

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 6 月 15 日現在

機関番号：90101

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2013～2015

課題番号：25460966

研究課題名(和文) 誘導がん幹細胞の大量増幅と、HSP結合抗原パルス樹状細胞による個別化がん免疫誘導

研究課題名(英文) Primary tumor culture for personalized medicine

研究代表者

蘆田 知史 (Ashida, Toshifumi)

医療法人徳洲会札幌東徳洲会病院附属臨床研究センター・その他部局等・研究員

研究者番号：50261409

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,900,000円

研究成果の概要(和文)：大腸癌および膵癌の切除材料を用い、初代腫瘍細胞の継代・増幅を試みた。間質混入の少ない上皮細胞からなるorganoidを分離し、これを不活化したfeeder細胞上に播種・継代する方法をとった。次世代シーケンサを用いて得られた細胞の遺伝子変異プロファイルを調べたところ、遺伝子変異の種類と比率は継代により変化し、培養細胞が複数のクローンから構成されることが想定された。NOGマウスへの移植により原発巣と同様の組織構築が得られ、がん微小環境の再現が可能であった。患者初代腫瘍細胞は、特定の培養条件下で継代数を制御することで、がん個別化医療における癌抗原、薬剤感受性試験に有用なリソースとなる事が示された。

研究成果の概要(英文)：The application of primary cultures preserving intrinsic property of cancers holds promise for serving human resources to uncover core pathway guiding novel therapy and to provide patient-specific tumor antigens. In the current study, we sought to develop a culture system that can allow pancreatic neoplasia at various stages to adapt in vitro microenvironment without losing tumor forming capability in vivo. The primary culture by combining tumor organoid isolation and conditional reprogramming facilitated to rebuild physiological tumor structure by transplanting to immunodeficient mice, whereas most commercially available cell lines did not. Sequencing data of the primary culture indicated these tumor cells include heterogeneity of the primary tumors, providing useful model to learn clonal evolution of the precursors. These studies demonstrate the general utility of a tractable tumor culture for human cancer modeling and therapeutic strategy against pancreatic neoplasms.

研究分野：がん

キーワード：初代培養

1. 研究開始当初の背景

がんは過去数十年にわたり日本人の死因第一位を占めており、予防(先制医療)、診断、治療のすべての面で対策が国民健康上の大きな課題となっている。がん薬物治療においては特異的な分子、あるいはこれに制御される細胞内、細胞間の情報伝達系が標的とされるようになり、この10年で生命予後の飛躍的な改善が達成できた癌腫も多い。しかしながら、このようなアプローチによっても克服できない癌腫も存在し、これら難治がんに対して新しい発想に根ざした戦略の構築が求められている。

例えば、難治がん克服のひとつのカギとして「がん幹細胞理論」が脚光を浴びており、これらを標的とする新規治療の実現のため、がん幹細胞特異的な druggable target の探索が精力的に行われている。一方で、がんは免疫監視機構をたくみに逃れる仕組みを有しており、このような「免疫チェックポイント」も薬物療法における重要なターゲットとされるようになった。がん免疫療法として、古くより樹状細胞(dendritic cell; DC)を用いた開発が進められてきた。DCはがん免疫の司令塔として働くため、これを用いてがん幹細胞を標的とすることは画期的な抗がん作用を発揮する可能性を秘める。heat shock protein(HSP)は、腫瘍細胞内で多種多様な抗原ペプチドと結合するため、「腫瘍抗原の同定が不要」「DCへ容易に取込まれ、腫瘍特異的細胞傷害性T細胞(Cytotoxic T lymphocyte; CTL)の著しい誘導が可能」という利点を有する。我々は、腫瘍細胞由来のHSP70やHSP70・DCの併用免疫が、強力な腫瘍拒絶を導くことを明らかにした(*Blood* 2001, *Int J Hematol* 2006, *Cancer Sci* 2008)。がん細胞・組織には患者によって多様性がみられるため、このような戦略を実地臨床において実現するには、個々のがん患者の細胞・組織を手にすることが個別化医療という観点から出発点となる。すなわち、安定したがん初代培養の系を確立することが求められる。

