

抗癌剤治療後に残存するヒト膵癌幹細胞の維持機構の解明

横浜市立大学大学院 医学研究科 臓器再生医学

奥田 諒

I 要 旨

膵癌は臨床的に無症状で進行するために早期発見が困難であり、高率に再発・転移をきたすため極めて予後不良な難治がんである。事実、我が国の癌による死亡数の第5位に位置することから膵癌の診断および治療応用へ向けた基盤研究の推進が急務である。現在の創薬開発は、微量な臨床検体の膵原発巣・転移巣の一部およびCTCなどを解析対象としてきた等の理由から、膵癌に治療効果を示す抗癌剤を開発するに至っていない。したがって、新薬開発には膵癌治療へ向けた新たな評価系の構築が極めて重要である。そこで、本研究では膵癌組織を反映した膵癌三次元組織を人為的に創出し、それらを用いて膵癌の治療抵抗性機構を探索することを目的とする。

固形腫瘍は癌幹細胞および分化した癌細胞、さらにそれらを取り巻く癌微小環境からなる複雑な細胞社会により構成されており、微小環境が癌細胞に与える影響の大きさは数多く報告されている。特に膵癌は間質の豊富な癌であり、膵癌幹細胞と間質との相互作用は癌の治療抵抗性と深く関連することが知られている。したがって、がんを根治するためには、「がん細胞に対する治療」でなく「腫瘍組織に対する治療」を行なうことが重要である。

これまでに、我々はiPS由来肝細胞と血管内皮細胞と間葉系細胞の3種類を共培養することにより肝臓の芽となる機能的「肝芽」の創出に成功している。申請者は、この臓器再構成技術を癌領域へ応用することにより、膵癌幹細胞と

それを取り巻く微小環境（血管、間質組織等）を含む膵癌組織の再構築が可能であると考えた。この三次元培養系は、患者毎に大量創出することが可能であり、培養下において個人差を考慮した多量な化合物による創薬スクリーニング系や分子標的薬の開発、など非常に幅広い応用が期待され、従来の膵癌治療の問題点を打開する新規治療法の開発に繋がる極めて独創性の高い研究である。

II 目 的

本研究では抗がん剤治療後に残存するヒト膵癌幹細胞の維持機構の解明を目的とする。

III 方 法

当教室で開発されている器官原基再構成法を膵癌組織の再構成に応用した。ヒト膵癌細胞、ヒト血管内皮細胞、ヒト間葉系細胞を三次元培養することで三種類の細胞から構成されるヒト膵癌オルガノイドの再構成を試みた。またヒト膵癌オルガノイドを免疫不全マウスの皮下に移植することにより、ヒト膵癌組織の再構成を試みた。さらに、腫瘍が一定のサイズに達した時点から膵癌の標準的治療薬を投与することにより、薬剤感受性を評価した。さらに治療抵抗性を持つ分子を抽出し、有用性を評価する。

IV 結 果

1 膵癌オルガノイドの再構成 / 薬剤感受性評価

(1) 膵癌オルガノイドの再構成

in vitro 薬剤感受性と *in vivo* 薬剤感受性の乖離の要因は双方の微小環境の違いにあると考えられる。*in vitro* における微小環境をヒト膵癌組織内での微小環境に近づけるため、*in vitro* において間質を含む癌組織を人為的に再構成する手法の開発を試みた。はじめに、膵癌細胞とストロマ細胞の培養条件を検討した。ある一定の細胞比率で膵癌細胞、ストロマ細胞を共培養したところ、細胞の自立的な凝集が観察され、三種類の細胞から構成される癌オルガノイドが再構成された。蛍光レポーター遺伝子を導入した癌細胞を用いて癌オルガノイドの再構成過程を検討し、追尾定点観察を行った。その結果、癌オルガノイドの再構成過程では三種類の細胞が混ざり合いながら一つの組織体を形成することが確認された。次いで、様々な膵癌細胞を用いて癌オルガノイドが再構成されるか否かを検討したところ、3種類の異なる膵癌細胞を用いて癌オルガノイドが再構成されることを確認した。これらのことより、癌オルガノイドの再構成法は、様々な膵癌細胞において高い再現性を持つことが明らかとなった。

(2) 膵癌オルガノイドの薬剤感受性評価

膵癌細胞、血管内皮細胞、間葉系細胞を三次元培養条件下で共培養したところ、二次元培養下では、癌細胞単独、間質量の少ない癌オルガノイド、間質量が高い癌オルガノイドの間で薬剤感受性に違いはみられなかった。次いで、癌細胞単独、間質量の少ない癌オルガノイド、間質量が高い癌オルガノイドの間で薬剤感受性を検討した。三次元培養下では、癌オルガノイド群は癌

