



## ムーンショット目標 2

2050年までに、超早期に疾患の予測・予防をすることができる  
社会を実現

# 実施状況報告書

## 2022年度版

生体内ネットワークの理解による

難治性がん克服に向けた挑戦

**大野 茂男**

順天堂大学 大学院医学研究科



## 研究開発プロジェクト概要

細胞生物学、イメージング技術、数理・AI 技術などを統合的に活用して、膵臓がんなどの難治性がんの発症と悪性化の仕組みを明らかにします。それにより、2050 年には、難治性がんの発症を予測して予防する事ができる社会の実現を目指します。

[https://www.jst.go.jp/moonshot/program/goal2/22\\_ohno.html](https://www.jst.go.jp/moonshot/program/goal2/22_ohno.html)

## 課題推進者一覧

課題推進者	所属	役職
妹尾 浩	京都大学 大学院医学研究科	教授
児玉 裕三	神戸大学 大学院医学研究科	教授
垣内 伸之	京都大学 白眉センター	特定准教授
今井 俊夫	神戸大学 大学院医学研究科	特命教授
佐藤 俊朗	慶應義塾大学 医学部	教授
片岡 圭亮	慶應義塾大学 医学部	教授
篠原 正和	神戸大学 大学院医学研究科	准教授
加部 泰明	慶應義塾大学 医学部	准教授
片桐 豊雅	徳島大学 先端酵素学研究所	教授
久保田 浩行	九州大学 生体防御医学研究所	教授
山本 陽一朗	理化学研究所 革新知能統合研究センター	チームリーダー
武部 貴則	東京医科歯科大学 統合研究機構	教授
松田 道行	京都大学 大学院生命科学研究所	教授
浦野 泰照	東京大学 大学院薬学系研究科	教授
米村 重信	徳島大学 大学院医歯薬学研究所	教授
黒田 真史	東京大学 国際高等研究所 ニューロインテリジェンス国際研究機構	特任助教
原 英二	大阪大学 微生物病研究所	教授
服部 鮎奈	京都大学 医生物学研究所	准教授
山下 暁朗	琉球大学 大学院医学研究科	教授
一條 秀憲	東京大学 大学院薬学系研究科	教授
永野 修	慶應義塾大学 医学部	准教授
高橋 暁子	公益財団法人がん研究会 がん研究所	部長
大野 茂男	順天堂大学 大学院医学研究科	特任教授
南 康博	神戸大学 大学院医学研究科	教授
藤田 恭之	京都大学 大学院医学研究科	教授
大澤 志津江	名古屋大学 大学院理学研究科	教授

## 1. 当該年度における研究開発プロジェクトの実施概要

### (1) 研究開発プロジェクトの概要

膵がんを初めとした難治性がんの臨床検体を活用して、ELSIを踏まえた上で個人のゲノム情報やがん組織のゲノム異常を含む様々な生体データを取得し集積する為の新たな仕組みと新たな技術を開発する。また、ゲノムを含む様々なレベルの生体ビッグデータから、発症に関わる分子(及びネットワーク)をあぶり出す為の統合的な解析手法の開発、実験的な検証に必要となる患者オルガノイド・動物モデルなどのがんモデル系の開発、新たなイメージングデータ取得技術の開発などを進める。さらに、あぶり出された「候補」が、発症プロセスにおいて具体的にどのような役割を果たしているかを細胞生物学のレベルで特定するための生物学的実験系と技術の開発を進める。

### (2) 研究開発プロジェクトの実施状況

患者生体データの統合解析の共有プラットフォームの試験運用を開始すると共に、統合解析に必要な様々な要素技術の開発と運用、動物・オルガノイドモデル開発と解析、がんの発症と難治化プロセス(超早期・早期・浸潤・転移)の理解に向けたいくつかの独自で重要な技術の研究開発を進めた。

#### 研究開発項目1:

##### 患者生体データの統合解析に基づく最適医療(My Medicine)の要素技術の開発

前年度までに確立した慶應大学、京都大学、および神戸大学の倫理承認に基づく研究倫理基盤に則り、膵がんを中心に、様々なステージ(超早期がん、早期がん、進行がん)の患者から生体データおよび試料を取得し、患者生体試料リソースプラットフォームを構築し、その運用を開始した。特に、患者数の少なさと採取の困難さなどからこれまでほとんど解析が行われてこなかった早期及び超早期、さらに正常様組織の収集と集積、及び解析の体制及び技術の確立を加速化する為のタスクフォースを設置し、まずは同一機関内での共同利用を進めた。同時に、チーム内の他機関の研究者の利用の体制整備を進めた。具体的には、超早期病変から進行がんに至る様々な段階の膵がん患者、及び膵がんではない膵疾患の患者より、がん組織およびその近傍の正常組織、及び正常組織を採取・集積すると同時に、オルガノイドモデル及びゼノグラフトモデルの樹立を継続・加速化する為の体制を整えた。

