

iPS 細胞ゲノム編集による膵癌治療抵抗性機構の解析

東京大学医科学研究所 幹細胞治療研究センター 再生医学分野
関根 圭輔

我々はこれまでに、間質を伴う正常組織の人為的再構成法（iPS 細胞由来ミニ肝臓（iPSC ミニ肝臓）：Takebe T, Sekine K et al, *Nature*, 2013; Sekine K et al, *Nature* 2017）を基盤とし、日本人膵癌患者より分離したプライマリ膵癌細胞を用いて、膵癌微小環境を再現可能なヒトプライマリ膵癌オルガノイド作製法を開発した。ヒトプライマリ膵癌オルガノイドは in vitro および in vivo において高い抗癌剤耐性を示す。したがって、膵癌患者の高い治療抵抗性を再現するための手法を確立したといえる（「腫瘍組織再現法」特願 2017-50769）。

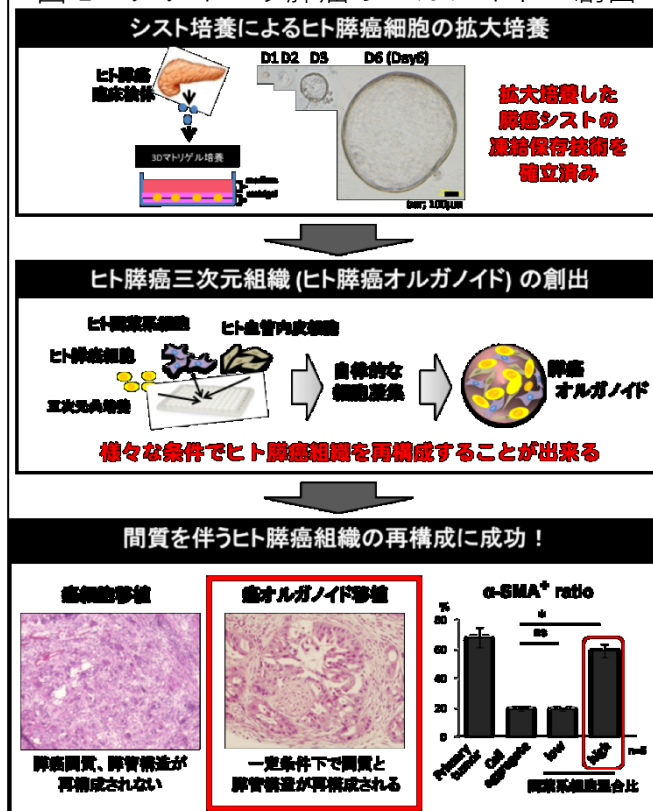
本研究では、膵癌の進展に必須と考えられる膵癌細胞と間質の間におこる相互作用を、我々が開発したヒトプライマリ膵癌オルガノイドを用いた人為的な癌間質の操作とその特性解析、独自のシングルセルレベルでの解析手法（Sekine K et al, *Nature* 2017）等により明らかにし、膵癌制圧のための膵癌細胞-間質相互作用の制御を試みた。膵癌は罹患者数と死亡者数がほぼ同数であり、5 年生存率が 5-7%と極めて予後不良の難治癌である。さらに、膵癌は増加傾向が続いており、本邦では肝癌を抜いて第 4 位となっており、2030 年までには第 2 位となるとの予測もあるなど、予後の改善に向けた開発の社会的要求が高い。

では、なぜこれまで優れた抗癌剤が開発されていないのだろうか？ 膵癌は豊富な間質を有する癌であり、間質が癌の進展および予後に深く関与することが明らかとなっており、創薬開発において間質を含む培養法が無く、膵癌の薬剤応答を正確に再現する評価が不可能であったことに起因すると考えられる。一方、近年、間質のみを標的とした治療はむしろ膵癌を増悪させることが明らかとなってきた。そのため、膵癌の治療は単に間質を標的とするのではなく、膵癌細胞-間質相互作用をその成り立ちから、進展・薬剤耐性能の獲得・転移能に獲得に至るまでの過程を理解し、それを制御することが重要であると考えられる。膵癌細胞-間質相互作用を解析し、検証するためには、膵癌微小環境を再現可能な in vitro 培養系が必須である。