凝集体群に比べて高い薬剤耐性を示すことが確認された。また、癌オルガノイドのうち、間質の多い癌オルガノイドと間質の少ない癌オルガノイドの薬剤耐性を比較すると、間質の多い癌オルガノイドは高い薬剤耐性を示すことが明らかとなった。癌オルガノイドは膵癌の高い薬剤抵抗性を再現する能力を有することが確認された。

2 癌オルガノイドを用いたゼノグラフトの再構成 / 薬剤感受性評価

(1) 膵癌オルガノイドを用いたゼノグラフトの再構成

ヒト膵癌細胞、ヒト血管内皮細胞、ヒト間質細胞を三次元培養することにより、細胞の自律的な凝集を伴うヒト膵癌オルガノイドが形成された。再構成されたヒト膵癌オルガノイドを免疫不全マウスの皮下に移植したところ、ヒト膵癌組織が形成されることを確認した。ヒト膵癌オルガノイド由来ゼノグラフトを組織学的に解析したところ、間質豊富なヒト膵癌オルガノイドを移植することにより管腔構造ならびに豊富な間質を伴うヒト膵癌組織が再構成されることを見出した。ヒト膵癌原発巣では管腔構造が存在し、その周囲には豊富な間質が存在することが特徴であるが、ヒト膵癌オルガノイド移植により、ヒト膵癌原発巣に類似した構造を持つヒト膵癌組織を再構成することが可能であることが明らかとなった。一方で、ヒト膵癌細胞移後に形成されるゼノグラフトは間質に乏しく、また、明瞭な管腔様構造が形成されないことが明らかとなった。さらに、間質豊富なゼノグラフト組織における癌の構造変化に伴う分子基盤を評価したところ、癌幹細胞マーカーの発現が向上していた (Fig1)。これは間質と癌細胞との相互作用が癌細胞の特性を大きく変化させ、治療抵抗性にも関連する

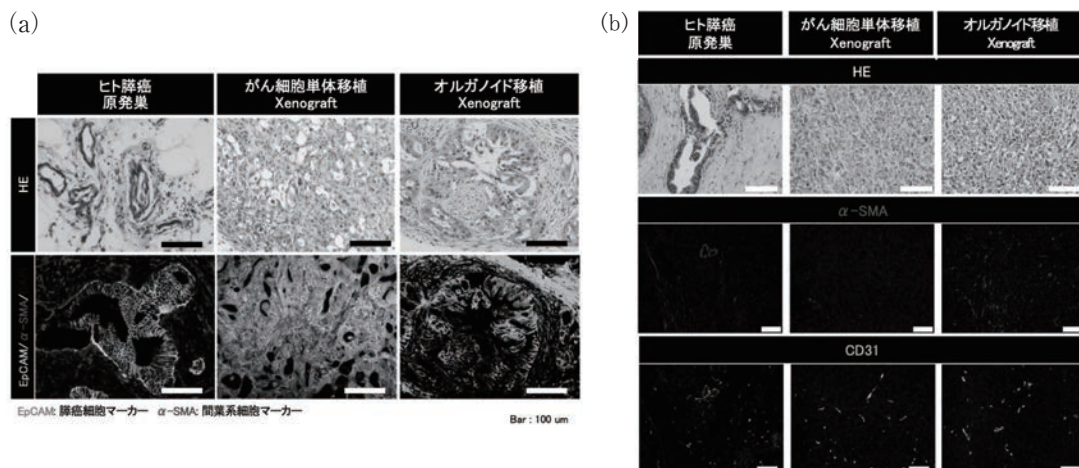


Figure 1 膵癌オルガノイドの移植後に再構成された膵癌組織

- (a) 膵癌細胞、血管内皮細胞、間葉系細胞由来の膵癌オルガノイドを m 演繹不全マウスの皮下に移植後、再構成された膵癌ゼノグラフトの組織像 (写真中) を示す。対象群として、膵癌細胞のみを移植して形成されたゼノグラフトの組織像 (写真右)、ヒト膵癌原発巣の組織像 (写真左) を示す。上段は HE 像、下段は EPCAM、 α -SMA の免疫染色像を示す。スケールバーは $100\mu\text{m}$ を示す。膵癌オルガノイドの移植群において、複雑な膵癌組織が再構成されている。
- (b) 膵癌オルガノイド作成時の間質細胞の有無が膵癌ゼノグラフトの組織像に及ぼす影響の解析。間質を高頻度を含む膵癌オルガノイドから再構成された膵癌ゼノグラフト内では α -SMA 陽性細胞が高頻度に観察される。なお、膵癌原発巣 (図中左) は α -SMA 陽性細胞が高頻度に観察される。

