

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 6 月 22 日現在

機関番号：12102
 研究種目：挑戦的萌芽研究
 研究期間：2013～2015
 課題番号：25670567
 研究課題名(和文) 膵がん間質消滅治療：自殺遺伝子を導入した間葉系幹細胞によるがん間質の入れ換え

 研究課題名(英文) Stroma elimination therapy for cancer; a surrounding cancer cells by decoy engineered Mesenchymal Stem Cells, including suicide gene

 研究代表者
 小田 竜也(Oda, Tatsuya)

 筑波大学・医学医療系・教授

 研究者番号：20282353

 交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,000,000円

研究成果の概要(和文)：膵癌に“デコイ間葉系幹細胞(MSC)”を外来性に投与して、膵癌細胞周囲に増殖させた後、一気に間質を消去し間接的に癌細胞を死滅させる新規癌間質治療を目指した。間質のもととなるMSCは一般に骨髄由来(BM-MSC)と考えられて来たが、増殖速度、遺伝子導入効率が悪くengineered -MSCのソースとしては利用しにくかった。本研究は、利便性に勝る脂肪細胞由来MSC(Ad-MSC)がBM-MSCと同様に癌の間質形成に寄与する事を明らかにし、デコイMSC治療の開発の基盤を形成した。

研究成果の概要(英文)：Crosstalk between cancer cells and Cancer-Associated Fibroblast (CAF) plays a crucial role that comprises 3D organization of solid cancers. We designed new cancer therapy namely “decoy MSC therapy”, that involves administration of engineered MSC at first, and eliminate them after cancer cells are surrounded by decoy MSC. The origin of CAFs have been assumed as bone marrow derived Mesenchymal Stem Cell (BM-MSC), however they are not be a source of decoy MSC because of technical challenges. We employed adipose tissue derived MSC(AD-MSC), confirming its positive potential for the application in new therapy.

研究分野：医歯薬学，消化器外科学，腫瘍治療学

キーワード：癌線維芽細胞(CAF) 間葉系幹細胞(MSC) 癌-間質のクロストーク 膵癌

1. 研究開始当初の背景

【厚い間質組織に囲まれた難治性固形癌、薬剤投与による DDS 問題、治療の限界】

膵癌を初めとする難治性固形癌は間質組織を誘導して増生させ、その中に含まれる間質細胞（腫瘍関連線維芽細胞、腫瘍関連炎症細胞、腫瘍新生血管など）は癌細胞とダイナミックに cross talk し、癌結節全体の増殖、進展をサポートする事が知られている。

こういった間質組織に厚く囲まれた固形癌を治療する際、間質組織は抗癌治療薬の送達を阻むバリアーとなり、治療抵抗性をもたらす大きな障壁にもなっている。投与した治療薬をいかに癌細胞に送達するか、という DDS が治療の鍵となるが、癌細胞、腫瘍間質組織、間質細胞の分布には強い heterogeneity があり、外来性に投与した治療薬を腫瘍組織全体に有効濃度で行き渡らせる事は理論的に困難である。**すなわち、外来性に治療薬を投与するという古典的な治療戦略をとっている限り、膵癌の治療成績にはおのずと限界がある。**

【おとり-MSC の外来投与によるがん間質の増生効果の確認と、自殺遺伝子発動による間質消去】

がん間質を形成する細胞の由来としては骨髄由来の MSC (BM-MSC) が中心的な役割を果たしており、ホストの骨髄由来の BM-MSC や、外来性に投与した BM-MSC が癌組織に強く forming する事が知られる様になった。本研究では、がん間質細胞のソースとなる MSC を血中に投与し、膵癌細胞周囲を人工的な MSC 由来の間質細胞で充満させる事を第一段階として行う。効率的に腫瘍間質増生を引き起こす MSC を選別する。予めこの MSC にはマーカー色素と自殺遺伝子(HSV-TK 等)を導入しておき、癌結節に十分“デコイ間質細胞”が充満した段階で、突然自殺遺伝子を発動させ(Ganciclovir 投与)、間質組織を消去させる。間質細胞との cross-talk に依存して生存していた膵癌細胞をアポトーシスに陥らせて死滅させる新しい癌治療法の実験的基盤を整える。

