

平成30年6月18日現在

機関番号：12102

研究種目：基盤研究(B) (一般)

研究期間：2015～2017

課題番号：15H04924

研究課題名(和文) iCAF: iPS由来の癌線維芽細胞による膵癌幹細胞、間質幹細胞の糖鎖標的探索

研究課題名(英文) iCAF: Cancer associated fibroblast derived from iPS cells and its surface glycan as a target of cancer therapy.

研究代表者

小田 竜也 (Tatsuya, ODA)

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) 12,900,000円

研究成果の概要(和文)：世界的にも解析が遅れている膵癌における糖鎖解析に取り組んだ。臨床膵がん幹細胞様細胞株(CSCL-1)の糖鎖発現を網羅的に解析し、H type 3糖鎖が特異的に表出しており、rBC2レクチンがそれに結合する事を同定した。さらに、rBC2レクチンを直接がん幹細胞を標的とする治療担体としての応用に研究を展開した。

また、間葉系幹細胞をCSCL-1と混合してマウス皮下に移植すると、腫瘍増生能は優位に促進されるが、CAFを第一世代(F1)、F2と単離しそれをCSCL-1と混合移植した所、腫瘍増生能はF0、F1、F2と徐々に弱くなる事が明らかになり、逆にCAFマーカーは高くなっていく傾向を示した。

研究成果の概要(英文)：We comprehensively analyzed glycan expression of clinical pancreatic cancer stem cell-like cell line (CSCL-1), and identified that H type 3 sugar chain was specifically expressed, and that rBC2 lectin binds to it. In addition, we have studied application of rBC2 lectin as a therapeutic carrier targeting direct cancer stem cells.

In addition, when mesenchymal stem cells are co-cultured with CSCL-1 and transplanted subcutaneously into mice, CAF boosted tumor growth. When the CAF was isolated as the first generation (F1), F2 the tumor growth capacity gradually weakened as the generation progress (i.e. F0, F1, F2), while the CAF marker showed a tendency to become higher.

研究分野：腫瘍治療学

キーワード：膵癌 癌-間質相互作用 CAF (がん関連線維芽細胞) 糖鎖 レクチン ドラッグデリバリー

1. 研究開始当初の背景

【研究背景-1: CAF 研究の混沌と CAF 実験モデルの不足】

CAF の由来、働きは非常に複雑で、がん間質研究を混沌としたものになっている。単純に考えると、CAF は癌が発生した臓器に元々ある local MSC (Mesenchymal stem cell) に由来すると理解されるが、我々は CAF は流血中の骨髄由来の MSC (BM-MSC) から多く作り出される事を見いだした (Ishii G, Oda T et.al. BBRC 2003)。その後、それ以外にも腫瘍周囲の脂肪組織由来の MSC (=AD-MSC)、血管周囲の pericyte などからも CAF が分化する事が解りその heterogeneity が明らかになってきた。様々な由来の MSC は CAF-progenitor として癌と相互作用して成熟した CAF へ分化する。しかし、成熟した CAF が癌に促進的に働く場合と抑制的に働く場合が混在していて、その働きも混沌としている。

CAF 研究進展を阻んでいる要因として、臨床膵癌の豊富な間質増生を再現する実験系が無い事が挙げられる。現在、大多数の癌研究に使われている動物モデルは、細胞株を単独でマウスに移植したものであり (Cell xeno)、間質組織の増生に乏しく (2-10%) 臨床癌の間質量 (30-50%) とはかけ離れたものである。申請者らは間質増生を比較的再現できる (23%) 実験モデルとして臨床腫瘍片を移植した Ope xeno モデルを独自に開発したが (Akashi Y, Oda T, Pancreas 2013)、腫瘍増殖にかかる時間が長い (3 ヶ月~半年) といった解決すべき課題が残っている。

臨床膵癌の病理形態を再現させる為に、癌組織から CAF を分離採取して癌細胞と混合する試みが成されてきた。しかし、癌細胞と CAF () は無秩序に混在するのみで癌細胞 (c) と相互作用を再現するモデルは確立されていない。

