

令和 5 年 6 月 5 日現在

機関番号：16101

研究種目：基盤研究(C)（一般）

研究期間：2020～2022

課題番号：20K08387

研究課題名（和文）膵がん幹細胞を標的とした新たな光免疫療法の開発

研究課題名（英文）Photoimmunotherapy targeting pancreatic cancer stem cell

研究代表者

六車 直樹（MUGURUMA, Naoki）

徳島大学・大学院医歯薬学研究部（医学域）・徳島大学専門研究員

研究者番号：90325283

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）：ヒト膵癌症例に超音波内視鏡検査下に針生検を行い、得られたサンプルから膵がんオルガノイドの培養に成功した。細胞イメージングでがん幹細胞のマーカーであるLGR5の発現を確認した。ヌードマウスの皮下に移植し、小動物モデルの作成に成功した。光免疫治療の効果を確認するため、代用モデルとして消化管間質腫瘍を移植したヌードマウスを用いて光免疫治療を施行した。コントロール群では腫瘍が増大したのに対し、治療群では腫瘍の消滅が確認された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

膵癌において、ヒト膵癌検体から同定されたがん幹細胞マーカーを標的とする光免疫治療の治療体系が確立すれば、膵癌患者の予後やQOLを大きく改善する革新的な治療となる。また、本法が確立されれば、他癌腫への応用も期待できることから、医療効率や医療経済に大きな利益をもたらすことが予想される。

研究成果の概要（英文）：Pancreatic cancer organoid was successfully established from human pancreatic cancer by needle aspiration under endoscopic ultrasound. An expression of LGR5, a marker of cancer stem cell was confirmed by immunofluorescence cell imaging. Pancreatic cancer organoid was then implanted into a nude mouse and pancreatic cancer stem cell bearing mouse model was created. Photoimmunotherapy was conducted for tumor bearing mouse and tumor was disappeared in the therapy group, while tumor progressed in control group.

研究分野：分子イメージング

キーワード：がん幹細胞 光免疫療法 オルガノイド マウスモデル

1. 研究開始当初の背景

超高齢化社会を迎えたわが国では膵癌による死亡者数は年々増加している。膵癌は早期発見が非常に難しいことで知られ、実に **8** 割が切除不能の状態で見られる。膵癌に対する化学療法の役割は非常に大きい、使用可能な薬剤の選択肢が限られており、それらの奏効率も低い。そのため、膵癌全体の **5** 年生存率は **9.2%**、ステージ **IV** においては実に **1.4%** と、全ての癌種の中で最も低く、ほとんどの症例で根治が得られていないのが現状である。膵癌の予後を改善し、根治をめざすための新しい治療戦略を開発する必要性が高まっている。

近年、がんの治療抵抗性や再発・転移に大きく関わる因子の **1** つとして「がん幹細胞」が注目されている。がん幹細胞は、幹細胞の特徴である「自己複製能」と「多分化能」を有しており、がん組織中で自己と同一の細胞を複製しながら維持を続け、分化した周辺の大多数のがん細胞の供給源と考えられている。また、このがん幹細胞は**(1)**細胞周期の回転が遅いか **G0** 期にあるため、増殖抑制を標的とした治療が効きにくい、**(2)**トランスポーターなど薬剤排出機構が発達している、**(3)**薬剤耐性を獲得することなどから、治療抵抗性に重要な役割を果たしていると考えられている。つまり、化学療法により大部分の分化したがん細胞を除いても、ごく少数のがん幹細胞が生存していれば再発が起こりうることとなる。したがって、膵がん幹細胞を標的として除去することができれば、癌の転移や薬剤耐性にも有用な治療法の開発につながることを期待される。

佐藤 (Sato-T, et al. Nature 2011) らにより開発された新しいオルガノイド培養技術により、たった一つの幹細胞から生体内の組織に類似した構造を培養皿や移植マウスで再現することが可能となった。がんオルガノイドを解析することで、がん幹細胞の起源や発生、標的治療の可能性についても検討され始めている。近年、**EUS-FNA** 検体より得られた膵癌組織より膵癌オルガノイド株を樹立できることが報告されている (Seino-T, et al. Cell Stem Cell 2018)。

米国 NIH の小林らは、抗体の持つ抗原結合特異性の高さを利用し、抗体を標識した光感受性基質に近赤外光の照射を行うことで特定の細胞を死滅させる「光免疫療法 (photoimmunotherapy: PIT)」を報告した (Mitsunaga M, et al. Nat Med 2011)。本法は、正常細胞に損傷を与えることなく、がん細胞のみを超選択的に破壊できる、画期的低侵襲治療法であり、各種癌を標的とした臨床試験が始まっている。

