

令和 4 年 6 月 22 日現在

機関番号：13201

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2019～2021

課題番号：19K09139

研究課題名(和文) 血液循環癌幹細胞の免疫応答回避制御による新たな膵癌治療法の確立

研究課題名(英文) Establishment of a new treatment for pancreatic cancer by controlling immune response avoidance of blood circulation cancer stem cells

研究代表者

吉岡 伊作 (YOSHIOKA, Isaku)

富山大学・学術研究部医学系・特命講師

研究者番号：30436430

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)：膵癌切除標本より組織を採取し初代培養細胞を作成、低親和性神経成長因子受容体とDNA選択的染色試薬を組み合わせp75NTR陽性/G0G1細胞をセルソーターを用いて分離し静止期癌幹細胞を同定した。癌幹細胞形質の検証に幹細胞関連分子、上皮間葉転換関連分子、薬剤耐性分子の発現をRT-PCRおよび免疫細胞染色にて確認した。セルソーターを用いて標的細胞を分離し幹細胞関連分子、上皮間葉転換関連分子、薬剤耐性分子の発現をRT-PCRおよび免疫細胞染色にて検出し癌幹細胞形質を検証した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

浸潤性膵管癌は最難治癌であり、罹患者数、死亡率ともに増加傾向である。今回これまでの知見や技術を用いて、最難治癌である膵癌を標的とした反応性T細胞の分離とT細胞受容体遺伝子および特異的抗体遺伝子の取得に基づいたCTSCにおける特異的免疫回避機構を解析することで遠隔転移を制御する新たな免疫治療標的を探索する本基礎研究は膵癌の遠隔転移を制御することで治療成績を革新的に進歩させることをその目的とし、基礎的、実用的な重要な貢献を果たす意義があると考えられる。

研究成果の概要(英文)：Tissues were collected from pancreatic cancer resected specimens to prepare primary cultured cells, and p75NTR-positive / G0G1 cells were isolated using a cell sorter by combining a low-affinity nerve growth factor receptor and a DNA-selective staining reagent to identify quiescent cancer stem cells. For the verification of cancer stem cell traits, the expression of stem cell-related molecules, epithelial-mesenchymal transition-related molecules, and drug-resistant molecules was confirmed by RT-PCR and immune cell staining. Target cells were separated using a cell sorter, and the development of stem cell-related molecules, epithelial-mesenchymal transition-related molecules, and drug-resistant molecules was detected by RT-PCR and immune cell staining to verify cancer stem cell traits.

研究分野：膵臓外科

キーワード：膵癌 血液循環癌幹細胞 免疫応答回避

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

浸潤性膵管癌は最難治癌であり、罹患者数、死亡率ともに増加傾向である。申請者らはこれまで大学消化器外科講座として多数の癌切除検体および抹消血液検体を用いて、食道癌、乳癌、胆嚢癌などで静止期癌幹細胞および血液循環癌幹細胞 (CTSC) を同定分離し、細胞制御因子の機能解析を可能としてきた (基盤研究C-15K10088)。今回これまでの知見や技術を用いて、最難治癌である膵癌を標的とした反応性T細胞の分離とT細胞受容体遺伝子および特異的抗体遺伝子の取得に基づいたCTSCにおける特異的免疫回避機構を解析することで遠隔転移を制御する新たな免疫治療標的を探索する基礎研究を計画した。さらにリキッドバイオプシーとしての抹消血液循環癌幹細胞検出法を開発することで浸潤性膵管癌に対するテーラーメイド免疫療法の確立および臨床応用を目指す。難治である膵癌の遠隔転移を制御することで治療成績を革新的に進歩させることを研究目的とし、同分野に基礎的、実用的な重要な貢献を果たす研究課題と考える。

2. 研究の目的

膵癌細胞を対象として静止期癌幹細胞およびCTSCを同定分離し、癌幹細胞特異的T細胞を採取することで特異的抗体遺伝子およびTCR遺伝子を取得する。さらに癌幹細胞特異的免疫回避機構の解析に基づき新規治療標的を探索し、同時に遺伝子スクリーニングとしてのCTSC検出法を開発する。

3. 研究の方法

浸潤性膵管癌切除標本を用いた静止期癌幹細胞の同定・分離

浸潤性膵管癌切除標本より組織を採取し初代培養細胞を作成する。培養による癌細胞の形質変化を最小限にとどめるため、無血清培地を用いた培養細胞樹立と免疫不全マウス皮下移植を介した細胞採取を行う。採取した癌細胞を用いて、低親和性神経成長因子受容体 (p75NTR、CD271) とDNA選択的染色試薬を組み合わせp75NTR陽/G0G1細胞をセルソータを用いて分離し静止期癌幹細胞を同定する。この分離法は申請者らが独自に開発したものであり「静止期癌幹細胞の効率的分離方法」として特許を出願しており (特願2017-028150)、同法を用いた食道癌幹細胞分離と機能解析を報告している (Int J Oncology 2017)。癌幹細胞形質の検証には幹細胞関連分子 (Nanog, p63, Bmi1)、上皮間葉転換関連分子 (Ecadherin, N-cadherin, fibronectin)、薬剤耐性分子 (ERCC, ABCG2) の発現をRT-PCRおよび免疫細胞染色にて確認する。またコロニー形成能、spheroid形成能、マウス皮下移植腫瘍形成能および抗癌剤耐性を評価する。申請者らはこれら幹細胞形質解析手法に習熟しており食道扁平上皮癌や胃癌における幹細胞同定と機能解析を報告している (Oncogene 2003, Clinical Cancer Res 2006, Stem Cells 2009, Cancer Res 2010, Inter J Oncology 2016)。また癌細胞の培養を介さずに癌細胞から直接、癌幹細胞や腫瘍浸潤リンパ球などの間質細胞を採取する工程や次項目のCTCの検出を視野に入れ、EGFRやPLS3などEMTによって変化しない上皮マーカー (Cancer Res 2013) をEpCAMに置き換えて細胞を分離し、より高い癌幹細胞形質をもつ細胞フラクションを検出するマーカーセットを探索する。