この度、筑波大学消化器外科と産総研は共同で膵癌細胞株とある特殊な Mesenchymal Stem Cell (=MSC) を混合培養することにより、「癌細胞の腺管構造の形成とその周囲を取り囲む線維芽細胞の増殖」という形態を見事に再現し、*in vivo* マウス体内で臨床膵癌の豊富な間質組織増生を再現する事に成功した (特許申請準備中)。さらに、この現象は *in vitro* シャーレー上でも再現される事から、癌-間質相互作用を簡便に解析できる有効なシステムになる (=in vitro CAF 作製プロトコル)。

【研究背景-2: 癌細胞、間質細胞共に糖鎖に覆われている】

ところで、全てのタンパク質は糖鎖修飾を受けており、細胞表面は糖鎖で覆われている為、本来、治療標的の第一候補は糖鎖であるべきである。実際、糖タンパク質の糖鎖レパートリー (グリコフォーム) は細胞の種類や、発生・分化、癌の進展によって異なるため、同じタンパク質であって

もグリコフォームによって機能は大きく変化する。癌細胞、癌間質細胞にも特有の糖鎖構造、糖鎖発現があるはずであるが、従来、糖鎖を網羅的に解析する手段が無く、糖鎖研究の進展は非常に緩徐であった。2005 年に産総研のチームが世界に先駆けて開発した「レクチンマイクロアレイ」は糖鎖・糖タンパク質の解析を飛躍的に進歩させた独自の解析技術である。しかし、膵癌細胞上や、膵癌間質細胞上の糖鎖発現がどのようなものであるかを網羅的に解析された事は無い。更に膵癌細胞上のグリコフォームが間質細胞との cross talk によりどのように変化するかといった、臨床的な膵癌の特徴に即した研究は全く手が付けられないままである。

2. 研究の目的

【A-1: 病理形態学による CAF 分化プロセス解明: mixed assay による CAF progenitor の選別】

癌細胞と MSC を共培養し、成熟 CAF として機能を果すもの、それを提供し得る MSC を CAF progenitor として現象論 (病理形態学) 的に選別する。既に、筑波大-産総研で共同開発した膵癌細胞+MSC 混合モデルを基本に、両者が混在して cross-talk した状態における遺伝子プロファイルを把握する。

-方法: Capan-1 (ヒト膵癌細胞) は CD44v9 が強陽性で、腺管形成能力も持ち、極めて癌幹細胞に近い性質を保つ。Capan-1 10E5 個を、PromoCell 社、Germany より購入した複数種類 (ヒト骨髄 MSC 3 系統、ヒト脂肪 MSC ヒト臍帯 MSC 3 系統 = 合計 9 系統) のヒト MSC それぞれ 10E5 個と混合し BALB/c ノードマウスの皮下に移植する。(EXPREP™ MSC Medium (コスモバイオ)) で培養し、10E5 に増殖させ Mixed assay に供する。多分化能を維持する 5 継代までのみを使用する。1cm 程度に腫瘍形成した段階で腫瘍を摘出し、蛍光顕微鏡で GFP 陽性の CAF を確認する。さらに抗 GFP 抗体で免疫染色し、病理医が病理形態学的に CAF として機能しているか否かを判断する。また、1 つの癌細胞株 (Capan-1) との cross-talk だけでなく、大腸癌の癌幹細胞株 (Stem Cells 2012: p2631) などの細胞株と同様の Mixed assay を行い、病理形態学的に成熟 CAF への分化を確認する。

【研究期間内の目的 1: CAF signature の把握と iPS 技術を使った CAF=iCAF の開発。iCAF を使った新規癌研究モデル】我々が開発した癌-MSC 混合モデルでは研究毎に初代培養 MSC を購入して利用している為、MSC の性質の違いが結果に影響する可能性がある。性質が安定した CAF progenitor を手に入れる事を目的に、本研究ではまず、癌細胞と cross-talk する能力のある CAF の遺伝子発現プロ