がん研究には、HeLa細胞を筆頭とする培養細胞株が長い歴史のなかで重用されてきた。このような生きた細胞リソースが、がん細胞の情報伝達系、薬剤感受性や耐性機構の解明に果たしてきた役割は極めて大きい。最近では世界中で樹立された膨大な数の細胞株が、遺伝子異常の網羅的解析データを背景として、がん細胞の生物像の全貌に迫ろうとしている。しかし、がんはがん細胞のみならず、様々な間質細胞によって構成されることも事実であり、これらががん細胞に付与する特性はあらたな治療戦略を考える上で無視できない存在となっている。我々はこれまでに低酸素応答を介した代償経路による治療抵抗性の存在を明らかにし、がん幹細胞を治療標的とした戦略をたてるうえで「幹細胞性ニッチ」

を念頭に置く必要性を提唱してきた(*Nat Med* 2005, *Cancer Res* 2010)。すなわち、このようながん幹細胞の特性は、微小環境(ニッチ)において誘導されるため、がん・間質応答が維持された初代培養系は、がん幹細胞の特性や免疫療法といういま最も注目されている新規治療法の理論基盤を得るために欠かせない。

iPS細胞の誘導・培養技術にヒントを得て開発された conditional reprogramming 法(Liu X, *Am J Pathol* 2012)を用いることで、ウイルスベクターを用いずにヒト腺癌由来の初代培養腫瘍細胞に「高い幹細胞性(未分化性)」を維持しながら増殖させることが可能となっている。この方法に様々な培養条件の工夫を加えることで、個々のがん患者から個別に「がん幹細胞」腫瘍特異的抗原を得ることが可能になると期待される。これらを通じた新規治療法の開発、さらには創薬や基礎研究のためのリソースとして活用すべく、本研究課題に取り組んできた。

2. 研究の目的

難治がんに対する新規治療法を開発するうえで不足している、患者由来の初代培養細胞という重要なリソースを得ることを第一の目的とした。「患者個々人のがんの特性」すなわち、情報伝達系、薬剤感受性や治療抵抗性という「個性」を維持しうる、初代培養細胞系の確立を目指した。

原発臓器や組織学的な grade(非浸潤性の腫瘍病変を含む)によって、これまで株化が困難であった腫瘍も存在し、このことはがんの進展機構を分子レベルで解明するうえでのハードルとなってきた。本研究では、難治がんの代表格である膵癌をモデルとして、その前駆病変のひとつである膵管内乳頭粘液性腫瘍(intraductal papillary mucinous neoplasm: IPMN)の初代培養細胞系の細胞リソースを確立し、そのことで1)発がんルートの多様性、2)悪性形質の獲得過程の分子機構を解析するためのヒトモデルを確立することを第二の目的とした。

3. 研究の方法

所属機関ならびに海外連携機関(マサチューセッツ総合病院がん研究センター)の倫理委員会の承認、ならびに患者本人による文書での同意取得のもと、大腸癌および膵癌の切除材料を得た。Liuらの報告に従い、Conditional Reprogramming法(以下、CR法; Liu X, *Am J Pathol* 2012)による初代腫瘍細胞の調製を行ったが、間質細胞の混入を極力抑えるため井上らの研究チームが考案した cancer tissue-originated spheroids 法(以下、CTOS法; Kondo J, *PNAS* 2010)に準

