

令和 6 年 6 月 4 日現在

機関番号：14401

研究種目：基盤研究(C)（一般）

研究期間：2021～2023

課題番号：21K08709

研究課題名（和文）新次元の治療を目指した癌細胞と癌微小環境との相互作用の解明

研究課題名（英文）Exploring the Interaction Between Cancer Cells and the Cancer Microenvironment Aimed at Novel Therapies

研究代表者

藤野 志季 (Fujino, Shiki)

大阪大学・大学院医学系研究科・招へい教員

研究者番号：10768956

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）：臨床における癌の多様性の構築、また癌幹細胞の維持には、生体内において腫瘍を取り巻く癌微小環境が複雑な相互作用の中で重要な役割を果たすものと考えられる。これまでの研究で確立した、幹細胞性の高い集団を高率に維持培養した初代培養細胞の擬時系列解析から、免疫抑制分子が幹細胞マーカーとともに発現していることを特定した。癌幹細胞は免疫抑制分子を発現することにより、自己免疫から逃れて転移を引き起こしている可能性がある。また、免疫を逃れた癌幹細胞が他臓器転移を引き起こす際の最初の段階として必要な細胞間の接着を、Wntシグナル経路の阻害により抑制できることを解明し、新たな治療ターゲットとなり得る事を示唆した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究においては、癌微小環境の解析から癌の転移・増殖において重要な役割を担う幹細胞が自己の免疫反応を回避できるような免疫抑制分子を発現していることを特定した。また、免疫を逃れた癌幹細胞が他臓器転移を引き起こす際の最初の段階として必要な細胞間の接着を、Wntシグナル経路の阻害により抑制できることを解明した。癌の転移のメカニズムの新たな側面を解明し、新次元の治療につながる可能性を示した。

研究成果の概要（英文）：The cancer microenvironment surrounding the tumor play an important role in the establishment of cancer diversity in clinical situation and in the maintenance of cancer stem cells in complex interactions. Pseudo-time analysis of primary cultured cells of highly stem-cellular populations in highly maintained cultures, established in previous studies, identified the expression of immunosuppressive molecules together with stem cell markers. By expressing immunosuppressive molecules, cancer stem cells may escape autoimmunity and cause metastasis. The study also showed that inhibition of the Wnt signalling pathway can suppress cell-cell adhesion, which is required as the first step for cancer stem cells that have escaped immunity to cause metastasis to other organs, suggesting that it may be a new therapeutic target.

研究分野：大腸癌

キーワード：大腸癌 幹細胞 初代培養 免疫

様式 C - 19、F - 19 - 1 (共通)

1. 研究開始当初の背景

がん治療において問題となるのは外科的切除等の根治治療後の再発や転移を来す状況である。遠隔転移はがん細胞が原発巣を離れ、血流によって他の臓器に広がってしまった状況であり、完治を望むことが極めて難しい。この状況に対して、現在の標準的治療法は化学療法や放射線治療で癌細胞そのものをターゲットとした治療が主体であったが、近年、PD1/PDL1 阻害薬による治療など、癌を取り囲む環境をコントロールすることで良好な予後を得られる可能性が出てきた。そこでわれわれは、実際の個体内におけるがんのミニチュアモデルとなるような多様性をもつ生きたがん組織を構築し、これを研究や治療法の開発に用いることができないかと考えた。このがんのミニチュアモデル = がん患者のアバターを確立していく中で、生体内の癌組織を解明し、新規の治療へつなげていくためには、「がん細胞」のみならず腫瘍組織を構成する微小環境にも再度注目する必要があると考えた。また、細胞株をマウスに移植した際に得られる腫瘍は、臨床の癌組織とは全く異なる組織像であるが、我々の樹立した初代培養細胞 (iCCs) は、シングルセルからでもマウスの間質細胞や血管組織を内部に構築し、病理組織像においては、癌微小環境を含む生体内の癌組織を完全に再現しえた。このマテリアルを用いることで、新次元で、癌と周囲の組織の相互作用の解明に迫ることができるのではないかと考えた。

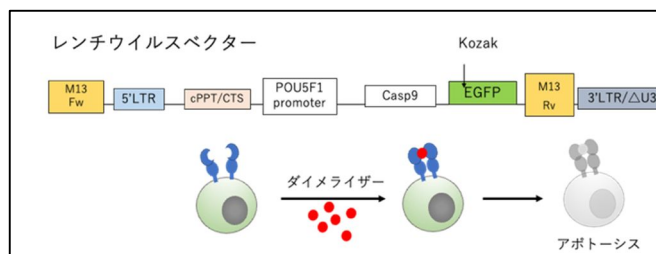
2. 研究の目的

癌細胞と癌微小環境の相互作用を解析し、新たな治療標的を探索する。

3. 研究の方法

周囲環境との相互作用の解析のために OCT4 陽性細胞 (癌幹細胞) の挙動をより厳密にコントロールすべく、ダイメライザーにて OCT4 発現細胞に選択的にカスパーゼ 9 を誘導し細胞死を誘導するシステムを構築してきた。(下図)