ロファイル (=CAF signature) を把握する。既に行ったプレリミナリーなマイクロアレイ解析では、CAF と元の MSC では、発現プロファイルの明確な違い (8000 の変動遺伝子 ($p < 0.01$)) が認められている。引き続き、iPS 細胞に本研究で同定した CAF signature を導入して CAF を誘導する (=iCAF)。この iCAF は癌の発生・進展を解明する新しい研究モデルになる。本研究の初期 1-2 年目において、iCAF と様々な癌細胞を cross-talk させ CAF の分化プロセス、及び、癌の発生・進展の分化プロセスに関わる分子イベント、病理形態学的な現象を明らかにする。

【 研究期間内の目的 2: 膵癌細胞と間質細胞を分離採取して糖鎖発現を解析】

膵癌細胞分画と間質細胞分画を分離採取し、産総研・平林らのレクチンアレイにて糖鎖プロファイリングを行い、MSC から CAF へのリプログラミング機構を解明する。さらに、非がん組織、バルクの癌組織と癌幹細胞、癌間質幹細胞における糖鎖プロファイリングを差分解析し、有意差を示すレクチンをそれぞれの分画毎に 3 種程度 (合計 6 種) を選出する。

3. 研究の方法

【B: バイオインフォマティクス解析により、CAF 分化プロセスに関わる 4 細胞の遺伝子プロファイルを測定し、CAF の分化を特徴づける特異的発現を示す遺伝子群 (signature) を同定する。】

i) CAF progenitor signature の同定

MSC の中で特に CAF に分化し得るものだけが持つ signature は、と の発現プロファイルと比較して、特異な変化を示すものを候補とする。遺伝子およびエピゲノムプロファイルは、次世代シーケンス解析により mRNA 発現 (RNA-seq) とゲノム DNA のメチル化 (BS-seq) をプロファイルし、既に発表している (木田ら, Nature. 2011, Epigenetics. 2014) MSC と iPS 細胞のデータと比較する。さらに次項のインフォマティクス解析から Signature を同定する。ii) CAF 癌促進 signature の同定

癌に対して促進的に働く成熟 CAF の特性を規定する signature は と の発現プロファイルと比較して、特異な変化を示すものから、と 共通するものを除いたものを候補とする。CAF 促進 signature は隣接する癌細胞でも高発現である可能性が考えられるため、候補の選定にこの条件も絞り込み項目として考慮する。

iii) CAF 癌抑制 signature の同定

癌に対して抑制的に働く成熟 CAF の特性を規定する signature は と の発現プロファイルと比較して、特異な変化を示すものから、と 共通するものを除いたものを候補とする。CAF 抑制 signature は隣接する癌細胞では低発現

である可能性が考えられるため、候補の選定にこの条件も絞り込み項目として考慮する。

Material 採取方法

i) *in vitro* シャーレで癌 (Capan-1) と CAF progenitor を混合培養し、成熟 CAF はあらかじめ導入した GFP をマーカーに FACS で回収。CAF progenitor 単独培養をコントロールとする。

ii) *in vivo* マウス皮下に癌 (Capan-1) と CAF progenitor を混合した結節を作製し、プロテアーゼ処理して FACS で回収。

iii) マイクロダイセクション *in vivo* マウス皮下に癌 (Capan-1) と CAF progenitor を混合した結節を作製し凍結切片上で癌腺管以外の間質組織を選択的に回収。FACS 等の実験影響の少ない、ほぼ *in vivo* そのままの profile を解析。

遺伝子解析法

i) 上記細胞から total RNA (poly-A+) を回収し、3D-Gene Human 25K DNA microarray (Toray cat- TRT-XR126) で全遺伝子の発現プロファイルを取得する。各サンプルの Biological replicate は 6 つとする。

情報解析は Bioconductor (<http://www.bioconductor.org>) から提供される情報ツールを用いるほか、独自に開発したものをを用いて、雑音低減、正規化、比較・クラスタリング等の処理を行うことで、各 signature の同定を行う。

4. 研究成果

我々は、産総研糖鎖グループが独自に開発した「レクチンアレイ」技術を使い、世界的にも解析が遅れている膵癌における糖鎖解析に取り組んだ。臨床膵がん幹細胞様細胞株 (CSCL-1) の糖鎖発現を網羅的に解析した結果、特異的に表出している糖鎖として H type 3