従来の殺細胞性あるいは分子標的薬剤とは異なる機序に基づくこの **PIT** をがん幹細胞に応用することができれば、がんの転移や再発の防止にも有用な新たな治療法の確立が期待できる。

2. 研究の目的

本研究の目的は将来的なヒト臨床応用を見すえた膵がん幹細胞に対する光免疫療法の基礎的検討を行うことである。

(1)オルガノイド培養技術を用い、多数例からの膵癌オルガノイドライブラリーを樹立してがん幹細胞を同定し、膵癌におけるがん幹細胞マーカーを特定する。**(2)**その分子を標的とするモノクローナル抗体と近赤外領域の蛍光標識物質を結合させ、膵がん幹細胞の分子イメージングを行う。**(3)**膵癌オルガノイドをヌードマウスに皮下移植し、標識抗体を静脈投与して **PIT** を行うことで、低侵襲かつがん幹細胞の標的治療による再発阻止を可能とし、これまでにない新たな治療体系を確立する。

3. 研究の方法

(1) 膵癌オルガノイドライブラリーの作成

徳島大学病院で新規に進行膵癌と診断した患者を対象に、**EUS-FNA** で癌組織を採取する。採取した組織を用い、最小培養液においてスフェロイド形成が確認されたオルガノイドを候補として保管する。

(2) 膵癌オルガノイドのがん幹細胞マーカー発現評価

樹立したオルガノイドの **RNA** を回収し、膵がん幹細胞マーカーとして可能性のある **CD133**、**CD24**、**CD44**、**CXCR4**、**EpCAM**、**ABCG2**、**c-Met**、**ALDH-1**、**nestin**、**ESA** など関連する約 **20** 分子を含めた **mRNA** 発現をデジタル **PCR** にて評価する。免疫蛍光染色で高発現の分子を **2-3** 個選ぶ。

(3) 蛍光標識抗体の作製および **in vitro** 評価

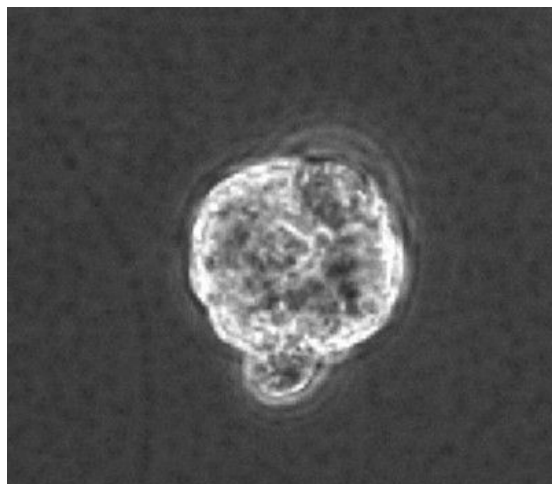
同定された膵がん幹細胞のマーカーに対するモノクローナル抗体と近赤外光色素を結合させ、何通りかの標識抗体を作製する。光治療に伴う効果を予測し、治療効率の高い化合物を選択する。

(4) **4. in vivo** 分子イメージングおよび小動物による光免疫療法

ヌードマウス (**BALB/c nu/nu**) を用いて、膵癌オルガノイドを皮下移植し、腫瘍が **5-10mm** に発育した際に標識抗体を尾静脈より注射して近赤外線照射による治療を行う。コントロール群と比較し、その効果を評価する。