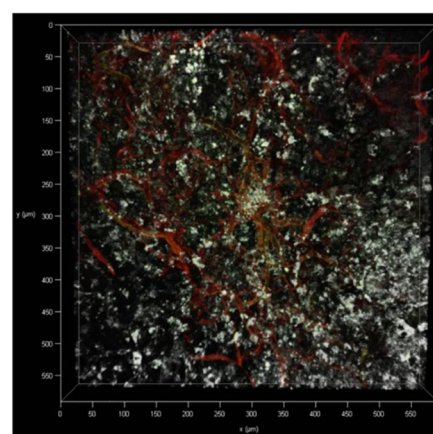
本研究ではこれらの構築した細胞を用いて、さらに生体内における相互作用の解明を行う。マウスに移植し、増殖、浸潤時の周囲組織との関係をリアルタイムにて捉え、細胞挙動について解析を行う。特定された細胞集団にてシングルセル解析を行い、治療標的となり得る重要な分子について解析し、それを *in vitro*, *in vivo* にても実証する。



4. 研究成果

作製した OCT4 発現細胞をマウスの脳に移植し、生体内イメージング解析系を用いて、iCC がどのように血管や周囲の間質組織を引き込んで、臨床の腫瘍像を構築していくかの観察を試みた。しかしながら、OCT4 発現細胞は非常に少ない集団であり、リアルタイムでの構築は困難であった。わずかに、OCT4 発現細胞がその発現を保ったまま、血管内へと侵入していることが確認された(図 1)。これは、大腸癌の幹細胞マーカーであると報告されている LGR5 発現細胞とは異なった挙動であった。さらに、赤色蛍光にて標識させた iCC を作製し、マウス腫瘍モデルより、ヒト iCC 由来細胞 (癌細胞) と、マウス由来細胞 (癌微小環境を構成する細胞) を明確に分離し、これらをシングルセル RNA シー

図 1. 生体内イメージング解析



ケンスにて解析したところ、幹細胞性の高い集団、治療抵抗性の高い集団が同定された。また、癌細胞の疑似系列解析により、腫瘍組織が構築される上で重要となる分子として免疫抑制分子が幹細胞マーカーとともに発現していることを特定した。通常、免疫抑制分子は制御性 T 細胞に発現するとされるが、癌における発現をタンパクレベルにて確認した(図2)。癌幹細胞は免疫抑制分子を自ら発現することにより、自己免疫から逃れて転移を引き起こしている可能性があることが示唆された。また、免疫を逃れた癌幹細胞が他臓器転移を引き起こす際の最初の段階として必要なのは細胞間の接着である。Wnt シグナル経路が OCT4 発現細胞にて活性化されていることが確認できた。iPS 細胞から分化した間葉系細胞と上皮系細胞が混合された足場に、Wnt シグナル経路を抑制すると OCT4 発現細胞の接着を抑制できることが確認された(図3)。また、一度接着した細胞も、のちに剥がれることが確認された。In vivo でも同様の事象を確認することができ、Wnt シグナル経路を抑制することにより、接着と組織間で増殖するために不可欠な細胞間競合を阻害していることが示唆された。

これらの結果から、OCT4 発現細胞は血管内へ自ら侵入し、免疫による淘汰を免疫抑制分子を介して回避し、転移先の臓器に接着して広がるという仮説を得た。すなわち、OCT4 発現細胞は血液循環癌細胞として転移を引き起こす細胞である可能性がある。一般的には血液循環癌細胞をとらえる特徴として、大腸癌に多く発現する EpCAM という上皮細胞マーカーや、転移を起こすときに発現しやすいといわれる Vimentin という間葉系細胞マーカーが用いられることが多く、米国 FDA が唯一承認している機械は EpCAM を用いている。しかしながら、EpCAM では取り逃す細胞もあること、血中にあるがん細胞全てが転移再発に関わる訳ではない。臨床の患者血液サンプルを解析した結果、EpCAM 陽性細胞の割合と再発・転移との関係は認められなかったのに対し、POU5F1 陽性細胞の割合が高い群で、高率に再発・転移を認めた(図4)。本研究により、癌幹細胞が免疫細胞や間質細胞などの周囲環境をどのようにコントロールし転移を引き起こしているかの一端を解明し、また新たな治療ターゲットとしての可能性を示した。

