

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 6 月 5 日現在

機関番号：82626

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2012～2014

課題番号：24590498

研究課題名(和文) 分化能の異なるがん幹細胞の同定とがん免疫療法による治療可能性の検討

研究課題名(英文) Determination of cancer stem cells and evaluation for cancer immunotherapy against cancer stem cells

研究代表者

池原 謙 (IKEHARA, YUZURU)

独立行政法人産業技術総合研究所・バイオメディカル研究部門・上級主任研究員

研究者番号：10311440

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,100,000円

研究成果の概要(和文)：本研究は、膵臓がんを発生する遺伝子改変マウスから樹立したがん細胞株と、温度感受性T抗原を発現させた膵組織より樹立した不死化CK19+細胞について、三次元培養中に形成されるsphere structure (SS)と管状腺管構造(tubular structure: TS)の違いに着目して実施した。分化の異なる幹細胞が、SSとTSの違いを決定しており、TGF β とそのシグナル伝達系がSSからTSを誘導していることを明らかにした。一方、がん幹細胞をカバーするワクチン療法は有効であるものの、その成否は、免疫寛容の抑制と初期化に依存すると結論する。

研究成果の概要(英文)：This study was conducted to increase knowledge about nature of stem cells in CK19+ pancreatic ductal epithelial cells. Established mouse pancreatic cancer and immortalized cell lines with CK19+ formed sphere structure (SS) and tubular structure (TS) in three dimension culture using collagen gels. We have demonstrated that there were differential types of stem cells in SS and TS, and presence of the cells determines SS and TS, respectively. Additionally, TGF β and the signal transduction pathway was identified to promote from SS to TS conversion. Furthermore, immune reaction could control cancer cells growth of both SS and TS, while rejection of tumor cells was impaired by tolerance linked with CD4+CD25+regulatory T cells and monocyte with CD11b+ /F4/80+.

In conclusion, though there are different types of stem cells in pancreatic cancer, immune therapy is feasible to use for control over the differentiation status.

研究分野：実験病理学

キーワード：膵臓がん がん幹細胞 細胞分化 免疫治療

1. 研究開始当初の背景

膵臓がんは、Catastrophe な進行をとげる悪性度の高い腫瘍であることが知られている。事実、膵臓がんと診断される患者の 80%以上は、現在も手術適応がない状況であり、その 5 年生存率は、過去 30 年間にわたり 5%程度である。このような膵臓がんの克服には、その早期発見を可能とする新規バイオマーカーの開発が必要であると同時に、Catastrophe な進行を止めることのできる新しい膵臓がん治療薬の開発が、求められている状況にある。

予後不良となる膵臓がんの病理は、p53 変異や KRAS 変異がドライバー変異となることで発症する膵管がん (pancreatic ductal cell adenocarcinoma: 以下 PDAC) である。近年の遺伝子組み換え技術を用いたマウス発がんモデルの作成と解析により、MDM2/p53 と Rb/E2F 経路が正常に作動しなくなることと、膵臓がんの発症と進展に関するメカニズムの全体像が明らかにされてきた。しかしながら、これらの研究では、膵臓上皮細胞の可塑性が膵臓がんの元になる細胞 (Cell-of-Origin for cancer) を捉えて in vitro での解析に持ち込むことができず、生じた PDAC と Cell-of-Origin for cancer の比較検討が難しい状況であった。このため、細胞分化を踏まえた革新的な膵臓がんマーカーの開発や分子標的治療技術の開発研究へと展開されていない状況であった。

樹立された膵臓がん細胞を用いた研究は CD133⁺/c-Met⁺ を指標とすることでがん幹細胞を識別できるので、細胞の可塑性や細胞分化を踏まえた分子標的治療への研究を展開できる可能性が示唆されていた。しかしながら、可塑性の大きな膵組織に生じたがんから樹立された細胞株が、in vivo にあるがん細胞の特性を反映するかすら不明な状況であるため、得られた研究結果が直ちに、一般化されるものであるかどうかなど、課題が指摘されていた。特に、分化を反映したがん幹細胞の同定や、がん幹細胞に対する治療薬の効果などは、再検討が必要な課題で

あると認識しているところである。

この状況にあつて研究代表者は、膵臓上皮特異的な Cre/loxP 遺伝子組換えにより、Rb と p53 の活性を阻害できる温度感受性 T 抗原 (tsT 抗原) と Kras^{G12D} を同時に発現させることで、intralobular duct (ILD) より直接、de novo に PDAC を生じるマウスの作製に成功していた。そしてこのマウスに生じたがん組織より細胞株を樹立し、コラーゲンゲル内で 3 次元的に (3D) 培養した場合、がん組織類似の構造がゲル内に再現されることを見出したのである (図 1)。同様

