

令和 5 年 6 月 13 日現在

機関番号：12602

研究種目：挑戦的研究（萌芽）

研究期間：2020～2022

課題番号：20K21540

研究課題名（和文）人工微小環境アレイを用いた新規フェノミクスの創出とがん幹細胞層別化療法の開発

研究課題名（英文）Polymer array scaffold-based creation of a new cell phenomics phase for cancer stem cell stratification

研究代表者

楠 康一（Tabu, Kouichi）

東京医科歯科大学・難治疾患研究所・講師

研究者番号：10466469

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）：がん患者の治療抵抗性や再発リスク（すなわちがん幹細胞性）を予測する新規診断法開発を目指して、多種合成ポリマー（人工微小環境）に対する遺伝子変異と起源の異なる細胞株の接着パターンを比較したところ、各細胞株が様々なポリマー嗜好性を呈することが明らかとなった。このような生きた細胞の網羅的な微小環境適合性を新規のオミクス階層polymerome（ポリメローム）と命名した。この新規オミクス概念を用いて、がん患者の抗がん剤感受性を判断できる可能性が示唆された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

治療抵抗性や再発リスクは層別化最大の目的でありながらも、それら特性を担う細胞（すなわちがん幹細胞）の層別法は未だ確立されていない。本研究で導出された新規のオミクス概念polymeromeは、網羅性を有する初めてのフェノミクス階層として従来のオミクス体系に変革をもたらすものであり、学術的に高い波及効果を有する。また、本研究で同定されたがん幹細胞診断ポリマーは、核酸・抗体に続く次世代の高分子シーズとして産業界に与えるインパクトも高く、将来的にがん研究・医療の方向性を大きく転換させる高い潜在性を有している。

研究成果の概要（英文）：To develop the innovative diagnostic methods that predict therapy-resistance and recurrent risk (i.e. cancer stemness) in cancer patients, the binding preference of cells to hundreds of synthetic polymer microenvironments (named as “polymerome”) was compared. Cell lines with different gene alterations and different cells of origins displayed the apparently distinctive polymeromes. Further analysis demonstrated that this new cell-phenomics phase is useful to discriminate the chemoresistant feature of cancer patients to anti-cancer drugs.

研究分野：腫瘍生物学

キーワード：がん幹細胞 合成ポリマー 人工微小環境 微小環境適合性 オミクス フェノミクス polymerome 層別化

科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属します。

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

近年のがん領域ではゲノム変異に基づく治療薬の追加選択が可能となるなどオミクス技術の医療実装が進んでいる。このような精密医療では治療抵抗性や再発リスクに基づく患者層別化技術の開発が重要な意義を持つと考えられるが、それら特性を担う細胞(すなわちがん幹細胞)の層別化は未だ確立されていなかった。

細胞特性の比較には核酸・タンパク質など生体高分子の総体情報(-ome)を用いる方法が一般的であるが、これらは本来表現型オミクス(フェノミクス)の階層が網羅性を欠くことにより代替的な指標として用いられてきたにすぎない。事実、mRNAとタンパク質間の発現コピー数には明らかな齟齬があり、ここにリン酸化や糖鎖修飾など翻訳後修飾の有無が加わることや、さらに幹細胞が希少且つ可塑性を有する集団であることを踏まえれば、ゲノム~メタボローム階層が果たしてどの程度までがん幹細胞の機能を描出できるかは不明である。特にがん幹細胞の機能は細胞外要因の影響を強く受けることから、その層別化にはゲノムやトランスクリプトーム等の細胞内要因に加え、微小環境の変化による細胞外要因の関与を踏まえた新たなオミクス階層の設立が重要と考えられた。

2. 研究の目的

再生医療分野において幹細胞機能性の合成ポリマー(高分子化合物)の存在が報告されて以降(引用文献1)その研究・医療への応用が期待されている。研究代表者らも2011年より高分子化学分野の先駆的第一人者である英国エジンバラ大学 Mark Bradley 教授(研究室 HP: <http://www.combichem.co.uk/>)との緊密な国際連携を進め、多種合成ポリマーライブラリーを用いた機能性高分子の解析技術を確立してきた(引用文献2)。