じ、上皮細胞間の細胞接着が維持された organoid を分離したうえで、これを不活化した feeder 細胞上に播種・継代するという 2 段階方式をとった。

外科切除後、可及的速やかに採取した組織片を PBS で洗浄し、5mm 角程度の細片として抗生剤、抗菌剤（1x Penicillin-Streptomycin-Amphotericin B）を添加した DMEM 培地に入れ冷蔵保存した。これを 12 時間以内にブレードを用いて 1mm 角以下にミンスし、Liberase DH 酵素液（Roche; 0.26U）によりスターラー攪拌による hemogenize 処理した（37℃、1 時間程度）。CTOS 法を用いる場合には、100-200 μm ストレイナーで回収した organoid 分画を ES 細胞用培地（StemPro または StemSure 培地）にて一晚～1 日浮遊培養することにより tumor sphere を得た。これらを再度ストレイナーにより回収し、0n-feeder 培養した。feeder 細胞として、マウス線維芽細胞（NIH3T3, Swiss 3T3）のほか、マウス血管内皮細胞（MS-1）、ヒト線維芽細胞（NB1RGB）を用いた。これらの細胞を MMC 1 ng/mL にて 8～12 時間不活化処理を行ったものを凍結保存し、解凍後の細胞をゼラチンコート処理した dish に播種して 8 時間以上培養後 40-50 % confluent の状態のものを feeder として利用した。0n-feeder 培養に用いる培地は CR 法（原法）に準じ、適宜修飾を加えた。なお、培養に用いる腫瘍量が少ない場合には、NOG や NSG などの免疫不全マウスへ皮下移植し、腫瘍体積の増幅を図った後に、上記の方法により初代培養を開始した。

CTOS-CR 法により得られた初期接着細胞は、コロニーの大きさが 100-200 μm 程度に達した時点でトリプシン処理し、feeder 細胞上（もしくは laminin 処理を施した dish）に播種し、継代培養した。このようにして得られた初代細胞の造腫瘍能、ならびに組織片を採取した原発巣と同様の組織構築が可能かを確認するために NOG や NOD-SCID などの免疫不全マウスへ移植した。

また初代培養細胞よりゲノム DNA を抽出し、次世代シーケンサ（Ion Torrent PGM）を用いて代表的ながん関連遺伝子の変異プロファイルを得た。

4. 研究成果

1) 初代培養の成功頻度

はじめに、比較的豊富な初期腫瘍量の得られる大腸癌での予備検証を行った。局所進行大腸癌症例 6 例の検討では、5-10mm 角の腫瘍からスタートし、1 週間以内に全例で 200μm 程度のコロニー形成が得られた。このうち、微生物の混入のため培養継続が困難であった 2 例を除外した 4 例で、3 回以上の継代培養が可能で、全例で細胞凍結、解凍後の再増

殖が確認できた。feeder 細胞による、初期コロニー形成に差はみられず、それ以後は NIH3T3 を用いた。

次に、膵腫瘍での検討を合計 27 例行った。このうち 4 例が浸潤性膵管癌（いわゆる通常型膵癌）で、23 例が IPMN 症例であった。IPMN 25 例中 9 例が組織学的に浸潤性病変が確認され、残りは high-grade dysplasia の範疇までに留まる病変であった。ただし、培養に用いた組織片の採取は病理診断の妨げとならないことを優先したため、これらが浸潤部に相当するものか否かの判定は困難であった。

膵癌 5 例の培養は、全例で初期コロニーの形成、さらに継代増幅が可能であった。しかし、P-2 以降の継代により形成されたコロニーの形態はコロニー毎に異なるケースもみられ、なかには線維芽細胞と思われる細胞の増殖が確認された例もあった。このような場合には、ピペットチップ等を用いて当該コロニーをスクラッチし、線維芽細胞の増殖阻止を試みた。