患者オルガノイドを用いたゲノム編集を施し、Genotype-phenotype associationの検証が可能であることを確認した。さらに、がんの悪性度を評価できる生物学的な解析手法を確立し、がん発症及び進展のプロセスの解析が可能であることを実証した。

患者生体試料、及びオルガノイドを用いて、多層的なオミックス解析とイメージ解析を進め、標準化した解析および解析データのシェアをできる研究基盤を構築した。さらに、正常からがん病変へと進展する際のゲノム・エピゲノム変化を推定・解析するためのアルゴリズム・パイプラインを作成・実装した。また、公共データベースを用いて polygenic risk score により遺伝的がんリスク体質を定義し、体細胞異常に与える影響について網羅的に解明した。また、これまでに構築した質量分析技術を応用したオミックス解析基盤、及び多階層統合解析共有プラットフォームを用いて、いくつかの視点から、がん超早期発症機序の解析に取り組み、成果を得た。

#### 研究開発項目2:

## 超早期・早期・浸潤・転移機構の動物・オルガノイドモデル開発、統合解析と検証

患者生体データの統合解析に必要となる数理科学的な手法の選択と有効性の評価及び数理モデル作成に向けた検討を継続した。そして、様々な患者に由来する様々なステージのオルガノイドを発症プロセスに沿って疑似的に並べる方法論の検討の目的で、マウスの多階層時系列オームデータを用いた相互情報量によるネットワーク推定、多階層制御ネットワークの推定に成功した。並行して、機械学習を用いて病理画像から電子顕微鏡レベルの微細構造を生成する画像処理手法、マルチモーダルデータに対する特徴量選択と機械学習モデル選択を同時に行う特徴量組合せ選択法の基礎技術を確立し、各々特許申請を行なった。

前項で述べた様々な発症段階のオルガノイドモデルの作成とそれを利用した統合解析に加え、次世代のがん発症モデルとして、微小環境ネットワークを擬似化する患者オルガノイド解析基盤の整備を進めた。具体的には、患者からの iPS 細胞の樹立とその分化誘導法を確立し、肝がん前がん病変を対象とした技術開発に成功した。並行して、膵がん前がん病変、超早期がんを模倣するマウスモデル、PanIN、IPMN、ITPNなどを確立・解析し各々について成果を得た。

前年度に構築したイメージング解析プラットフォームにおけるヒト組織由来検体の利用に関する規定を整備し、受託システムやリモート化を進めることで研究を推進した。患者由来膵がんオルガノイド及びマウス腫瘍組織のライブイメージングに成功した。電子顕微鏡用サンプルの画像情報が数理解析による難治化、再発予測などに有用性の検討を確認した。イメージングプローブの多色展開を進め、臨床検体を用いた解析を進め成果を得た。

### 研究開発項目3:

#### がんの自然史(超早期・早期・浸潤・転移)の理解と細胞生物学的治療コンセプトの創出

細胞老化、腸内細菌叢、代謝シフト、がん免疫、幹細胞、細胞死、微小環境ネットワーク、がん細胞排除機構、EMT、細胞極性など、がんの発症と進展に関わると目される要因を起点とした異なる視点からの解析に必要となる擬術の開発を複層的に進めた。ヒト臨床検体(進行がん)やがん発症・進展モデルを用いた解析、公共DBからのデータマイニングの新手法の開発などを含む。これらの解析を通じて、マーカー分子、創薬標的分子の候補を多数取得することに成功した。以下に具体例を示す。

生体内での細胞老化反応をマウスの組織を用いて正確に検出できる方法の確立に成功した。腸内細菌の浸潤と細胞老化の関係を知るために、ヒトの膵がん組織を用いた空間トランスクリプトーム解析システムの構築を行った。遺伝子変異に起因して生じるがん特異抗原の発現を高める為の独自の制御法の開発を進めた。

がんの超初期病変の発症メカニズムについて老化細胞分泌因子の一つであるHGFが、がん変異細胞排除機構(細胞競合)を抑制し、Ras変異細胞の上皮列における増殖や基底膜側への浸潤を促進することを明らかにし、加齢や慢性炎症に伴い発がん率が上がる要因の一つとして、発がんの超初期においてSASP因子による細胞競合の機能低下が関与している可能性を示した。

細胞競合を起こす独自のモデルマウスと膵がん発症マウスを用いて膵がん前がん病変(ADM)のマーカー分子候補を同定することに成功し、ADMの生成メカニズムの解析を進めた。