図2. 免疫抑制分子(赤)とOCT4(緑)の発現

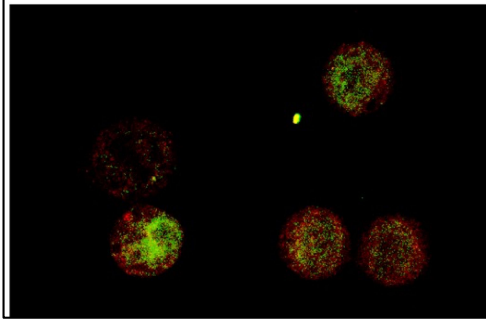


図3. 細胞間競合分子(緑)とiPS(赤)

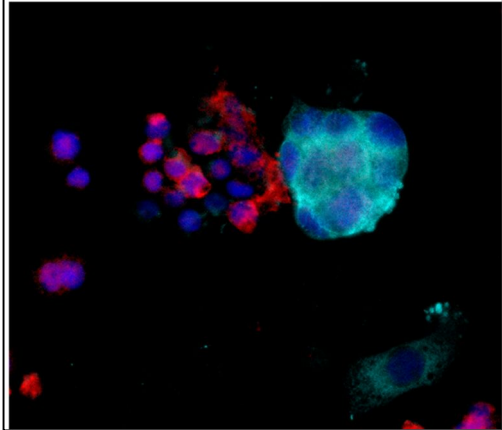
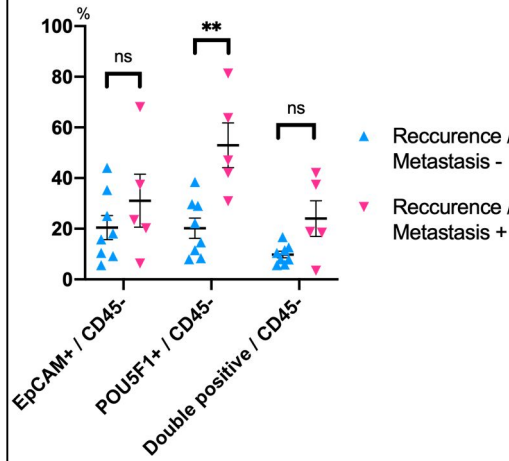


図4



5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計6件（うち査読付論文 6件/うち国際共著 2件/うちオープンアクセス 6件）

1. 著者名 Kitakaze Masatoshi, Fujino Shiki, Miyoshi Norikatsu, Sekido Yuki, Hata Tsuyoshi, Ogino Takayuki, Takahashi Hidekazu, Uemura Mamoru, Mizushima Tsunekazu, Doki Yuichiro, Eguchi Hidetoshi	4. 巻 13
2. 論文標題 Tumor-infiltrating T cells as a risk factor for lymph node metastasis in patients with submucosal colorectal cancer	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 Scientific Reports	6. 最初と最後の頁 2077
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1038/s41598-023-29260-1	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 該当する

1. 著者名 HAYASE SHIMON, MIYOSHI NORIKATSU, FUJINO SHIKI, YASUI MASAYOSHI, OHUE MASAYUKI, MINAMI SOICHIRO, KATO SHINYA, NAGAE AYUMI, SEKIDO YUKI, HATA TSUYOSHI, HAMABE ATSUSHI, OGINO TAKAYUKI, TAKAHASHI HIDEKAZU, UEMURA MAMORU, YAMAMOTO HIROFUMI, DOKI YUICHIRO, EGUCHI HIDETOSHI	4. 巻 42
2. 論文標題 Fibroblast Activation Protein and Tertiary Lymphoid Structure in Colorectal Cancer Recurrence	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Anticancer Research	6. 最初と最後の頁 5897 ~ 5907
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.21873/anticancer.16099	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 該当する