次に IPMN 症例 25 例について、前半の 14 例は切除材料全てを直接、初代培養とし、後半の 11 例は腫瘍片を免疫不全マウス（NOG マウス）へ移植し増殖を確認した後の培養とした（patient-derived xenograft; PDX）。前半 14 例中 13 例で初期コロニーの確認ができたが、3 回以上の継代培養、凍結保存が可能であったのは 3 例のみであった。これらはいずれも組織学的に high-grade dysplasia あるいは浸潤癌が確認された例であった。後半 11 例の NOG マウスにおいて PDX の増殖が確認できたのは 8 例で、このうちマウスでの継代増殖が可能であったのは 7 例であった。PDX 組織片をソースとした細胞培養に成功したのは 6 例で、これらの原発腫瘍の組織型は 2 例が high-grade dysplasia、4 例が浸潤癌であった。

2) 得られた初代培養細胞の特性

IPMN 腫瘍片から直接継代培養に成功した 3 株、PDX での増殖確認の得られた 6 株を用いて、NOG マウスにおける造腫瘍能を検証した。それぞれ 2 株、6 株で腫瘍形成が確認され、組織学的には、粘液成分の豊富な嚢胞腔が確認され、IPMN としての特性が保有されていることが確認された。PDX から樹立した浸潤癌症例由来の株は、NOG マウスへの膵同所移植により肝転移の形成をみた。なお、膵癌組織から樹立した 5 株においては、全例で NOG マウスにおける腫瘍形成が確認され、豊富な間質増生を伴う通常型膵癌に類似した病理組織像が確認された。

上記膵腫瘍由来株について、遺伝子変異プロファイルの取得を試みた。通常型膵癌では全例、原発巣と同タイプの KRAS 変異が確認され、この他にも Tp53 や Smad4 変異などの遺伝子異常を周到することが確認された。一方で IPMN では、初代培養の初期クローンに

において *KRAS* ならびに *GNAS* のふたつの driver mutation に異なるパターンが確認された例があり、継代に伴いその含有比率が変化した。これは間質細胞を含めて、異なる腫瘍クローンが培養により選択されていく過程を示すものと考えられた。多クローン性発生を特徴とする IPMN の特性と矛盾しない結果であるが、癌化、あるいは浸潤癌への進展過程においてみられるクローン進化を捉えるためには、初期クローンの多様性を維持しうる培養系の確立が必要と考えられる。同時に、初代細胞系の研究リソース、あるいは樹状細胞ワクチンのための癌抗原としての利用に際して、細胞の長期培養や大量増殖に伴う形質変化の有無についてのさらなる検証が必要である。

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 11 件; 全て査読あり)