本研究はこのような英国材料化学分野との異分野融合の国際共同研究を通じて確立された網羅的な人工微小環境探索系「ポリマー-microarray」の手法を用いて、新規の表現型オミクス(フェノミクス)階層 polymerome (ポリメローム)の創設に挑んだ。これによりゲノム・トランスクリプトーム等、従来のオミクス階層ではカバーされてこなかった「生きた細胞の微小環境適合性」という極めてユニークかつ重要な表現型に基づき、がん幹細胞の特性(治療抵抗性や再発リスク)を層別化する新規診断法の開発を目指した。

3. 研究の方法

(1) 5つの肉腫特異的キメラ遺伝子を3つの起源細胞に導入した計15種類の肉腫様細胞株を作製し(共同研究者による)、4種類の抗肉腫薬 Vincristine, Actinomycin, Doxorubicin, Etoposide に対する IC50 値を算出した。

(2) transcriptome ベースの層別化を行うため、全細胞の遺伝子発現データを取得し、PCA と t-SNE による次元圧縮を実施して層別化を行った。

(3) polymerome ベースの層別化を行うため、計382種類のアクリル系ポリマーを quadruplicate にスポットしたアレイスライドを複数枚準備し(海外共同研究者による)その上で各肉腫様細胞株を起源細胞と共培養した。全ポリマースポット上に接着した細胞数は蛍光強度を指標に数値化し、PCA (principal component analysis) と t-SNE (t-distribution Stochastic Neighbor Embedding) による次元圧縮を実施して、層別化を行った。

(4) 患者由来細胞、且つ複数癌腫での polymerome 階層の有用性を検証するため、膠芽腫患者由来細胞 (patient-derived cell; PDC) 株を樹立し(共同研究者による)、抗グリオーマ薬 Temozolomide (TMZ) に対する IC50 値を算出した。

(5) 膠芽腫 PDC 株の polymerome データを取得し、PCA と t-SNE による次元圧縮を実施して TMZ 感受性との相関を検証した。

(6) 細胞株個々で polymerome が異なる分子機構を明らかにするため、PDC 株の TMZ 感受性に関連する遺伝子群の Gene Set Enrichment Analysis (GSEA) を行った。

4. 研究成果

(1) 15種類のキメラ遺伝子導入細胞株について、抗がん剤感受性を検証したところ、滑膜肉腫原因遺伝子 SS18-SSX1 およびユーング肉腫原因遺伝子 EWSR1-FLI1 を導入した線維芽細胞起源の細胞株が vincristine や doxorubicin、etoposide などの抗肉腫薬に耐性を示すことが明らかとなった。既存の薬剤耐性マーカー(DNA修復関連遺伝子、微小管形成関連遺伝子、膜トランスポーター遺伝子など)についてその発現レベルと IC50 値の相関を確認したところ、その有用性は変異遺伝子と抗がん剤の種類によって異なり、汎用性のある診断マーカー遺伝子は存在しないことが示唆された。そこで15種類全株の transcriptome データを取得し、PCA と t-

SNE による次元圧縮を行ったところ、細胞起源ごとにクラスター化されたその一方で、変異遺伝子間の違いを区別することはできなかった。この結果から、細胞の特性を区別するためには genome と transcriptome の統合的な解析が必要であると考えられた。

(2) 細胞株の層別化に polymerome データが有用であるかを検証するため、15 種類のキメラ遺伝子導入細胞株と 3 種類の起源細胞を用いてポリマー-microarray 解析を行い、polymerome データを heatmap で可視化したところ、15 種類のキメラ遺伝子導入細胞株は各々に特徴的なポリマー接着パターンを示した(図1)。このような生きたがん細胞の網羅的な微小環境適合性は、新規のオミクス階層 polymerome (ポリメローム) と命名された。得られた polymerome データを用いて PCA による次元圧縮を実施したところ、上記抗肉腫薬に耐性を示した 2 株が特徴的な polymerome パターンを呈し、genome と transcriptome のデータを得ずとも、抗がん剤耐性(すなわちがん幹細胞性)を区別できることが分かった(図2)。