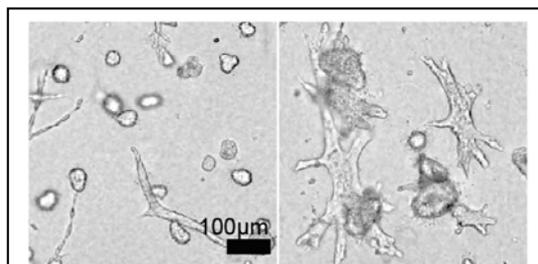
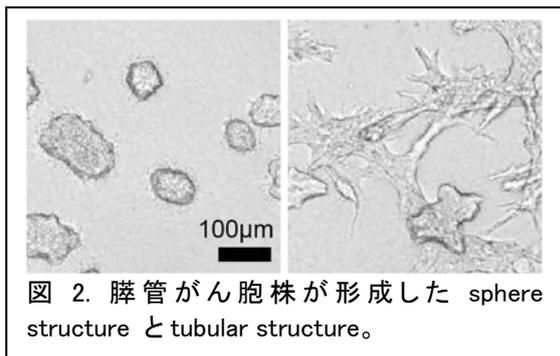


図 1. 三次元培養で腺管構造を形成する不死化膵管上皮細胞株 (左) と膵管がん細胞株 (右)。

に、tsT 抗原のみ発現させたマウスの膵臓から不死化細胞株の作成にも成功し、同不死化細胞株のうち、CK19⁺となる細胞が 3D 培養で ILD 類似の腺管構造を再現することを見出したのである。なお tsT 抗原は不死化細胞株の樹立に広く使用されてきた分子で、これを発現させても生後 150 日以内では、膵臓に特段の異常を認めることは無く、樹立した細胞株は、温度感受性 の不死化能を指標に単利されてきたポリオーマウイスの T 抗原の特性を反映して、37 度以上の培養条件にする senescence となり増殖を停止するのである。

本研究の着想は、マウスに生じた腫瘍組織から樹立した培養細胞株と、tsT 抗原のみ発現させたマウスの膵管上皮より樹立した不死化 CK19⁺細胞のいずれもが、sphere structure (SS) に加えて管状腺管構造 (tubular duct structure) (TS) を形成したことによる。細胞分化状態の異なる幹細胞の供給する娘細胞の違いが、三次元培養中に構築される SS と TS の違いをもたら

しているのではないかと考えて実施した(図2)。



2. 研究の目的

本研究の目的は、細胞分化能の異なるがん幹細胞の同定とこれを区別できるバイオマーカーの探索・同定するとともに、がん幹細胞に対するワクチン療法の有効性を明らかにすることである。

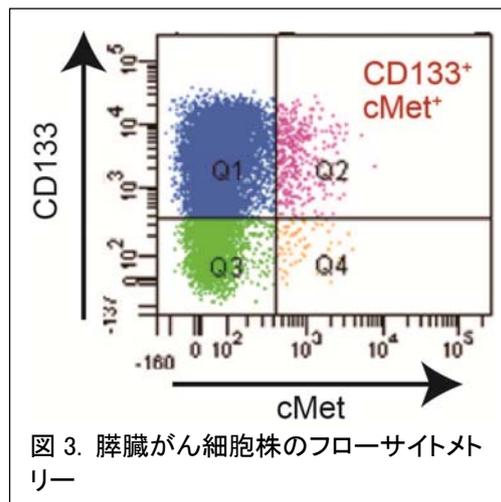
3. 研究の方法

1)膵臓特異的に Kras^{G12D} と ts T 抗原を発現させることで膵臓がん発生するモデルマウスと、これより樹立された培養細胞株を用いて、分化能の異なるがん幹細胞の同定を行い、それを特異的に検出できるバイオマーカーの開発を実施した。

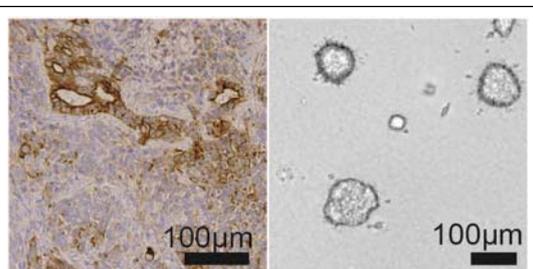
2)tsT 抗原をモデルがん抗原として用い、膵臓がんに対するがん免疫応答を解析し、がん免疫療法ががん幹細胞に対して有効であるかどうかの評価を行った。