- 1) Saha S, Gordan JD, Kleinstiver BP, Vu P, Najem MS, Yeo JC, Shi L, Kato Y, Levin RS, Webber JT, Damon LJ, Egan RK, Greninger P, McDermott U, Garnett MJ, Jenkins RL, Rieger-Christ KM, Sullivan TB, Hezel AF, Liss AS, Mizukami Y, Goyal L, Ferrone CR, Zhu AX, Joung JK, Shokat KM, Benes CH, Bardeesy N. Isocitrate dehydrogenase mutations confer dasatinib hypersensitivity and SRC-dependence in cholangiocarcinoma. *Cancer Discovery* 2016 (in press)
- 2) Matsuzaka S, Karasaki H, Ono Y, Ogata M, Oikawa K, Tamakawa S, Chiba S, Muraki M, Yokochi T, Funakoshi H, Kono T, Nagashima K, Mizukami Y. Tracking the clonal evolution of adenosquamous carcinoma, a rare variant of intraductal papillary mucinous neoplasm of the pancreas. *Pancreas* 45:915-8 (2016)
- 3) Sugiyama Y, Sasajima J, Mizukami Y, Koizumi K, Kawamoto T, Karasaki H, Ono Y, Tanabe H, Fujiya M, Kohgo Y. The protein expression level of Gli2 is a feasible marker of ligand-dependent hedgehog activation in pancreatic neoplasms. *Pol J Pathol* (2016, in press)
- 4) Sugiyama Y, Kawamoto T, Sasajima J, Koizumi K, Karasaki H, Mizukami Y. A Rare Case of Epidermoid Cyst in the Pancreatic Tail Invaginated from the Splenic Hilum: Long-term Alteration in Imaging Findings. *Internal Medicine* (2016, in press)
- 5) Kikuchi S, Orii F, Maemoto A, Ashida T. Reversible Posterior Leukoencephalopathy Syndrome Associated with Treatment for Acute Exacerbation of Ulcerative Colitis. *Intern Med* 55(5):473-7 (2016)
- 6) Imai K, Karasaki K, Ono Y, Sasajima J, Chiba S, Funakoshi H, Muraki M, Hanaoka H, Furukawa T, Furukawa H, Kono T, Nagashima K and Mizukami Y. Metachronous pancreatic cancer originating from disseminated founder pancreatic intraductal neoplasias (PanINs). *The Journal of Pathology: Clinical Research* 1;76-82 (2015) DOI: 10.1002/CJP2.8
- 7) Gala MK, Mizukami Y, Le LP, Moriichi K, Austin T, Yamamoto M, Lauwers GY, Bardeesy N, Chung DC. Germline mutations in oncogene-induced senescence pathways are associated with multiple sessile serrated adenomas. *Gastroenterology* 146:520-9 (2014) DOI: 10.1053/j.gastro.2013.10.045
- 8) Watanabe K, Karasaki H, Mizukami Y, Kawamoto T, Kono T, Imai K, Einama T, Taniguchi M, Kohgo Y, Furukawa H. Cyst infection of intraductal papillary mucinous neoplasms of the pancreas: management of a rare complication: report of 2 cases. *Pancreas* 43(3):478-81 (2014) doi: 10.1097/MPA.0000000000000036.
- 9) Deschênes-Simard X, Mizukami Y, Bardeesy N. Macrophages in pancreatic cancer: starting things off on the wrong track. *J Cell Biol* 202(3):403-5 (2013) DOI: 10.1083/jcb.201307066
- 10) Kawamoto T, Sasajima J, Sugiyama Y, Nakamura K, Tanabe H, Fujiya M, Nata T, Iuchi Y, Ashida T, Torimoto Y, Mizukami Y, Kohgo Y. Ex vivo activation of angiogenic property in human peripheral blood-derived monocytes by thrombopoietin. *Int J Hematol* 98:417-29 (2013) DOI: 10.1007/s12185-013-1423-8.
- 11) Aburakawa Y, Kawabe J, Okada M, Yamauchi A, Asanome A, Kabara M, Matsuki M, Takehara N, Nakagawa N, Okumura S, Minami Y, Mizukami Y, Yuhki K, Ushikubi F, Hasebe N. Prostacyclin stimulated integrin-dependent angiogenic effects of endothelial progenitor cells and mediated potent circulation recovery in ischemic hind limb model. *Circ J*

〔学会発表〕(計10件)