そこで、本研究では我々が開発したヒトプライマリ膵癌オルガノイドを用いて、膵癌細胞-間質相互作用を明らかにし、膵癌制圧のための膵癌細胞-間質相互作用の制御を試みた。

まず、ヒトプライマリ膵癌オルガノイドが患者予後と関連する薬剤感受性を有するか明らかにする目的で、術後再発が見られた患者と術後再発が診られなかった患者をそれぞれ予後不良群、予後良好群として薬剤耐性の評価を行った。薬剤評価は膵癌治療における第一選択薬であるゲムシタビンを用いた。その結果、予後不良群が予後良好群に比べ、有意により高い薬剤耐性を示した。その一方で、癌間質を持たない癌細胞単独での薬剤評価においては、予後不良群、予後良好群に薬剤耐性の違いは見られなかった。さらに、プライマリ膵癌オルガノイドを重度免疫不全マウス皮下に移植し、ゼノグラフト腫瘍を形成し、in vivo でのゲムシタビンを用いた薬剤評価を実施した。プライマリ膵癌オルガノイド由来ゼノグラフトでは、in vitro の薬剤評価と同様に、予後不良群が予後良好群に比べ、有意により高い薬剤耐性を示した。癌間質を持たない癌細胞単独では同濃度のゲムシタビンでゼノグラフト腫瘍が退縮するため、予後不良群、予後良好群での比較は実施出来なかった。以上のことから、プライマリ膵癌オルガノイドは in vitro

図 1 プライマリ膵癌オルガノイドの創出



および in vivo において患者で見られる薬剤応答および予後を反映するモデルとなることが明らかとなった。

そこで次に、プライマリ膀胱癌オルガノイドで見られる薬剤耐性に関与する分子を明らかにする目的で、予後不良群および予後良好群において発現が異なる遺伝子群の抽出を実施した。予後不良群および予後良好群の異なるプライマリ膀胱癌オルガノイドに対して、複数の薬剤を濃度を変えて投与した合計 72 サンプルより RNA を抽出し、RNA シークエンスを実施した。これらのサンプルは同時に薬剤評価も実施した。72 サンプルの RNA シークエンスデータを解析し、発現が異なる 363 遺伝子を同定した。これらの遺伝子発現が実際に患者予後と関連するか調べるため、公共のデータベースである The Human Protein Atlas (<https://www.proteinatlas.org/>) を用いて解析を実施した。その結果、抽出された複数の遺伝子について予後不良群で発現が高い遺伝子については患者検体での高発現と予後不良との相関、予後良好群での高発現は予後良好との相関が見られた(図 2)。今後、プライマリ膀胱癌オルガノイドおよび患者検体において、癌細胞、間質どちらに発現しているのかを明らかにすることが必要である。

一方で、プライマリ膀胱癌オルガノイドの結果からも明らかのようにヒト膀胱癌の治療抵抗性を克服する上では、間質細胞の機能を明らかにし、関連する間質因子の機能解析が極めて重要である。しかしながら、これまで特に間質細胞における分子機能を解析する有用な手法は存在しなかった。なぜなら、間質細胞は癌細胞と異なり、増殖も限られ遺伝子導入も容易でない。ヒト iPS 細胞は間質細胞を含めたあらゆる細胞に分化誘導が可能であり、同じ品質で必要量を速やかに調製することが可能である。そこで、微小環境を伴うプライマリ膀胱癌オルガノイドにおいて、遺伝子機能を正確に評価するためのヒト iPS 細胞効率のよいゲノム編集技術の確立を行った。まず、iPS 細胞にドキシサイクリン(Dox)誘導性 CAS9 を導入し、Dox 投与とガイド RNA の導入のみで遺伝子欠損を可能にするシステムを構築した。このシステムを用いて約 20 遺伝子に対するノックアウトを試みたところ 50%~100%の効率でノックアウトに成功した(図 3)。また、ヒト iPS 細胞から間質細胞を分化誘導し、この細胞を用いたプライマリ膀胱癌オルガノイドの作製にも成功しており、これら本研究で確立した技術を組み合わせることにより、今後、上記で抽出した分子の癌における役割および分子メカニズムを明らかにすることにより、これらの分子を標的とした創薬開発の有用性を明らかに出来ると期待される。