糖鎖と、それに反応するレクチン rBC2 を同定した。奇しくも、この rBC2 は、先に産総研がヒト iPS/ES 細胞に特異的に反応するレクチンとして発見した分子と同一であった。この rBC2 レクチンが認識する H type 3 糖鎖の修飾が癌幹細胞と iPS 細胞に共通に起きている事は癌 stemness の解明、治療法開発への足がかりになる大きな発見であった。それに加えて、70 例のヒト臨床膵臓がんにおける rBC2 レクチンの反応性を確認した所、ほぼ全例で強く反応することが確認でき、rBC2 が認識する H type 3 糖鎖を膵がんに対する有望な治療ターゲットと確信した。ここで我々は、この rBC2 レクチンを直接がん幹細胞を標的とする治療担体としての応用に研究を展開した。

続いて、間質側の増生に焦点を当てて解

析を進めた。骨髄由来間葉系幹細胞 (BM-MSC) と脂肪細胞由来の間葉系幹細胞 (AD-MSC) を膵癌細胞株CaPan1と混合してマウス皮下に移植すると、腫瘍像性能は優位に促進された。Day 10における組織像は様々で、唯一一つのAD-MSC-1では腫瘍腺管をがん関連線維芽細胞(CAF)が取り囲む形態を確認出来たが、それ以外のMSC由来の線維芽細胞はばらばらに散在するだけで、臨床的な膵癌の形態を模倣する事は無かった。AD-MSC-1(F0)由来のCAFを第一世代(F1)、第一世代(F2)と単離しそれをCaPan1と混合移植した所、腫瘍増生能はF0,F1,F2と徐々に弱くなる事が明らかになった。CAFマーカーであるACTA2, FAP, FSP-1, Vimentin, PDGFRB, Col11A1を定量PCRで解析した所、F0, F1, F2と癌による教育が進むにつれCAFマーカーは高くなっていく傾向を示した。

一言にCAFと言ってもそのソースになり得るMSCにも一定の要件が必要である事が解った。CAFは腫瘍に対しては促進的に働くと考えられるが、CAFの継代が進むにつれてその役割は弱くなる傾向があり、今後のCAFの糖鎖解析においては、Fresh-CAFとsilent-CAFに分けて解析していく必要性を明らかに出来た。

非常に競争の激しい分野で、成果の英文論文発表まで、成果の詳細については公表を控えさせていただきます。

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者に
は下線)

[雑誌論文] (計4件)

1. Shimomura O., Oda T., Tateno H., Ozawa Y., Kimura S., Sakashita S., Noguchi M., Hirabayashi J., Asashima M., Ohkohchi N. A Novel Therapeutic Strategy for Pancreatic Cancer: Targeting Cell Surface Glycan Using rBC2LC-N Lectin-Drug Conjugate (LDC). Molecular cancer therapeutics vol.17, pp183-195, 2018 doi: 10.1158/1535-7163.Mct-17-0232

2. Miyamoto R., Oda T., Hashimoto S., Kurokawa T., Kohno K., Akashi Y., Ohara Y., Yamada K., Enomoto T., Ohkohchi N. Platelet x CRP Multiplier Value as an Indicator of Poor Prognosis in Patients With Resectable Pancreatic Cancer. Pancreas vol.46, pp35-41, 2017 doi: 10.1097/mpa.0000000000000697

3. Ohara Y., Oda T., Hashimoto S., Akashi Y., Miyamoto R., Enomoto T., Satomi K., Morishita Y., Ohkohchi N.

Pancreatic neuroendocrine tumor and solid-pseudopapillary neoplasm: Key immunohistochemical profiles for differential diagnosis. World J Gastroenterol vol.22, pp8596-8604, 2016 doi: 10.3748/wjg.v22.i38.8596

4. 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 vol.107, pp514-520, 2016 doi: 10.1111/cas.12888

[学会発表] (計9件)

1. AACR(米国癌学会総会) 2018 Osamu Shimomura, Tatsuya Oda, Hiroaki Tateno, Yusuke Ozawa, Sota Kimura, Shigo Sakashita, Jun Hirabayashi, Masayuki Noguchi, Makoto Asashima, Nobuhiro Ohkohchi Novel therapeutic strategy for pancreatic cancer with lectin drug conjugate (LDC) ~ the Efficacy and pilot Safety test, 2018 Chicago