- 1) 松原 悠、水上裕輔、正宗 淳、水谷彰吾、太田智之 . *SPINK1* 遺伝子 p.P45S 変異が確認された遺伝性膵炎の1例 . 第117回日本消化器病学会北海道支部例会 086(消) (2015年8月29日;札幌)
- 2) Mizukami Y, Ono Y, Karasaki H, Ogata M, Koizumi K, Ando K, Yokochi T, Yamada M, Kono T, Nagashima K. Plasma DNA genotyping using digital PCR for early detection of pancreatic neoplasm. 46th Annual Meeting of the American Pancreatic Association; San Diego, November 4-7, 2015
- 3) 水上裕輔、真口宏介、小泉一也 . 液体生検による膵癌リスク評価 第23回日本消化器関連学会週間(JDDW 2015) デジタルポスターセッション 消 P-258(2015年10月9日;東京)
- 4) Mizukami Y, Ono Y, Karasaki H, Asahara S, Ando K, Shinohara T, Nagashima K. Plasma DNA genotyping using digital PCR for early detection of pancreatic cancer (液体生検による膵癌診断). 第74回日本癌学会学術総会 [E14-4] 一般口演(英語) 消化器がんに対する網羅的遺伝子解析 . (2015年10月9日;名古屋)
- 5) Ono Y, Karasaki H, Chiba S, Nagashima K, Mizukami Y. Tracking the clonal evolution of adenosquamous carcinoma, a rare variant of intraductal papillary mucinous neoplasm(膵管内乳頭粘液性腫瘍より発生した膵腺扁平上皮癌). 第74回日本癌学会学術総会 [P14-21] ポスターセッション 臓器がんの基礎・診断・治療 (21) (2015年10月9日;名古屋)
- 6) Ono Y, Karasaki H, Imai K, Sasajima J, Chiba S, Funakoshi H, Muraki M, Hanaoka H, Furukawa T, Furukawa H, Kono T, Nagashima K, Mizukami Y. Metachronous pancreatic cancer originating from disseminated founder pancreatic intraductal neoplasias. General Poster Session B (Board #B51): Cancers of the Pancreas, Small Bowel, and Hepatobiliary Tract, 2015 Gastrointestinal Cancers Symposium: J Clin Oncol 33, 2015 (suppl 3; abstr 330): San Francisco, Jan 16, 2015
- 7) Karasaki H, Kono T, Ono Y, Maejima T, Mizukami Y. Adenosquamous cell carcinoma derived from intraductal

- papillary mucinous neoplasm of the pancreas confirmed by genetic analysis. General Poster Session B (Board #A46): Cancers of the Pancreas, Small Bowel, and Hepatobiliary Tract, 2015 Gastrointestinal Cancers Symposium: J Clin Oncol 33, 2015 (suppl 3; abstr 275): San Francisco, Jan 16, 2015
- 8) Mizukami Y, Imai K, Chiba S, Ono Y, Sasajima J, Karasaki H, Kono T, Nagashima K. A case of metachronous ductal adenocarcinomas with unique KRAS mutation (膵がん異時多発の1例) 第73回日本癌学会学術総会 膵臓、その他 . ポスター発表 (2014年10月26日;横浜)
 - 9) Sasajima J, Kawamoto T, Sugiyama Y, Mizukami Y, Iuchi Y, Ashida T, Tanabe H, Torimoto Y, Kohgo Y. Increased angiogenic property of human peripheral blood monocytes by ex vivo culture with c-Mpl agonists in hindlimb ischemia mouse model. American Society of Hematology. Poster session. Dec 5-8, 2013 (New Orleans, LA)
 - 10) 蘆田知史、奈田利恵、井内康之、千葉眞子、加藤邦子、福岡亜衣、森木彩名、永幡美鈴、薄木亜也、松原由佳、原 愛里、八戸大輔、山崎誠治、水上裕輔 . Single venous access による末梢血単核球分離とその効率 . 第12回日本再生医療学会総会 (2013年3月21日;横浜)

〔図書〕(計0件)

〔産業財産権〕
出願状況 (計0件)

名称 :
発明者 :
権利者 :
種類 :
番号 :
出願年月日 :
国内外の別 :

取得状況 (計0件)

名称 :
発明者 :
権利者 :
種類 :
番号 :
取得年月日 :
国内外の別 :

〔その他〕
ホームページ等

http://www.higashi-tokushukai.or.jp/clinical_study/index.php

6 . 研究組織

(1)研究代表者

蘆田 知史 (ASHIDA, Toshifumi)
医療法人 徳洲会 札幌東徳洲会病院
附属臨床研究センター
IBD 研究部
研究員

研究者番号 : 5 0 2 6 1 4 0 9

(2)研究分担者

水上 裕輔 (MIZUKAMI, Yusuke)
医療法人 徳洲会 札幌東徳洲会病院
附属臨床研究センター
臨床生体情報解析部
部門長
(平成 28 年 4 月より「がん研究部 部門
長」へ異動)

研究者番号 : 3 0 4 0 0 0 8 9

(3)連携研究者

該当者なし