図 2 オルガノイドでの薬剤耐性に基づいた患者個人差(薬剤感受性)に関与する分子の抽出

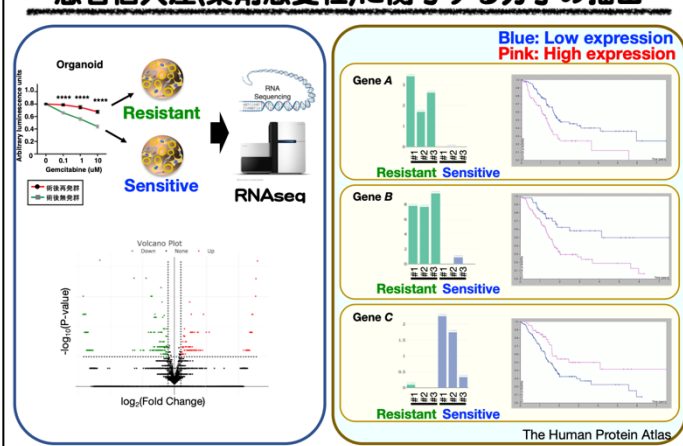
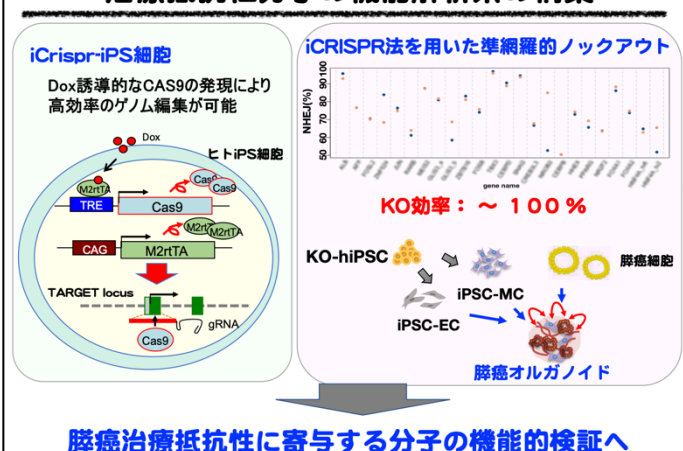


図 3 効率の良いhiPSC KOによる治療抵抗性分子の機能解析系の構築



1. **Keisuke Sekine**

Generation of human liver using iPS cells for regenerative therapies

American Association for the Study of Liver Diseases(AASLD), 8-12th Nov(2019) Boston, USA,招待

講演

2. **Keisuke Sekine**

Generation of functional human liver from pluripotent stem cell.

26th East Asia Joint Symposium on Biomedical Research, 24-25th Oct (2019) Seoul, South Korea,

招待講演

3. **Keisuke Sekine**

Multicellular cancer organoid cultures for recapitulating cancer ecosystems

The 78th Annual Meeting of the Japanese Cancer Association., 26-28th Sep (2019) 京都、国内 招

待講演

4. **関根圭輔**

Recapitulating pancreatic cancer ecosystems by multicellular cancer organoid cultures based on patient-derived cancer cells

講演会：患者由来がんモデル ～基礎研究から臨床応用まで～ 2019年7月31日～8月2日

東京、国内 招待講演

5. **Keisuke Sekine**

Generation of three-dimensional cancer tissue using patient-derived pancreatic cancer cells

Asia-Pacific Scientific Workshop 4-5th Mar. (2019) Singapore, Singapore 招待講演

6. **関根圭輔**

「ヒト組織三次元的再構成技術を用いた膵癌の人為創出」

第1回 がん三次元培養研究会 東京、国内 2018年11月27日(火) 東京、国内 招待

講演