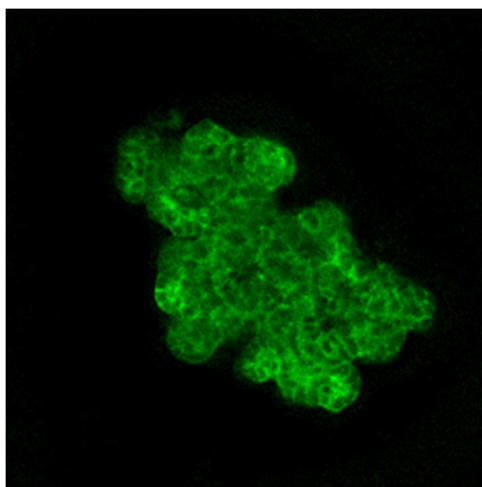
4. 研究成果

(1) 膵癌オルガノイドライブラリーの作成



嚢胞性膵腫瘍を含む7症例において、オルガノイドの樹立が可能であった。

(2) 膵癌オルガノイドのがん幹細胞マーカー発現評価



がん幹細胞マーカーである **LGR5** の発現が免疫蛍光染色で確認された。

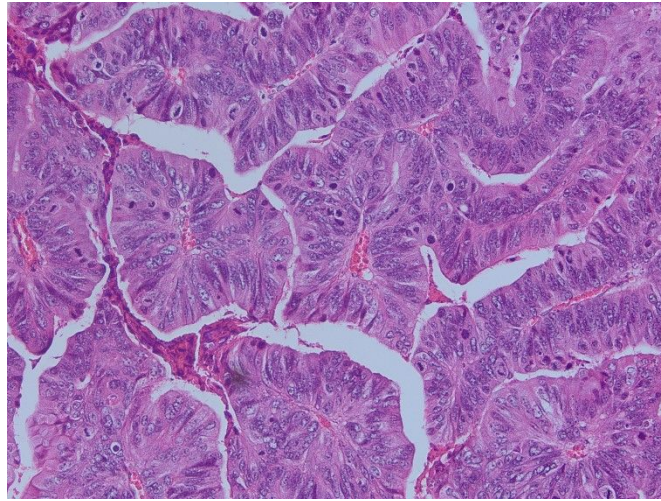
(3) 蛍光標識抗体の作製および **in vitro** 評価

同定された膵がん幹細胞のマーカーに対するモノクローナル抗体と近赤外光色素を結合させ、何通りかの標識抗体を作製した。光治療に伴う効果を予測し、治療効率の高い化合物を選択した。

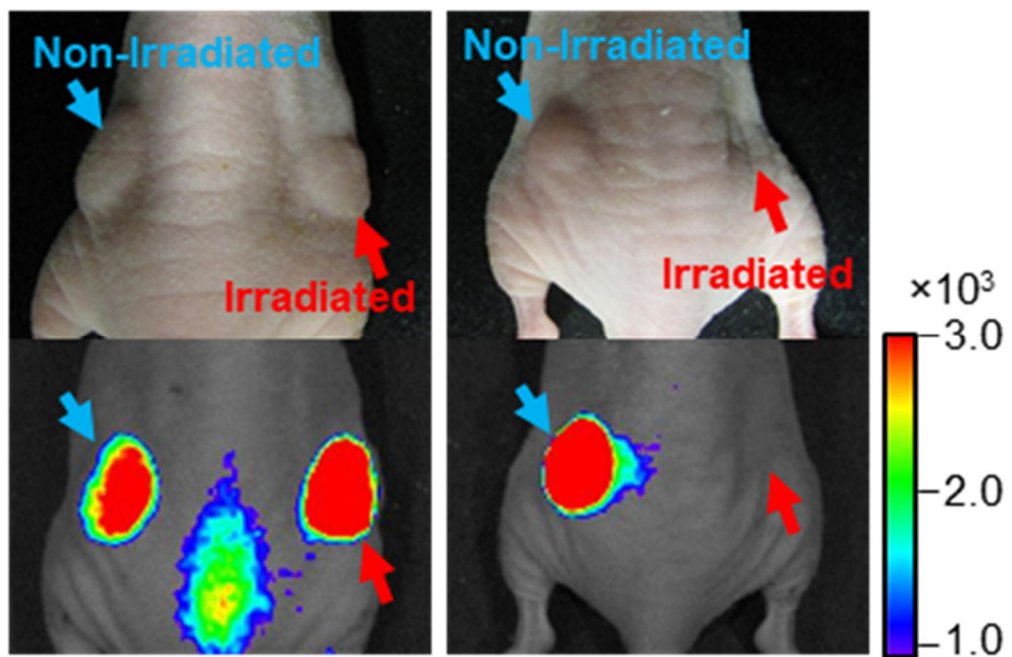
(4) **in vivo** 分子イメージングおよび小動物による光免疫療法



オルガノイド皮下移植ヌードマウスモデルの作製に成功した。



皮下移植された腫瘍が組織学的にがんであることを確認した。



他の腫瘍モデルで治療を行った結果、**PIT** 施行群で有意な腫瘍消失効果が得られた。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計1件（うち査読付論文 1件 / うち国際共著 0件 / うちオープンアクセス 1件）

1. 著者名 Tsuji Daisuke, Nakayama Atsushi, Yamamoto Riko, Nagano Shuji, Taniguchi Takashi, Sato Ryota, Karanjit Sangita, Muguruma Naoki, Takayama Tetsuji, Itoh Kohji, Namba Kosuke	4. 巻 6
2. 論文標題 1,3a,6a-Triazapentalene derivatives as photo-induced cytotoxic small fluorescent dyes	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 Communications Chemistry	6. 最初と最後の頁 37 ~ 37
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1038/s42004-023-00838-0	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	高山 哲治 (TAKAYAMA Testuji) (10284994)	徳島大学・大学院医歯薬学研究部（医学域）・教授 (16101)	
研究分担者	佐野 茂樹 (SANO Shigeki) (20226038)	徳島大学・大学院医歯薬学研究部（薬学域）・教授 (16101)	
研究分担者	佐藤 康史 (SATO Yasushi) (80343383)	徳島大学・大学院医歯薬学研究部（医学域）・特任教授 (16101)	

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