2. 第118回日本外科学会定期学術集会 下村 治, 小田 竜也, 舘野浩章, 小澤祐介, 木村 壮太, 坂下信悟, 野口雅之, 平林 淳, 浅島 誠, 大河内信弘 レクチン薬剤複合体を用いた膵癌細胞表面糖鎖をターゲットにした新規癌治療 2018年 東京

3. 第72回日本消化器外科学会総会 下村 治, 小田 竜也, 舘野浩章, 平林 淳, 鄭 允文, 大河内信弘 糖結合タンパク「レクチン」をキャリアーとした新規癌治療法の開発 2017年7月 金沢

4. AACR(米国癌学会総会) 2017 Tatsuya Oda, Osamu Shimomura, Hiroaki Tateno, Yusuke Ozawa, Jun Hirabayashi and Nobuhiro Ohkohchi. Application of a lectin as a drug carrier for glycan-targeting cancer therapy 2017-Apr Washington DC

5. AACR(米国癌学会総会) 2017 Yusuke Ozawa, Tatsuya Oda, Osamu Shimomura, Hiroaki Tateno, Jun Hirabayashi Nobuhiro Ohkohchi Pancreatic cancer specific glycosylation survey by a panel of lectin staining; Tn antigen exposure as a result of o-glycan truncation. 2017-Apr Washington DC

6. 第75回日本癌学会学術総会 小田 竜也, 下村 治, 舘野浩章, 平林 淳, 野口雅之, 浅島 誠, 大河内信弘 ポスト抗体医薬としてのがん糖鎖標的レクチンートキシン：膵

癌の播種性転移治療を実用化する新規治療戦略 2016年10月 横浜

7. 第75回日本癌学会学術総会 下村 治、小田竜也、舘野浩章、小澤佑介、野口雅之、浅島 誠、大河内信弘 高密度レクチンマイクログレイを用いた膵癌幹細胞の糖鎖発現解析、未分化iPS細胞との偶然一致 2016年10月 横浜

8. 第35回日本糖質学会年会 小田竜也、舘野浩章、山本一夫変貌するレクチン科学と医療応用 2016年09 高知

9. 第71回日本消化器外科学会総会 下村 治、小田竜也、舘野浩章、小澤佑介、稲垣勇紀、鄭 允文、平林 淳、浅島 誠、大河内信弘 膵癌幹細胞とiPS細胞の類似性：網羅的糖鎖発現解析から偶然に炙りだされた共通性, 2016年07月 徳島

〔産業財産権〕

○出願状況（計1件）

名称：がん細胞の検出方法、がん細胞内に物

質を導入するための試薬、及びがん治療用組

成物

発明者：舘野浩章，平林淳，浅島誠，小田竜

也，大河内信弘，下村治

権利者：同上

種類：国際出願

番号：PCT/JP2016/079577

出願年月日：2016年10月5日

国内外の別：外国

種類：各国移行

番号：米国：US 15/759288

出願年月日：2018年3月12日

国内外の別：外国

種類：各国移行

番号：欧州：16853603.5

出願年月日：2018年3月13日

国内外の別：外国

○取得状況（計0件）

〔その他〕

ホームページ等

<http://www.md.tsukuba.ac.jp/clinical-med/ge-sur>

g/

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・

幹細胞工学研究センター・間葉系幹細胞

ダイナミクス研究チーム

研究者番号：20396526

舘野 浩章 (TATENO Hiroaki)

国立研究開発法人・産業技術総合研究所・

創薬基盤研究部門・主任研究員

研究者番号：30450670

(3)連携研究者

平林 淳 (HIRABAYASHI Jun)

国立研究開発法人・産業技術総合研究所・

幹細胞工学研究センター・糖鎖レクチン工

学研究チーム・首席研究員・研究チーム長

研究者番号：40156691

石井 源一郎 (ISHII Genichirou)

独立行政法人・国立がん研究センター・

臨床腫瘍病理部・室長

研究者番号：00270869

大河内 信弘 (OHKOHCHI Nobuhiro)

筑波大学・医学医療系・教授

研究者番号：40213673