と考えられている癌幹細胞を増加させている可能性を示した。

(2) 膵癌オルガノイドを用いたゼノグラフトの in vivo 薬剤感受性評価

豊富な間質を有した癌オルガノイド由来ゼノグラフトの in vivo 薬剤感受性を評価するため、免疫不全マウスに癌オルガノイド (豊富な間質を有するもの、間質に乏しいもの) あるいは、癌サスペンションを移植し、ゼノグラフトが一定の大きさに達した時点から膵癌の治療薬を投与し、in vivo 薬剤感受性を評価した。薬剤応答を比較すると癌サスペンション由来ゼノグラフト

に比べて、癌オルガノイド由来のゼノグラフトは、治療抵抗性が高いことが明らかとなった。また、癌オルガノイド移植群のうち、豊富な間質を有する癌オルガノイド移植群は間質に乏しい癌オルガノイドに比べて治療抵抗性が高いことが明らかとなった。

さらに、間質豊富なゼノグラフト組織における癌の治療抵抗性に伴う分子基盤を評価したところ、治療後のゼノグラフトにおいて癌幹細胞マーカーの発現が向上していた。これは、膵癌を治療する事により、癌と間質の相互作用が癌幹細胞を増加させ、治療に対して抵抗性を高めている可能性を示唆している。

3 抽出した分子群の有用性評価

オルガノイドの薬剤抵抗性の解析系から抽出された分子の有用性を評価するために、抗がん剤治療前後の膵癌組織を用いて組織学的解析を行った。

(1) がん細胞における特性解析

膵癌組織における癌細胞の特性について免疫組織化学染色により評価した。その結果、治療後の膵癌組織では、抽出された癌幹細胞マーカーを有する癌細胞が増殖していた。一方、がん細胞単体移植群においては、これらのマーカーを有する癌細胞の増加は認められなかった。これは、癌オルガノイドの系を用いて抽出された分子が、治療抵抗性を評価する上で有用な可能性を示している。

(2) 間質組織の特性解析

次に、抽出された癌幹細胞マーカーと間質との役割を明らかにするために、同一組織における間質量の評価を免疫組織化学染色にて行った。その結果、抽出された癌幹細胞マーカーを有する癌細胞が多い組織では、複数の間質マーカーを有する細胞群が豊富に存在していることが明らかとなった。

以上のことから、豊富な間質を含むオルガノイドを移植することにより、膵癌の原発巣にて見られる上皮細胞の管腔構造、豊富な間質を有するゼノグラフトの再構成された。さらに、治療前後の癌細胞における分子群の抽出および有用性評価から、間質が癌細胞の特性を変化させることにより、治療抵抗性を高めている可能性が示唆された。

V 考 察

創薬開発においては再現性の高いアッセイ系が求められているため、細胞株を用いた薬剤評

価が行われている。細胞株を用いた生体内での薬剤評価としては、免疫不全マウスの皮下にゼノグラフトを形成させ薬剤を投与して治療効果を評価する方法が広く用いられているが、原発巣と同等の薬剤感受性を示せないことが問題となっている。様々な報告により、がん細胞の周囲に存在するがん関連線維芽細胞 (Cancer Associated Fibrosis; CAF) や腫瘍血管といったがん微小環境が治療抵抗性に寄与していることが示されており、がん微小環境を有したがん組織に対する創薬開発研究の重要性が高まってきている。しかし、間質を安定的に再構成することのできる手法は開発されておらず、がん微小環境を含む薬剤評価系は確立されていない。当研究室では各臓器の実質細胞 (肝臓、膵臓、腎臓等) と間葉系幹細胞、血管内皮細胞とを三次元的に共培養することにより血管ネットワークを有するミニ臓器の創出に成功している。そこで、本研究ではこの独自に開発した三次元共培養系を、血管ネットワーク及び間質を豊富に含む膵癌組織の再構成に応用することを目指した。膵癌細胞と間葉系幹細胞、血管内皮細胞とをある一定の比率で共培養することにより、三種類の細胞が自立的な細胞間相互作用により集合し、一つの膵癌組織体 (膵癌オルガノイド) を創出した。このオルガノイドを免疫不全マウスの皮下に移植して形成させたゼノグラフトは、ヒト膵癌組織に類似した組織を再構成させた。これまでに、がん細胞を移植して形成したゼノグラフトは間質が乏しく、腺がん特有の管腔構造が再構成できず、ヒトのがん組織の形態を再現したといった報告はないために、本研究にて開発した膵癌オルガノイド創出法は極めて新規性の高い研究であるものと考えられる。さらに、治療抵抗性を高く示した癌オルガノイドの特性解析 (分子群の抽出・組織解析等) をすることにより、癌幹細胞マーカーの発現が高い細胞群が多く存在していることを明らかにした。

