

令和 6 年 6 月 5 日現在

機関番号：15301

研究種目：挑戦的研究(萌芽)

研究期間：2022～2023

課題番号：22K19529

研究課題名(和文) Oct4陽性肺癌幹細胞マウスモデルの樹立と癌幹細胞を根絶する革新的治療法の開発

研究課題名(英文) Establishment of a mouse model of Oct4-positive lung cancer stem cells and development of innovative therapies to eradicate cancer stem cells

研究代表者

大橋 圭明(Ohashi, Kadoaki)

岡山大学・大学病院・准教授

研究者番号：60729193

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 5,000,000円

研究成果の概要(和文)：癌幹細胞(cancer stem cells: CSCs)は肺癌が薬物療法で根治できない原因として注目されているが、病態は未解明である。本研究は、CSCsマウスモデルを確立しCSCsに対する新規治療標的の同定が目的である。C57/BL6の2型肺胞上皮にEgfr変異を導入したEGFR肺癌マウスモデルと幹細胞マーカーOct4発現をGFPで標識したマウスと交配させた。交配マウスの肺腫瘍からOct4をマーカーとしてCSCsの可能性のある細胞を選別し、生着能、多剤耐性能などCSCsとしての性質を評価した。さらに遺伝子発現解析により、CSCsとその腫瘍微小環境における新規治療標的の同定を試みている。

研究成果の学術的意義や社会的意義

上皮成長因子受容体遺伝子変異を有する肺癌(EGFR肺癌)は、非喫煙者に発生する肺腺癌の半数以上を占める非常に重要な疾患であるが、薬物療法での根治は困難である。免疫チェックポイント阻害薬など腫瘍免疫療法の効果が乏しいタイプであることも知られており、根治を目指す治療戦略の標的として、多分化能と多剤耐性能を持つ癌幹細胞(cancer stem cells: CSCs)の病態を探索することは、革新的な治療法の確立につながる可能性があり非常に意義が高い。

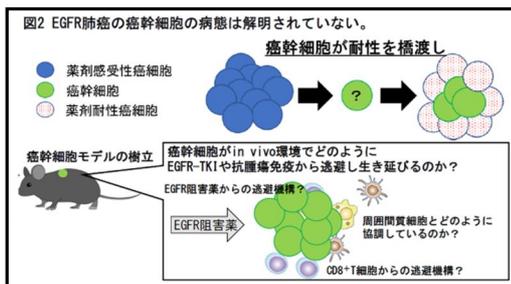
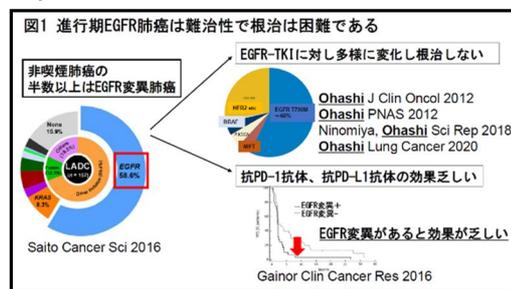
研究成果の概要(英文)：Cancer stem cells (CSCs) have attracted attention as a cause of lung cancer that cannot be cured by drug therapy, but their pathogenesis is not yet understood. The aim of this study was to establish a mouse model of CSCs and to identify novel therapeutic targets against CSCs. Possible CSCs were selected from the lung tumors of the crossbred mice using Oct4 as a marker, and their characteristics as CSCs, such as viability and multidrug resistance, were evaluated. In addition, we will attempt to identify novel therapeutic targets in CSCs and their tumor microenvironment by gene expression analysis.

研究分野：呼吸器の悪性腫瘍

キーワード：非小細胞癌 癌幹細胞 Oct4

### 1. 研究開始当初の背景

上皮成長因子受容体(EGFR)遺伝子変異を有する肺癌(EGFR肺癌)は、非喫煙者に発生する肺腺癌の半数以上を占める非常に重要な疾患であるが、薬物療法での根治は困難である(Ohashi PNAS 2012, Ohashi J Clin Oncol 2012 図1)。多分化能、多剤薬剤耐性をもつ癌幹細胞(cancer stem cells: CSCs)が根治の障壁として重要な役割を担っていると考えられているが、病態は未解明である。また、CSCsのin vivoモデルは確立しておらずCSCsと腫瘍微小環境(TME: tumor microenvironment)の間質細胞・免疫細胞との相互関係についても未解明である(図2)。