フローサイトメトリーを用いたCTCの検出と分離

上記の切除標本の症例について、術前の抹消血液を採取しフローサイトメトリーによってp75NTRの発現を検出する。これまでに血液に混和した培養細胞を用いた予備実験によって遠心

分離媒体を用いた単核球層分離とゲート設定を行い、癌細胞の検出精度を確認している (Method Mol Biol 2017)。本研究ではEpCAM/p75NTRに前記にて検出したマーカーを組み合わせ、フローサイトメトリーを用いて標的細胞を検出し臨床病理学悪性度との相関を検出する。特にEGFRやPLS3など、EMTによって変化しない上皮マーカー (CancerRes 2013) をEpCAMに置き換えた検出を同時に行い、症例の臨床病理学的因子との相関を比較することで転移責任細胞分画の検出精度を高める。さらにセルソータを用いて標的細胞を分離し幹細胞関連分子、上皮間葉転換関連分子、薬剤耐性分子の発現をRT-PCRおよび免疫細胞染色にて検出し癌幹細胞形質を検証する。生細胞の分離培養については細胞外質や線維芽細胞との混和および免疫不全マウス皮下移植を用いる。申請者らは既にAlpha SMA陽性癌関連線維芽細胞の調整と少数癌細胞フラクションとの共移植による免疫不全マウス皮下腫瘍形成モデルを作成している。

微小流路デバイスを用いたCTSCの検出と分離

上記切除標本採取症例について術前の抹消血液からポリマーマイクロ流体チップおよびCTC補足システム (BiomedicalMicrodevices 2013) を用いて前述の癌幹細胞マーカー発現細胞を補足する (図4)。補足細胞の遺伝子解析を目的にトリプシンやパピンをを用いた抗体の切断や細胞生物学的解析を目的に半固定コロイドを用いて生細胞を回収するなど精度向上および効率的な細胞回収に向けた改良を行う。さらに微小流路デバイスを用いたCTSC検出・分離と前述のフローサイトメトリーを用いた検出・分離とをその精度および汎用性において比較・評価する。

癌幹細胞反応性T細胞の単一細胞レベルでの分離と特異的抗体遺伝子およびT細胞受容体 (TCR) 遺伝子の取得

本学では、ヒト血液中リンパ球の1/1000以下といわれる癌抗原特異的キラーT細胞一個から抗体遺伝子やT細胞受容体 (TCR) 遺伝子を取得するシステム (hTEC10) を開発しており (Nature Medicine 2013)、癌部および抹消血液からCD8+T細胞をセルソータを用いて分離、培養し、
によって分離した癌幹細胞および、
にて分離したCTSCと接触させたのち、癌幹細胞反応性T細胞を活性化マーカーであるCD137およびPD-1発現をもとに単一細胞レベルで分離する。続いて、hTEC10システムを応用しTCR遺伝子を取得・増幅し、発現ベクターを作成し、末梢血T細胞に導入することで、癌幹細胞特異的キラーT細胞を増幅し、抗原特異性を検証する。

4. 研究成果

浸潤性膵管癌切除標本より組織を採取し初代培養細胞を作成、採取した癌細胞を用いて、低親和性神経成長因子受容体 (p75NTR、CD271) とDNA選択的染色試薬を組み合わせてp75NTR陽性/G0G1細胞をセルソータを用いて分離し静止期癌幹細胞を同定。癌幹細胞形質の検証に幹細胞関連分子 (Nanog, p63, Bmi1)、上皮間葉転換関連分子 (E-cadherin, N-cadherin, fibronectin)、薬剤耐性分子 (ERCC, ABCG2) の発現をRT-PCRおよび免疫細胞染色にて確認中である。またセルソータを用いて標的細胞を分離し幹細胞関連分子、上皮間葉転換関連分子、薬剤耐性分子の発現をRT-PCRおよび免疫細胞染色にて検出し癌幹細胞形質を検証してした。補足細胞の遺伝子解析を目的にトリプシンやパピンをを用いた抗体の切断や細胞生物学的解析を目的に半固定コロイドを用いて生細胞を回収するなど精度向上および効率的な細胞回収に向けた改良を行い、さらに微小流路デバイスを用いたCTSC検出・分離と前述のフローサイ

トメトリーを用いた検出・分離とをその精度および汎用性において比較・評価した。各データの解析を行い、いくつかの興味深いものがあるが発表に足る結果は研究終了時に至るまで得ることができず、今後も継続していきたい。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔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	奥村 知之 (Okumura Tomoyuki) (10533523)	富山大学・学術研究部医学系・講師 (13201)	
研究分担者	藤井 努 (FUJII Tsutomu) (60566967)	富山大学・学術研究部医学系・教授 (13201)	

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