫細胞分画をフローサイトメーターにて確認する。
4. 肝がんシンジェニックマウスモデル作製: AlbプロモーターヒトPDGF-CトランスジェニックマウスとAlb-cre/Trp53<sup>fllox/fllox</sup>マウスを交配させることにより、肝臓特異的ヒトPDGF-CトランスジェニックおよびTrp53ノックアウトマウスを作成する。マウスに発生する肝腫瘍組織から、gentle MACS™ Dissociator (Miltenyi Biotec)およびMouse Tumor Dissociation Kit (130-096-730, Miltenyi Biotec)を使用して腫瘍細胞を単離する。培養ディッシュにて培養・継代ならびにNOD-SCIDマウスでの継代を経て、細胞株化を行う。株化した細胞100万個をC57BL/6Jマウスに移植して肝がんシンジェニックモデルを作製する。

## 4. 研究成果

本研究で我々は以下の知見を得た。

1. 肝胆膵がん患者検体を用いた PDX マウスモデルの作製  
本研究への参加同意を取得した肝胆膵がん患者 13 名から腫瘍生検もしくは EUS-FNA、腹水採取によりがん組織を取得した。腫瘍生検後の肝がん検体はコラーゲン処理を行った後に、EUS-FNA により取得した膵がん組織はコラーゲン処理を行わず速やかにマウス皮下へ移植した。その結果、13 症例中 8 症例で腫瘍が生着し、移植成功率は 61.5%と高率であった。生着した 8 腫瘍はいずれもマウスでの継代が可能であり、その内 2 腫瘍は細胞株化が可能であった。腹水中のがん細胞を由来とする細胞株は皮下のみならず腹腔内にも生着可能で腹膜播種モデルとしても使用可能な細胞株であった。
2. がん患者由来 iPS 細胞からの造血幹細胞作製  
PDX マウスモデルが確立できた 8 症例の内、3 症例の末梢血液から iPS 細胞の作製を試みた結果、2 症例で iPS 細胞の樹立が可能であった。樹立した iPS 細胞をマウス間質細胞株である OP9 と共培養し作製されたスフェロイド内のヒト CD34 陽性細胞の発現割合をフローサイトメトリーで解析した結果、全体の 9%程度が CD34 陽性細胞であり、造血幹細胞への分化誘導が示唆された。
3. マウスへの造血幹細胞移植ならびに生着効率確認  
CD34 陽性細胞集団を MACS にて回収し、化学的に骨髄機能を抑制した免疫抑制マウスの尾静脈内から移植した。移植後 6 週の時点でマウス尾静脈から採血を行い、ヒト免疫細胞の有無をフローサイトメトリーで解析したがヒト免疫細胞の存在は確認できなかった。そのため別の移植方法として、分化誘導前のヒト iPS 細胞と OP9 細胞を同時に皮下移植しマウス生体内での造血幹細胞～免疫細胞分化を試みた。しかしながら、この実験手法でも移植後 6 週の時点でマウス末梢血にヒト免疫細胞の存在は確認できなかった。  
そこで、別の膵がん患者リンパ球から樹立した iPS 細胞を用い、iPS 細胞のマウス骨髄内への移植による生着と血液細胞分化の有無を確認した。まず、樹立した未分化の iPS 細胞を、化学的に骨髄機能を抑制した免疫抑制マウスの腓骨髄内に移植した。移植後 6 週以降、経時的にマウス尾静脈から採血を行い、マウス血中のヒト免疫細胞の有無をフローサイトメトリーで解析したが、残念ながらヒト免疫細胞の存在は確認できなかった。
4. 肝がんシンジェニックマウスモデル作製ならびにがん免疫療法評価  
がん免疫研究に有用な肝がんシンジェニックマウスモデルの樹立を試みた。肝臓特異的ヒト PDGF-C トランスジェニックおよび Trp53 ノックアウトマウス肝に発生した肝腫瘍からディッシュ上の培養継代ならびに NOD-SCID マウスでの継代を経て、マウス肝がん細胞株を樹立した。樹立したマウス肝がん細胞 100 万個を C57BL/6J マウスに移植し肝がんシンジェニックモデルを作製した。本モデルは肝細胞がん臨床応用されている複合がん免疫療法である抗 PD-L1 抗体ならびに抗 VEGFA 抗体の併用療法の治療効果評価が可能であった。

以上のように、研究目的であった同一患者のがん検体と血液細胞由来 iPS 細胞を用いた肝胆膵がん免疫系ヒト化マウスモデルの確立は、本研究期間内には達成できなかった。特に、iPS 細胞由来造血幹細胞をマウス体内へ生着させることができなかった点が大きな課題であった。一方、将来的なモデル作製の重要な資源となる数種類の PDX モデルの作製ならびに同一患者からの iPS 細胞樹立を行った。さらには造血幹細胞分化誘導の知見を得た。他方、がん免疫研究のプラットフォームとして新規肝がんシンジェニックマウスモデルを開発した。本モデルは今後のがん免疫研究に有用なモデルとして期待される。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計1件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 1件）

1. 発表者名 Nio K, Sugiyama G, Okada H, Yamashita T
2. 発表標題 Efficacy of VEGFR2-targeted therapy after atezolizumab and bevacizumab combination therapy in hepatocellular carcinoma
3. 学会等名 AASLD 2023 (国際学会)
4. 発表年 2023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
研究協力者	杉山 絃  (Sugiyama Gen)		

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