以上により、本研究で確立した膵癌オルガノ

イド創出技術は、がんの治療抵抗性の重要な要因と考えられるがん微小環境を量的に再現することを達成したものと考えられる。

本研究では、膵癌オルガノイドの作成にあたり、正常組織より分離した間葉系幹細胞と血管内皮細胞を用いた。今回の報告では間質の再構成までとなっており、薬剤感受性評価は行えていない。今後、実際に間質の存在量の変化と薬剤感受性の相関関係について評価することを想定している。Michael Quante らの報告によると、正常な間葉系幹細胞や血管内皮細胞はがんの原発巣中に存在するがん関連線維芽細胞 (CAF) や腫瘍血管内皮細胞と遺伝子発現状態が異なることが示唆されている。例えば、CAF は CXCL1 や CXCL5、TL-6、TNF- α などの炎症の促進や免疫系細胞の遊走に関連するサイトカインやケモカインを産生することでがんの進展に寄与することが報告されている。今後、ヒト膵癌組織により近い膵癌組織を再構成するためには、ヒト膵癌組織由来間葉系細胞 (CAF)、血管内皮細胞の分離・培養条件を確立し、ヒト膵癌オルガノイドの創出条件を最適化することが重要であると考えられる。

さらに、本研究により確立したがんオルガノイド再構成技術は、膵癌のみならず、脳腫瘍やスキルス胃がんなどの豊富な間質を伴うがんへの応用が期待させる。また、このオルガノイド再構成技術は、間質量の異なるオルガノイドを創出することが可能であることから、乳がんや肺がん、前立腺がん等の様々ながん研究への応用が期待させる。

参考文献

- 1) Rosewicz S, Wiedenmann B. Pancreatic carcinoma. *Science Direct* 1997 ; 349 : 485-489.
- 2) Jörg R, Matthias L. The MUC gene family: Their role in diagnosis and early detection of pancreatic cancer. *Molecular Cancer* 2003 ; 2 : 9
- 3) Harry S, et al. Survival advantage of combined chemoradiotherapy compared with resection as the initial treatment of patients with regional

- pancreatic carcinoma. *Cancer* 2000 ; 89 : 314-327.
- 4) Siegel R, et al. Cancer statistics, 2012. *CA Cancer J Clin* 2012 ; 62 : 10-29.
- 5) Jean-Claude Cutz, et al. Establishment in severe combined immunodeficiency mice of subrenal capsule Xenografts and transplantable tumor lines from a variety of primary human lung cancer: potential models for studying tumor progression-related changes. *Clinical Cancer Research* 2006 ; 12 : 4043-4054.
- 6) Kenneth P. Olive, et al. Inhibition of hedgehog signaling enhances delivery of chemotherapy in a mouse model of pancreatic cancer. *Science* 2009 ; 324 : 1457-1461.
- 7) Paolo P. Provenzano, et al. Enzymatic targeting of the stroma ablates physical barriers to treatment of pancreatic ductal adenocarcinoma. *Cancer Cell* 2012 ; 21 : 418-429.
- 8) Camille Duluc, et al. Pharmacological targeting of the protein synthesis mTOR/4E-BP1 pathway in cancer-associated fibroblasts abrogates pancreatic tumour chemoresistance. *EMBO Molecular Medicine* 2015 ; 7 : 735-753.
- 9) John J. Tentler, et al. Patient-derived tumour xenografts as models for oncology drug development. *Nature REVIEWS CLINICAL ONCOLOGY* 2012 ; 9 : 338-350.
- 10) Takanori Takebe, et al. Vascularized and functional human liver from an iPSC-derived organ bud transplant. *Nature* 2013 ; 499 : 481-484.
- 11) Michael Quante, et al. Bone marrow-derived myofibroblasts contribute to the mesenchymal stem cell niche and promote tumor growth. *Cancer Cell* 2011 ; 19 : 257-272.