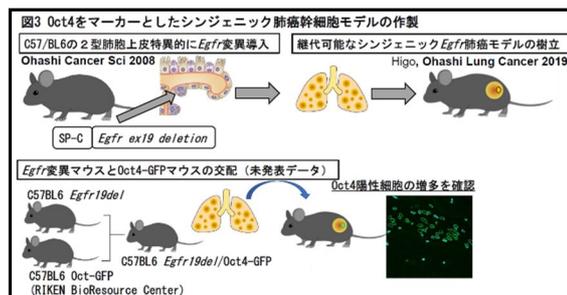
### 2. 研究の目的

CSCsに対する革新的治療の開発に向けた基礎データを確立するため、下記1-3を本研究の目的とした。

1. 正常な免疫能を有するC57/BL6ベースのシンジェニックCSCsモデルを樹立する
2. CSCsとTMEの相互作用を含めた病態の解明、新規治療標的の同定を行う
3. CSCsを標的とした革新的な治療戦略をCSCsマウスモデルで検証する

### 3. 研究の方法

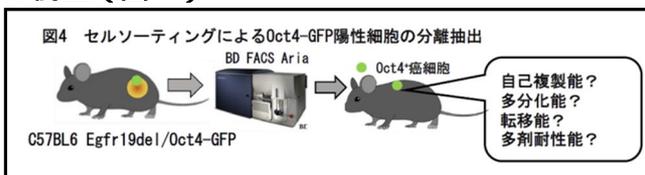
本研究のため、肺組織幹細胞様の働きを持つマウス2型肺胞上皮細胞(AT2)特異的にEgfr変異を発現させた肺癌マウスモデル(C57BL/6Egfr<sup>ex19del</sup>)を樹立し、継代可能なシンジェニックマウスモデルも樹立した(図3)。さらに幹細胞のマスター転写因子の一つであるOct4に着目し、Oct4発現をGFPで標識した遺伝子改変マウス



(RBR00821)(C57BL/6 Oct4-GFP)を理化学研究所より供与を受けた。これらマウスを岡山大学動物資源部門において交配し、交配したマウス(C57BL/6Egfr/Oct4-GFP)の肺腫瘍を用い皮下移植、継代できるシンジェニックマウスを作製した(図3)。腫瘍内のGFP発現を確認したところ、分化した正常組織では発現を認めない多能性マーカーOct4を発現した癌細胞の存在を一定数確認することができた。またEGFR-TKI投与により、Oct4-GFP発現が、細胞質から核内に移行することが蛍光顕微鏡で観察された。期待通り、Oct4を発現した癌細胞をGFPで可視化することに成功した(未発表データ)。

#### i). シンジェニックOct4+CSCsモデルの樹立(図4)

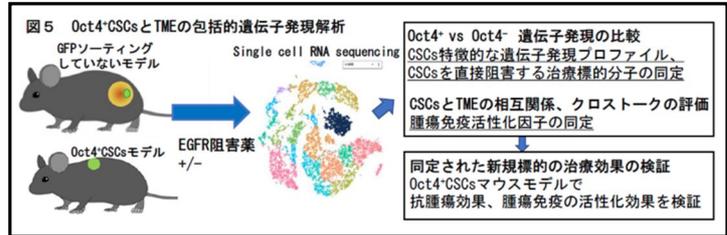
セルソーティングを行い、Oct4-GFP陽性の癌細胞を分離し、in vivoで癌幹細胞の特徴(自己複製能、多分化能、転移能、多剤薬剤耐性)を検証する。



#### ii). Oct4+CSCsマウスモデルを用いた新規治療標的候補の同定(図5) 図5

研究分担者である片山量平(がん研究会基礎研究部部長)と共同で、single cell RNA sequencingによる包括的な遺伝子発現解析を行う。バイオインフォマティクス解析に

より TME を含めた Oct4<sup>+</sup>CSCs 及び Oct4<sup>-</sup>癌細胞組織の「どの細胞( CSCs or 免疫細胞・間質細胞)」に「どのような分子(腫瘍生存シグナル分子 or 免疫チェックポイント分子)」が発現しているのか? を評価する。同定された治療標的の阻害効果(抗腫瘍効果、抗腫瘍免疫の活性化)を in vivo で検証する。



#### 4. 研究成果

FACS aria で GFP を標識として Oct4 陽性細胞をソーティングし、生着能、薬剤耐性能を検討した。GFP 陽性細胞は EGFR 阻害薬に抵抗性があり、また生着能も高い傾向を示した。しかし、GFP 陰性集団にも同様の傾向を示す細胞が存在し、完全な選別するための GFP 陽性のゲーティングの最適化を繰り返している。Oct4 陽性細胞集団の in vivo での培養に成功した後に遺伝子発現解析を行う予定である。