(3) この新しいオミクス概念のヒト細胞および異なる癌腫への適応可能性を検証するため、膠芽腫初発 PDC3 株および再発 PDC2 株の抗グリオーマ薬 TMZ に対する IC50 値、transcriptome および polymerome データを取得した。transcriptome データの t-SNE 解析を行ったところ、比較的 TMZ に感受性の患者群と耐性の患者群に 2 分された。一方、polymerome データの heatmap 解析および t-SNE 解析を行ったところ、全 PDC 株がユニークなポリマー嗜好性を呈したが、ポリマー嗜好性の低い細胞株は総じて TMZ に耐性の高いことが明らかとなった。

(4) TMZ 適応患者の層別化に有効と考えられる 4 つのアクリル系ポリマー PA338, PA327, PA423, PA424 を同定し、それらを用いた診断パネルを作製中である。驚くべきことに PA338 は PA327 と、PA423 は PA424 と非常に類似した化学構造を有していた。TMZ 感受性未知の新たな PDC 株を樹立後、ブラインドテストを実施して、診断材としての POC (proof-of-concept) を検証予定である。

(5) polymerome に基づく抗がん剤感受性の診断メカニズムを明らかにするため、TMZ 感受性と耐性の PDC 株間で transcriptome データを比較する GSEA を行ったところ、ポリマー嗜好性の低い TMZ 耐性群において EMT 関連遺伝子群が高く発現していることが明らかとなった。今後、鍵分子としての POC を検証予定である。

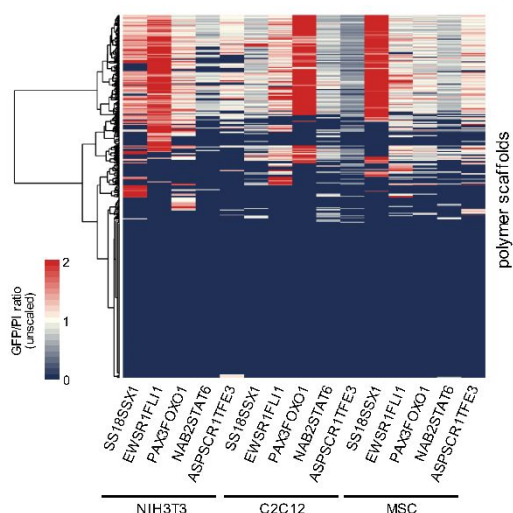


図1. 肉腫様細胞株より取得したpolymeromeデータの heatmap解析。起源細胞とキメラ遺伝子の組み合わせにより異なるポリマー嗜好性を持つことが分かった。

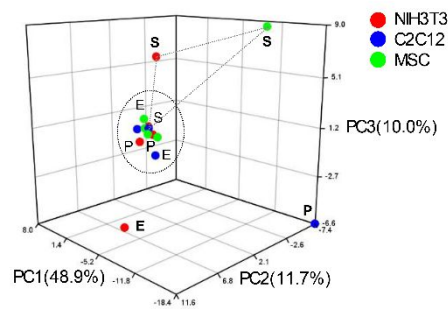


図2. 肉腫様細胞株より取得した polymeromeデータのPCA解析。抗がん剤耐性の細胞株が特にユニークな polymeromeを呈することが分かった。

以上の成果は独自に創設したフェノミクス階層 polymerome が、患者細胞および複数の癌腫において、従来の transcriptome 階層では判断することの難しかった臨床的意義の高い細胞(すなわちがん幹細胞)の特性を層別化できる可能性を示唆しており、がんの治療感受性・再発リスク・予後予測診断法開発に新たな道を拓く重要な成果と考えられる。

<引用文献>

1. Villa-Diaz LG et al., Synthetic polymer coatings for long-term growth of human embryonic stem cells. Nat Biotechnol 28(6): 581-583, 2010.
2. Tabu K et al., A synthetic polymer scaffold reveals the self-maintenance strategies of rat glioma stem cells by organization of the advantageous niche. Stem Cells 34(5): 1151-1162, 2016.