4. 研究成果

1)膵臓由来の不死化上皮細胞と、腫瘍組織から樹立した培養細胞株を対象に、各種幹細胞マーカーを利用し、それぞれの集団における幹細胞の同定を進めた。各種マーカーで同定される細胞集団は、フローサイトメーターで分取し(図3)、ヌードマウスへの接種およびコラーゲンゲル3次元培養系で評価したところ、幹細胞集団の造腫瘍性を明らかにできた。次に、CD133+/c-Met+分画もしくは、ALDH活性を指標にすることで、分化能の異なるがん細胞株より、



それぞれの幹細胞集団を分取して、がん幹細胞に特徴的なマーカー分子の探索を実施した。その結果、変化率上位より 1) Wfdc2、2) 2010012C16Rik、3) Rab25、4) Klk8、5) 1190003J15Rik という膵臓がんの特異的なマーカー群を同定した。また、DNA マイクロアレイによる発現解析を通じて、TS や SS それぞれに関連づけられる分子や、TS の形成を促す分子などを抽出できた。例えば TGFβは、3次元培養における TS に関連付けられる分子で、TS 誘導因子であることを結論している。さらには、TGF-βシグナルカスケードに直接的に作用してシグナルの強度制御に関わることが予想される分子や、TGF-βセプターとの結合を阻害(もしくは促進)することが予想される分子を見出すことができた。現在、候補分子の強制発現・発現抑制等の



生化学実験を実施するなどして、TS 形成と SS 維持におけるその機能と役割を確定しつつある状況である。

興味深いことに、SS と TS の分化状態は可逆的であろうことも見いだしている。と言うのも、3D 培養で SS であった膵臓がん細胞株は、生着した腫瘍組織で TS となるものの、回収して3D 培養した状態では、多くは SS に戻るからである(図4)。

2)がん免疫に関する実験検討では、T 抗原を発現している同がん細胞株は、同系の B6 マウスには生着しない。しかし、Villin-cre マウスとの掛け合わせで T 抗原を大腸上皮特異的に発現させたマウスには生着することから着想し、がん幹細胞

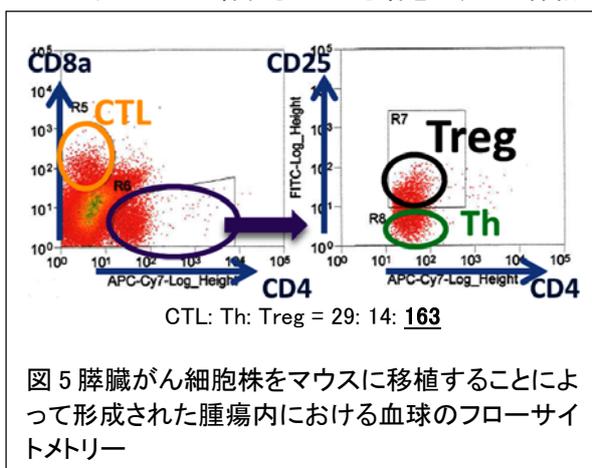


図5 膵臓がん細胞株をマウスに移植することによって形成された腫瘍内における血球のフローサイトメトリー

胞に対するワクチン療法が有効となる可能性を明らかにした。がん細胞株の定着した腫瘍組織は TS を主体とし、TGF- β 産生の亢進を背景に、間質組織の増生と、CD4+CD25+制御性 T 細胞と CD11b+ F4/80+単核球の増加が顕著であった(図5)。これらの結果から、ワクチン療法の成否は、免疫寛容をもたらすこれら免疫系への介入やその初期化が重要であると結論している。

一連の検討を通じ、SS と TS の分化が異なるがん幹細胞の存在と、そのバイオマーカー候補分子を明らかにした。がん幹細胞に対するワクチン療法は有効性であるものの、その成否は、免疫寛容を如何にリセットするかに依存すると結論している。

<引用文献>

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 20 件)

- ① Yamaguchi T, Ikehara S, Nakanishi H, Ikehara Y. A genetically engineered mouse model developing rapid progressive pancreatic ductal adenocarcinoma, J of Pathology, 査読有、Vol. 234、2014、228-238.
DOI: 10.1002/path.4402.
- ② Ueda M, Fukushima T, Ogawa K, Kimura H, Ono M, Yamaguchi T, Ikehara Y, Saji H. Synthesis and evaluation of a radioiodinated peptide probe targeting $\alpha\beta$ integrin for the detection of pancreatic ductal adenocarcinoma., Biochem Biophys Res Commun. 査読有、Vol. 14: 445(3)、2014、pp. 661-666、
DOI: 10.1016/j.bbrc.2014.11.071.
- ③ Hirao Y, Matsuzaki H, Iwaki J, Kuno A, Kaji H, Ohkura T, Togayachi A, Abe M, Nomura M, Noguchi M, Ikehara Y, Narimatsu H. Glycoproteomics approach for identifying Glycobiomarker candidate molecules for tissue type classification of non-small cell lung carcinoma. J Proteome Res. 査読有、Vol. 13(11)、2014、pp. 4705-4716
DOI: 10.1021/pr5006668.
- ④ Tateno H, Matsushima A, Hiemori K, Onuma Y, Ito Y, Hasehira K, Nishimura K, Ohtaka M, Takayasu S, Nakanishi MI, Ikehara Y, Nakanishi M, Ohnuma K, Chan T, Toyoda M, Akutsu H, Umezawa A, Asashima M, Hirabayashi J. Podocalyxin is a glycoprotein ligand of the human pluripotent stem cell-specific probe rBC2LCN. Stem Cells Transl Med. 査読有、Vol. 2(4)、2013、pp.265-273、
DOI: 10.5966/sctm.2012-0154.