EGFR 肺癌における CSCs の病態は十分解明されておらず、CSCs を根絶する治療戦略は確立していない。現在、CSCs と TME の間質細胞・免疫細胞がどのように協調しているかを評価することができるシンジェニック CSCs モデルは樹立されていない。そのため、CSCs が TME とどのように協調、クロストークし、どのように薬剤や抗腫瘍免疫から逃避しているか? については、十分検討されていない。シンジェニック CSCs モデルの樹立は、CSCs の病態を再定義し、新たな治療標的、治療アプローチの創造に繋がる。TME との相互作用つまり CSCs の生存に重要な間質細胞・免疫細胞および成長因子・ケモカインをできれば、CSCs を直接阻害する治療標的のみならず、間接的に CSCs を阻害する治療標的が新たに同定される。さらに、CSCs が腫瘍免疫から逃避する機構を有しているとすれば、逃避機構を解明することで CSCs を腫瘍免疫で根絶するという新しい治療アプローチを検証できる。CSCs および TME の細胞集団に発現する免疫チェックポイント分子を包括的に探索することで、CSCs に対する抗腫瘍免疫を活性化させる治療標的を同定できる可能性がある。

幹細胞様の機能がある AT2 細胞を起源とするシンジェニック EGFR 肺癌マウスモデルは世界で我々のみ保有している。ヒト型でなくマウス型 Egfr 変異を導入しているため、ヒト EGFR 蛋白に対するマウスの拒絶反応を考慮する必要がない強みもある。本申請は EGFR 肺癌マウスモデルの希少性、独自性もあり、類似の研究が全く行われていない非常に挑戦的な研究と考える。CSCs マウスモデルの確立、新規治療標的スクリーニング、及び CSCs に対する抗腫瘍免疫の活性化に成功した場合、進行期肺癌を根治する革新的な治療戦略の基盤となり、肺癌治療全体に大きな波及効果が期待できる。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計2件（うち査読付論文 0件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 0件）

1. 著者名 Nakasuka T, Ohashi K, Nishii K, Hirabae A, Okawa S, Tomonobu N, Takada K, Ando C, Watanabe H, Makimoto G, Ninomiya K, Fujii M, Kubo T, Ichihara E, Hotta K, Tabata M, Kumon H, Maeda Y, Kiura K.	4. 巻 178
2. 論文標題 PD-1 blockade augments CD8+ T cell dependent antitumor immunity triggered by Ad-SGE-REIC in Egfr-mutant lung cancer.	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 Lung Cancer.	6. 最初と最後の頁 1-10
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.lungcan.2023.01.018	査読の有無 無
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Nishii K, Ohashi K*, Tomida S, Nakasuka T, Hirabae A, Okawa S, Nishimura J, Higo H, Watanabe H, Kano H, Ando C, Makimoto G, Ninomiya K, Kato Y, Kubo T, Ichihara E, Hotta K, Tabata M, Toyooka S, Udono H, Maeda Y, Kiura K.	4. 巻 10(9)
2. 論文標題 CD8+ T-cell responses are boosted by dual PD-1/VEGFR2 blockade after EGFR inhibition in Egfr-mutant lung cancer.	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Cancer Immunol Res.	6. 最初と最後の頁 1111-1126.
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1158/2326-6066.CIR-21-0751.	査読の有無 無
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

〔学会発表〕 計2件（うち招待講演 0件/うち国際学会 0件）

1. 発表者名 西井和也, 大橋圭明, 富田秀太, 中須賀崇匡, 平生敦子, 大川祥, 西村淳, 安東千裕, 槇本剛, 二宮貴一郎, 加藤有加, 久保寿夫, 市原英基, 堀田勝幸, 田端雅弘, 豊岡伸一, 鶴殿平一郎, 前田嘉信, 木浦勝行
2. 発表標題 EGFR阻害が誘導するEgfr肺癌に対する抗腫瘍免疫を逐次的VEGFR-2/PD-1阻害が増強する
3. 学会等名 第63回日本肺癌学会学術集会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 中須賀崇匡, 大橋圭明, 西井和也, 平生敦子, 大川祥, 高田健二, 西村淳, 栗林忠弘, 安東千裕, 西達也, 森田絢子, 槇本剛, 二宮貴一郎, 藤井昌学, 市原英基, 堀田勝幸, 田端雅弘, 前田嘉信, 木浦勝行
2. 発表標題 Egfr変異陽性肺癌に対する Ad-SGE-REICと抗PD-1抗体併用による抗腫瘍免疫賦活効果
3. 学会等名 第63回日本肺癌学会学術集会
4. 発表年 2022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	木浦 勝行  (Kiura Katsuyuki)  (10243502)	岡山大学・医学部・客員研究員   (15301)	
研究 分担者	片山 量平  (Katayama Ryohei)  (60435542)	公益財団法人がん研究会・がん化学療法センター 基礎研究部・部長   (72602)	

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