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計10件（うち査読付論文 7件 / うち国際共著 0件 / うちオープンアクセス 6件）

1. 著者名 Tabu Kouichi, Taga Tetsuya	4. 巻 42
2. 論文標題 Cancer ego-system in glioma: an iron-replenishing niche network systemically self-organized by cancer stem cells	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Inflammation and Regeneration	6. 最初と最後の頁 54-54
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1186/s41232-022-00240-8	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 Wang Wenqian, Tabu Kouichi, Aimaitijiang Alapati, Taga Tetsuya	4. 巻 42
2. 論文標題 Therapy-resistant nature of cancer stem cells in view of iron metabolism	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Inflammation and Regeneration	6. 最初と最後の頁 34-34
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1186/s41232-022-00220-y	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 Murota Yoshitaka, Tabu Kouichi, Taga Tetsuya	4. 巻 11
2. 論文標題 Cancer Stem Cell-Associated Immune Microenvironment in Recurrent Glioblastomas	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Cells	6. 最初と最後の頁 2054 ~ 2054
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3390/cells11132054	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 Aimaitijiang Alapati, Tabu Kouichi, Wang Wenqian, Nobuhisa Ikuo, Taga Tetsuya	4. 巻 27
2. 論文標題 Glioma cells remotely promote erythropoiesis as a self expanding strategy of cancer stem cells	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Genes to Cells	6. 最初と最後の頁 25 ~ 42
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1111/gtc.12908	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 Taga T and Tabu K	4. 巻 40
2. 論文標題 Glioma progression and recurrence involving maintenance and expansion strategies of glioma stem cells by organizing self-advantageous niche microenvironments	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Inflammation and Regeneration	6. 最初と最後の頁 33
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1186/s41232-020-00142-7	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 -

1. 著者名 榎康一, 田賀哲也	4. 巻
2. 論文標題 合成ポリマーを用いた癌幹細胞ニッチの特性解明	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 別冊・医学のあゆみ	6. 最初と最後の頁 122-127
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) なし	査読の有無 無
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 榎康一, 田賀哲也	4. 巻 3
2. 論文標題 膠芽腫がん幹細胞ニッチの標的探索	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Precision Medicine	6. 最初と最後の頁 70-73
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) なし	査読の有無 無
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 榎康一, 田賀哲也	4. 巻 46
2. 論文標題 ニッチを標的とする膠芽腫がん幹細胞の制御	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Medical Science Digest	6. 最初と最後の頁 77-79
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) なし	査読の有無 無
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16件（うち招待講演 1件 / うち国際学会 1件）