2. 研究の目的

本研究では、「膵癌が間質細胞を誘導する、必要とする」という性質を逆手にとった新しい治療戦略を開発する事を目的にした。**最終目的は外来性に投与した脂肪細胞由来 MSC (=Ad-MSC) が、BM-MSC と同等のがん間質誘導をもたらす事を確認し、Ad-MSC による膵癌間質消去治療の実現を目指す事である。**

がん間質を形成する細胞の由来としては骨髄由来の MSC (BM-MSC) が中心的な役割を果たしており、ホストの骨髄由来の BM-MSC や、外来性に投与した BM-MSC が癌組織に強く forming する事が知られる様になった。本研究では、がん間質細胞のソースとなる MSC を血中に投与し、膵癌細胞周囲を人工的な MSC 由来の間質細胞で充満させる事を第一段階として行う。効率的に腫瘍間質増生を引き起こす MSC を選別する。予めこの MSC にはマーカー色素と自殺遺伝子(HSV-TK 等)を導入しておき、癌結節に十分“デコイ間質細胞”が充満した段階で、突然自殺遺伝子を発動させ(Ganciclovir 投与)、間質組織を消去させる。間質細胞との cross-talk に依存して生存していた膵癌細胞をアポトーシスに陥らせて死滅させる新しい癌治療法の実験的基盤を整える。

【骨髄由来ではなく脂肪細胞由来の MSC を利用する】

生体の癌においては BM-MSC が間質誘導の主役であると考えられている事から、がん間質の制御を目指した研究では主に BM-MSC が研究材料として使われている。しかし、BM-MSC は抽出が煩雑で採取効率が悪く、加えて遺伝子改編が難しいという問題点がある。ヒトへの臨床応用を視野に入れた場合、脂肪細胞由来の MSC (=Ad-MSC) が持つ、遺伝子導入効率と組織定着性に優れ、入手が簡便である事、さらに多分化能を維持する播種回数が多く移植材料としての量を確保するのが容易である、等の特徴は本研究の利用に適している。

本研究の最終目的は外来性に投与した脂肪細胞由来 MSC (=Ad-MSC) が、BM-MSC と同等のがん間質誘導をもたらす事を確認し、Ad-MSC による膵癌間質消去治療の実現を目指す事である。

3. 研究の方法

【 RFP 導入マウス大腿骨からマウス骨髄間葉系幹細胞(BM-MSC)を、GFP 導入マウスの精巣上体から脂肪細胞由来間葉系幹細胞(Ad-MSC)を単離。】

BM-MSC は、若齢 (3-6 週齢) の RFP 導入マウス (Red マウス: B6;B6D2-Tg (CAG-MBD/RFP)1Rbr; 理研 BRC) の大腿骨から骨髄を採取。7-10 日ディッシュ上で培養し、2nd passage を行う。浮遊細胞を入念に除去し、ディッシュへの接着細胞を BM-MSC として継代する。BM-MSC は多分化能を維持する 5 継代までを使用する。

Ad-MSC は老齢 (12-20 週齢程度) の GFP 導入マウス (Green マウス:

C57BL/6-Tg(CAG-EGFP)C14-Y01-FM13 10sb マウス: 理研 BRC)の精巢上体から採取。7-10 日ディッシュ上で培養し、2nd passage を行う。浮遊細胞を入念に除去し、ディッシュへの接着細胞を Ad-MSc とし、継代する。Ad-MSc は多分化能を維持する 8 継代までを使用する。

双方ともより純度の高い MSC を回収するため、既存細胞マーカー(Ter119, CD31, and CD45) 陽性の細胞群を MACS(Magnetic-activated cell sorting)にて選別し、繊維芽細胞様細胞を播種して、BM-MSc (赤)、Ad-MSc (緑)として使用する。

【 BM-MSc (赤)と Ad-MSc (緑)を担がんマウスの尾静脈より投与。膵癌細胞周囲での増殖能とフォーミング能力が高い“おとり MSC”を選別する。特に、マウス MSC のマウス腫瘍の間質誘導だけでなく、ヒト膵癌へのフォーミング能力、といった、種間の相互効果を確認。】