- ⑤ Kuno A, Ikehara Y, Tanaka Y, Ito K, Matsuda A, Sekiya S, Hige S, Sakamoto M, Kage M, Mizokami M, Narimatsu H. A serum "sweet-doughnut" protein facilitates fibrosis evaluation and therapy assessment in patients with viral hepatitis. *Sci Rep.*、査読有、2013、Vol. 3、1065
DOI: 10.1038/srep01065
- ⑥ Murakami H, Nakanishi H, Tanaka H, Ito S, Misawa K, Ito Y, Ikehara Y, Kondo E, Koderu Y. Establishment and characterization of novel gastric signet-ring cell and non signet-ring cell poorly differentiated adenocarcinoma cell lines with low and high malignant potential. *Gastric Cancer*、査読有、Vol. 16(1)、2013、pp. 74-83、
DOI: 10.1007/s10120-012-0149-2.

[学会発表](計 18 件)

- ① 池原 譲、糖鎖情報で読み解く組織病理の世界、第 55 回日本組織細胞化学会シンポジウム(長野県・松本市)2014 年 9 月 28 日
- ② 池原 譲 他、グライコプロテオーム解析によるがんマーカーの開発、第 73 回日本癌学会学術総会、JCA-JSP Joint Symposium(神奈川県・横浜市)2014 年 9 月 25 日
- ③ 池原 譲 他、De novo 膵臓発がんモデルを用いたがん幹細胞と幹細胞ニッチの解析、第 102 回日本病理学会総会(北海道・札幌市)、2013 年 6 月 07 日
- ④ 池原 譲 生物機能と疾患の理解を目指した糖鎖生物学研究 第 58 回日本病理学会

秋季特別総会(愛知県・名古屋市) 2012 年 11 月 22 日

- ⑤ Yamaguchi T. et al Evaluation for ductal phenotype of mouse pancreatic ductal adenocarcinoma (PDAC) and the immortalized pancreatic ductal cells. 14th Int. Natl. Cong. Of Histochem. Cytochem. (Kyoto), 2012 年 08 月 27 日

[図書](計 1 件)

- ① Ikehara Y. et al. Mouse Models of Cancer. In: *Glycoscience: Biology and Medicine*. Edited by Taniguchi N, Endo T, and Hart GW. Springer Reference. 2014:396778.

[産業財産権]

○出願状況(計 4 件)

- ① 名称:タンパク質膜の製造方法
発明者:池原 譲 他
権利者:産業技術総合研究所、名古屋大学、杏林大学
種類:特許
番号:特願 2014-102455
出願年月日:平成 26 年 5 月 16 日
国内外の別: 国内
- ② 名称:プラズマ照射処理装置の作動方法
発明者:榊田 創、池原 譲、木山學
権利者:産業技術総合研究所
種類:特許
番号:特願 2014-086028
出願年月日:平成 26 年 4 月 18 日
国内外の別: 国内
- ③ 名称:糖鎖アイソフォーム検出方法及び糖鎖アイソフォーム検出装置
発明者:池原 譲 他
権利者:産業技術総合研究所
種類:特許

番号:PCT/JP2013/071653

出願年月日:平成 25 年 8 月 09 日

国内外の別: 国外

④ 名称:撮像システム及び撮像方法

発明者:池原 譲 小倉睦郎、牧野内進

権利者:産業技術総合研究所、(株)ニコン

種類:特許

番号:特願 2013-113825

出願年月日:平成 25 年 5 月 28 日

国内外の別: 国内

○取得状況(計 0件)

[その他]

ホームページ等

<https://staff.aist.go.jp/yuzuru-ikehara/index.html>

6. 研究組織

(1)研究代表者

池原 譲 (IKEHARA, Yuzuru)

独立行政法人産業技術総合研究所・バイオメディカル研究部門・上級主任研究員

研究者番号: 10311440

(2)研究分担者

該当なし

(3)連携研究者

山口 高志(YAMAGUCHI Takashi)

独立行政法人産業技術総合研究所・バイオメディカル研究部門・契約職員

研究者番号: 60626563