1. 発表者名 Kouichi Tabu, Shinji Kohsaka, Takuichiro Hide, Tetsuya Taga
2. 発表標題 Synthetic polymer microenvironment array chip based development of new cell phenomics for cancer stratification
3. 学会等名 The 81st Annual Meeting of the Japanese Cancer Association
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 Yoshitaka Murota, Kouichi Tabu, Tetsuya Taga
2. 発表標題 Establishment of a high-content screening system for niche mimics using polymer-immobilized microwell array plates
3. 学会等名 The 81st Annual Meeting of the Japanese Cancer Association
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 Tingting Zhang, Kouichi Tabu, Yoshitaka Murota, Takuichiro Hide, Shunichiro Ogura, Tetsuya Taga
2. 発表標題 Exploration of glioma recurrence-related genes upregulated in highly invasive and 5-ALA-PDD escaping cells
3. 学会等名 The 81st Annual Meeting of the Japanese Cancer Association
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 梶 康一, 室田 吉貴, 永根 まり子, 田中 真二, 田賀 哲也
2. 発表標題 がん幹細胞ニッチ擬態性ハイドロゲルを用いた膵がん治療標的分子の探索
3. 学会等名 第43回日本炎症・再生医学会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 Tetsuya Taga, Norihisa Bizen, Kouichi Tabu, Mei Wu, Christian Mangani, Rong Zhang, Mark Bradley
2. 発表標題 Identification of a niche-mimicking synthetic polymer scaffold that maintains neural stem cells in a growth factor- and serum-free system
3. 学会等名 The 19th Stem Cell Research Symposium
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 Kouichi Tabu, Tetsuya Taga
2. 発表標題 Polymer based elucidation of molecular basis underlying cancer stem cell mediated niche reconstruction and glioma recurrence
3. 学会等名 The 18 th Stem Cell Research Symposium
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 Mariko Nagane, Kouichi Tabu, Yoshitaka Murota, Shinji Tanaka, Tetsuya Taga
2. 発表標題 Niche-mimicking polymer-based characterization of human pancreatic cancer stem cells (pCSCs)
3. 学会等名 The 18 th Stem Cell Research Symposium
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 梶 康一, 田賀 哲也
2. 発表標題 生物機能性高分子ハイドロゲルによるがん幹細胞ニッチ自己構築ならび にグリオーマ再発機構の解明
3. 学会等名 第42 回日本炎症・再生医学会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 永根まり子, 梶康一, 室田 吉貴, 田中真二, 田賀哲也
2. 発表標題 ヒト膵癌幹細胞の特性解明のためのニッチ擬態ポリマーの開発と最適化
3. 学会等名 第42 回日本炎症・再生医学会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 Kouichi Tabu, Tetsuya Taga
2. 発表標題 Cancer stem cell niche-mimicking polymer-based exploration of the factors responsible for glioma recurrence
3. 学会等名 The 80th Annual Meeting of the Japanese Cancer Association
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 Tabu K, Zhang S, Kosaku A, Venkateswaran S, Kohsaka S, Bradley M, Taga T
2. 発表標題 Synthetic polymer-based stratification of soft tissue sarcomas with different gene alterations and cells of origin
3. 学会等名 11th World Biomaterials Congress (WBC Virtual 2020) (国際学会)
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 Nagane M, Tabu K, Murota Y, Tanaka S, Taga T
2. 発表標題 Fabrication of niche-mimicking polymer hydrogels to characterize human pancreatic cancer stem cells
3. 学会等名 第43回日本分子生物学会年会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 Kosaku A, Tabu K, Kohsaka S, Taga T
2. 発表標題 A new stratification method for predicting chemosensitivities of soft tissue sarcomas using synthetic polymer microarray
3. 学会等名 第79回日本癌学会学術集会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 Tabu K and Taga T
2. 発表標題 Chemical fabrication of bio-functional polymer-hydrogels that mimic cancer stem cell niche
3. 学会等名 第79回日本癌学会学術集会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 田質 哲也, 楠 康一
2. 発表標題 炎症性細胞の制御による癌幹細胞のニッチ構築
3. 学会等名 第41回日本炎症・再生医学会 (招待講演)
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 Aimaitijiang A, Tabu K, Wang W, Nobuhisa I, Taga T
2. 発表標題 Glioma stem cells promote erythroid differentiation in mouse bone marrow
3. 学会等名 第41回日本炎症・再生医学会
4. 発表年 2020年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

東京医科歯科大学難治疾患研究所幹細胞制御分野ホームページ（日本語）
<http://www.tmd.ac.jp/mri/scr/index.html>
東京医科歯科大学難治疾患研究所幹細胞制御分野ホームページ（英語）
<https://www.tmd.ac.jp/mri/scr/english/index.html>

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	田賀 哲也 (Taga Tetsuya) (40192629)	東京医科歯科大学・難治疾患研究所・教授 (12602)	

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		
英国	The University of Edinburgh		