(1)マウス同系腫瘍における MSC の影響

局所増殖能

マウス大腸癌細胞(C-26) 10E5 個に様々な比率(10E3, 10E4, 10E5, 10E6 個)の MSC を移植前に既に混合させておき、野生型マウス(Balb/c)の皮下に移植する。BM-MSc (赤)と Ad-MSc (緑)それぞれにおける腫瘍増殖の違いを確認する。また、BM-MSc (赤)と Ad-MSc (緑)を同比率で混合し、形成した腫瘍中での間質造成の比率を蛍光観察、フローサイトメトリーにて確認・計測する。

血中遊離 MSC のマウス腫瘍へのフォーミング

マウス大腸癌細胞 (C-26) 単独で皮下腫瘍を野生型マウス(Balb/c)に形成し、尾静脈から 10E5 の MSC を投与する。注入する BM-MSc (赤)と Ad-MSc (緑)の比率を 10:0、5:5、0:10 の 3 つの比率に振り、フォーミング及び間質形成効率を確認する。MSC の静脈内投与時期を腫瘍形成早期(癌細胞移植直後、3 日後)と後期(7 日後、14 日後)に分けたフォーミングの効率も確認する。腫瘍中での間質造成の比率を蛍光観察、フローサイトメトリーにて確認・計測する。

(2) ヒト膵癌細胞株移植モデルにおける解析

局所増殖能

ヒト膵癌細胞(Capan-1, Suit-2, ASPC-1, MiaPaca 等)を Ad-MSc (緑)と混合し、BALB/c ノードマウスの皮下に移植する。Ad-MSc 由来の間質が増殖しやすいヒト細胞株と外来間質非依存株を選別する。これは、本治療戦略の効果を予見するための基盤情報とする。

血中遊離 マウス MSC のヒト膵癌へのフォーミング

これは、種の異なる MSC が腫瘍周囲に本当にフォーミングするか否かはまだ十分には検討されていないこと、癌遺伝子の導入や、癌抑制性遺伝子のノックアウトといった造腫瘍性のある MSC ではなく、野生型に近い MSC が本当に腫瘍にフォーミングするか否かを確認するために必要となる。

(3) ヒト臨床膵癌組織移植モデル (tumorgraft)における解析

膵癌の様な難治癌における間質組織の誘導という性質は、細胞株を使った移植腫瘍ではなかなか再現されない。我々は、ヒトの臨床癌組織片を直接マウスに移植した膵 tumorgraft で間質増生がとても良く再現される事を示して来た。本研究のアイデアである、外来投与 MSC の腫瘍へのフォーミングもこの膵 tumorgraft モデルで確認されてこそ、臨床応用への礎になると考える。少なくとも 5 人の膵癌患者由来の膵 tumorgraft へマウス Ad-MSc (緑)を投与し効果を確認する。

4. 研究成果

H25年度は、利便性に勝る脂肪細胞由来MCS (Ad-MSc)がBM-MScと同様に癌の間質形成に寄与するか否かの検証を行った。臨床癌の形態模倣、癌-間質のクロストークを評価項目として、複数のヒト由来BM-MScとAD-MScを癌細胞と混合培養した。2種類のBM-MScが5点の形態模倣をしたのに対し、5種類のAD-MScは1種類が5点、2種類が4点、2種類が3点であり、いくつかのAD-MScがデコイMSCとして使える可能性を示せた。

H26年度は、Ad-MScが癌に教育された後、CAFに変化したか否かを検証した。癌細胞とAd-MScを直接混ぜるdirect

co-cultureの系では、Magnet beadsを使って癌細胞（赤）とAd-MSC（緑）を分離採取し、各種マーカーを定量PCRで評価した。ただ、いくらMagnet beadsを使っても、FACSを使っても癌細胞（赤）とAd-MSC（緑）を完全に分離採取する事は出来ず、客観的なPCRの結果が得られなかった。その為、後半ではTrans wellを使った非接触系でAd-MSCのCAF化を検証し、一定の分化傾向を確認出来た。さらに、2つのデコイMSC候補株にGFPを導入し、マウスへの移植モデルで臨床癌の形態模倣を再現するかを検証したが、残念ながら、今の所Pilot Studyで得られたような臨床像に近い形態は再現出来ていない。