1. 著者名 Fujino Shiki, Miyoshi Norikatsu, Ito Aya, Yasui Masayoshi, Ohue Masayuki, Ogino Takayuki, Takahashi Hidekazu, Uemura Mamoru, Matsuda Chu, Mizushima Tsunekazu, Doki Yuichiro, Eguchi Hidetoshi	4. 巻 19
2. 論文標題 Crenolanib Regulates ERK and AKT/mTOR Signaling Pathways in RAS/BRAF-Mutated Colorectal Cancer Cells and Organoids	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Molecular Cancer Research	6. 最初と最後の頁 812 ~ 822
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1158/1541-7786.MCR-20-0600	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 Fujino Shiki, Miyoshi Norikatsu, Ito Aya, Yasui Masayoshi, Matsuda Chu, Ohue Masayuki, Uemura Mamoru, Mizushima Tsunekazu, Doki Yuichiro, Eguchi Hidetoshi	4. 巻 11
2. 論文標題 HNF1A regulates colorectal cancer progression and drug resistance as a downstream of POU5F1	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Scientific Reports	6. 最初と最後の頁 10363
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1038/s41598-021-89126-2	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 Fujino Shiki, Miyoshi Norikatsu, Ito Aya, Hayashi Rie, Yasui Masayoshi, Matsuda Chu, Ohue Masayuki, Horie Masafumi, Yachida Shinichi, Koseki Jun, Shimamura Teppei, Hata Tsuyoshi, Ogino Takayuki, Takahashi Hidekazu, Uemura Mamoru, Mizushima Tsunekazu, Doki Yuichiro, Eguchi Hidetoshi	4. 巻 6
2. 論文標題 Metastases and treatment-resistant lineages in patient-derived cancer cells of colorectal cancer	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 Communications Biology	6. 最初と最後の頁 1191
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1038/s42003-023-05562-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 Nagae Ayumi, Miyoshi Norikatsu, Fujino Shiki, Horie Masafumi, Yachida Shinichi, Sasaki Masaru, Sekido Yuki, Hata Tsuyoshi, Hamabe Atsushi, Ogino Takayuki, Takahashi Hidekazu, Uemura Mamoru, Yamamoto Hirofumi, Doki Yuichiro, Eguchi Hidetoshi	4. 巻 30
2. 論文標題 Cancer Stem Cells Persist Despite Cellular Damage, Emergence of the Refractory Cell Population	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 Annals of Surgical Oncology	6. 最初と最後の頁 6913 ~ 6924
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1245/s10434-023-13849-x	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6件 (うち招待講演 0件 / うち国際学会 2件)

1. 発表者名 藤野 志季, 武田 和, 團野 克樹, 山本 慧, 東口 公哉, 野口 幸藏, 豊田 泰弘, 平尾 隆文, 岡 義雄, 堀江 真史, 谷内田 真一, 大植 雅之, 土岐 祐一郎, 江口 英利, 三吉 範克
2. 発表標題 Cancer stem cell reproduce treatment-resistant cells
3. 学会等名 第81回日本癌学会学術総会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 三吉 範克, 藤野 志季, 関戸 悠紀, 波多 豪, 浜部 敦史, 荻野 崇之, 高橋 秀和, 植村 守, 山本 浩文, 土岐 祐一郎, 江口 英利
2. 発表標題 Precision medicine using patient-derived organoid and genomic profiling in gastroenterological surgery
3. 学会等名 第81回日本癌学会学術総会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 Shiki Fujino; Aya Ito; Masayoshi Yasui; Chu Matsuda; Masayuki Ohue; Masafumi Horie; Shinichi Yachida; Yuichiro Doki; Hidetoshi Eguchi; Norikatsu Miyoshi
2. 発表標題 Single-cell RNA sequencing of patient-derived organoid reveals treatment-induced tumor resistance through cancer stem cells
3. 学会等名 AACR Annual Meeting 2022 (国際学会)
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 Norikatsu Miyoshi; Shiki Fujino; Yuki Sekido; Tsuyoshi Hata; Takayuki Ogino; Hidekazu Takahashi; Mamoru Uemura; Hirofumi Yamamoto; Yuichiro Doki; Hidetoshi Eguchi
2. 発表標題 Heterogeneity inducible tumor stem cells relate distant metastasis and the treatment resistance
3. 学会等名 AACR Annual Meeting 2022 (国際学会)
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 三吉範克、藤野志季、荻野崇之、高橋秀和、植村守、山本浩文、水島恒和、土岐祐一郎、江口英利
2. 発表標題 癌幹細胞の生み出す腫瘍不均一性と臨床的治療抵抗性の獲得
3. 学会等名 第80回日本癌学会学術集会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 藤野志季、武田和、團野克樹、山本慧、野口幸臈、豊田泰弘、徳永俊照、平尾隆文、杉本圭司、岡義雄、堀江真史、谷内田真一、大植雅之、土岐祐一郎、江口英利、三吉範克
2. 発表標題 2次元培養オルガノイドを利用したシングルセル解析による癌多様性の解明
3. 学会等名 第80回日本癌学会学術集会
4. 発表年 2021年

〔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	木戸屋 浩康 (Kidoya Hiroyasu) (00543886)	大阪大学・微生物病研究所・招へい教授 (14401)	
研究分担者	三吉 範克 (Miyoshi Norikatsu) (20528624)	大阪大学・大学院医学系研究科・助教 (14401)	
研究分担者	伊藤 彩 (Ito Aya) (30864962)	地方独立行政法人大阪府立病院機構大阪国際がんセンター (研究所)・その他部局等・がん医療創生部 非常勤研究員 (84409)	
研究分担者	長江 歩 (Nagae Ayumi) (90850272)	大阪大学・医学部附属病院・医員 (14401)	

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