H27年度はこれらの混合培養により、Trans wellを使った非接触系において、Ad-MSCが癌細胞によってeducationされる事によるAd-MSCの遺伝子発現状態がCAFに変化したかをDNA sequenceにより解析し、FAP,FSP,CXCL12といったCAF signatureが確かに上昇する事を確認した。さらに、定量PCRによりその再現性を確認した。ここで、これらのAd-MSCをデコイ線維芽細胞として遺伝子改変する事を試みた。しかし、Ad-MSCは継代を重ねる度にviabilityが悪くなる傾向があり、継続して実験に使うことが出来なくなった。そこで、H28年度からは不死化したAd-MSCを導入し、デコイCAFの作成を目指した所、がんの周囲にCAFとして配置される可能性を見出した。今後、不死化したAd-MSCをソースとすることで、癌間質消去治療の具現化を継続していく。

5 . 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計4件)

Miyamoto R, Oda T, Hashimoto S, Kurokawa T, Inagaki Y, Shimomura O, Ohara Y, Yamada K, Akashi Y, Enomoto T, Kishimoto M, Yanagihara H, Kita E, Ohkohchi N. Cetuximab

delivery and antitumor effects are enhanced by mild hyperthermia in a xenograft mouse model of pancreatic cancer. *Cancer Sci.* 査読有 , 107(4)514-520 , 2016
DOI: 10.1111/cas.12888.

Akashi Y, Oda T, Ohara Y, Miyamoto R, Kurokawa T, Hashimoto S, Enomoto T, Yamada K, Satake M, Ohkohchi N. Anticancer effects of gemcitabine are enhanced by co-administered iRGD peptide in murine pancreatic cancer models that overexpressed neuropilin-1. *Br J Cancer.* 査読有 ,110(6)1481-1487,2014
DOI: 10.1038/bjc.2014.49.

Akashi Y, Oda T, Ohara Y, Miyamoto R, Hashimoto S, Enomoto T, Yamada K, Kobayashi A, Fukunaga K, Ohkuchi N. Histological advantages of the tumor graft: a murine model involving transplantation of human pancreatic cancer tissue fragments. *Pancreas.* 査読有 , 42(8)1275-1282 , 2013
DOI: 10.1097/MPA.0b013e318296f866.

Ohara Y, Oda T, Sugano M, Hashimoto S, Enomoto T, Yamada K, Akashi Y, Miyamoto R, Kobayashi A, Fukunaga K, Morishita Y, Ohkohchi N. Histological and prognostic importance of CD44(+)/CD24(+)/EpCAM(+) expression in clinical pancreatic cancer. *Cancer Sci.* 査読有 , 104(8)1127-1134 , 2013
DOI: 10.1111/cas.12198.

〔学会発表〕(計2件)

Inagaki Y, Oda T, Kurokawa T, Miyamoto R, Kida Y, Ishii G, Ochiai A, and Ohkohchi N: Mesenchymal Stem Cells have the differentiation capacity towards Cancer Associated Fibroblast and reproduce the clinical tumor stromal morphology. AACR (American Association of Cancer Research), SanDiego, USA, Apr. 2014.4.5-9

Tomohiro Kurokawa, Tatsuya Oda, Yuki Inagaki, Ryoichi Miyamoto, Yoshimasa Akashi, Nobuhiro Ohkohchi; CD44v9 expression in clinical pancreatic cancer and the gemcitabine plus sulfasalazine therapy against chemoresistant pancreatic cancer murine model. AACR (American Association of Cancer Research), SanDiego, USA, Apr. 2014.4.5-9

〔産業財産権〕

出願状況（計 1 件）

名称：がんの診断及び治療方法

発明者：小田竜也，館野浩章，平林淳，浅島誠，伊藤弓弦，小沼泰子，大河内信弘，下村治

権利者：同上

種類：特許

番号：特願 2016-069683

出願年月日：2016 年 3 月 30 日

国内外の別： 国内

6．研究組織

(1)研究代表者

小田 竜也（ODA, Tatsuya）

筑波大学・医学医療系・教授

研究者番号：20282353

(2)研究分担者

木田 泰之（KIDA, Yasuyuki）

国立研究開発法人産業技術総合研究所・幹

細胞工学センター・研究チーム長

研究者番号：20396526