### (3) プロジェクトマネジメントの実施状況

プロジェクト推進のマネジメント体制を強化する目的で、プロジェクトの学術面と戦略面での重要

事項をPMに助言するサブPMを配置し、サブPMと補佐、プロジェクト事務局責任者と副責任者、補佐からなる、執行部を新たに設置し、特に「重要事項の調整」及び「進捗状況の把握」に関わるPMの業務を協力を支援する体制を整え、運用を開始した。プロジェクトの加速化に向けて、主に項目1で進める「臨床検体・オルガノイド」リソースの整備と運用の加速を担うタスクフォースをサブPMのもとに設置し二名の新たな課題推進者を追加した。両名共に、膵臨床検体及びオルガノイド作成の経験を豊富に有する。さらに、一名は、オルガノイドを樹立する前の膵がん組織の詳細な解析も担う。また、3機関の各機関の担当者との調整、機関を超える調整を通じてリソースの整備状況(倫理・知財から学術的側面までを包含)の日常的なモニターと、調整・事務支援の体制として、代表機関にコーディネーターを配置し、育成と運用を開始した。患者オルガノイド技術に関わる国際連携の一環として、来年度に国際会議を開催する為の準備を進めた。事業化戦略及びグローバル展開、技術移転先、将来的な顧客開拓に関して、様々な関連分野の専門家をプロジェクトのアドバイザーとして招聘し、定期的、及び必要に応じた助言を受ける体制を構築した。データマネジメントに関して、各解析プラットフォーム内部、そして数理解析プラットフォームとの綿密な調整を開始した。臨床情報を含むデータをプロジェクト内で利用する為の取り組みを進めた。

## 2. 当該年度の研究開発プロジェクトの実施内容

- (1) 研究開発項目1:(患者生体データの統合解析に基づく最適医療(My Medicine)の要素技術の開発)

研究開発課題1:(患者生体試料リソースプラットフォームの構築と運用)

当該年度実施内容:患者生体試料リソースプラットフォームを拡充した。

前がん病変から進行がんに至る様々な段階の難治性がん患者由来の生体試料サンプル(血液、膵液などの体液、糞便、がん組織、近傍の正常組織、臨床データ(血液生化学データ、画像など)を、慶應大学、京都大学、および神戸大学の倫理承認に基づいて採取・集積し、患者生体試料リソースプラットフォームを充実した。

ヒトオルガノイドを充実させ、早期がん成立過程への理解を深めた。超早期膵がんオルガノイドの樹立法を確立し、これらの患者由来オルガノイド用いたゼノグラフトモデルの解析を開始した。また、並行してマウス早期病変オルガノイドと遺伝子改変による膵がんマウスモデルの解析を継続した。ゲノム、エピゲノム、RNAの配列解析データを数理・AIと共有するために、必要な倫理承認や対応を継続している。

要素技術の加速化を目的として、超早期病変から進行がんに至る様々な段階の膵がん患者より、がん組織およびその近傍の正常組織を採取・集積し、同一患者生体試料のリソースバンクを構築し解析する事で膵発がん基盤の解明を試みた。

正常組織、前がん病変、超早期がん病変、および進行がん病変より、各ステージのオルガノイドを樹立するために、それぞれに適した培養方法を検討した。各病態ステージに特徴的なエピゲノム状態を解明するために、膵臓がん細胞のエピゲノム解析を開始した。オルガノイドの中長期 in vitro 培養やマウス膵臓への同所移植から再度樹立したオルガノイド用いて、エピゲノム記憶の安定性および変化を解析する予備実験を実施した。

他の研究開発課題、研究開発項目とも連携して、オミックス解析、イメージング解析、およ

び細胞生物学的解析による多層的なオミックス解析を開始した。がんの自然史に沿った進行規定因子、バイオマーカーを抽出するため、リソースおよびデータの集積と解析を進めた。とくに超早期～早期膵がんを抽出する miRNA の検討を進めた。さらには超早期病変の診断に寄与する因子の抽出することを目指し、膵癌組織を用いたオミックス解析の予備的検討、あるいは膵液を用いたバイオマーカー探索を継続した。

約 2,000 例の膵がん症例の CT 過去画像を用いて、約半数の症例において、診断の3年前より限局性膵萎縮、あるいは1年前より膵管拡張といった早期膵がんを示す画像所見を認め、これらの画像所見を検出する AI 画像診断システムを構築した。

正常組織から、前がん病変、超早期がんを経由して、浸潤や転移を伴う進行がんへと進展する各過程で重要な因子を抽出するため、難治性がんの自然史を再現する動物モデルを充実させ、前がん病変、超早期がんに焦点をあてた解析を進めた。さらに、それら早期病変で活性化するシグナルを抽出し、その阻害効果を検証した。

課題推進者:妹尾 浩(京都大学)、児玉 裕三(神戸大学)、垣内 伸之(京都大学)、今井 俊夫(神戸大学)

研究開発課題2:(患者由来がんオルガノイド培養プラットフォームの開発とその応用展開)

当該年度実施内容:標準化した手法を用いて患者由来オルガノイドを樹立するとともに、未病オルガノイドの樹立を試みた。

患者由来オルガノイドの最適化、技術共有と標準化では、前年度に引き続き最適化したプラットフォームの開発を行い、チーム内でのサンプルおよび解析データの共有を進めた。患者オルガノイドを用いた生物学的な形質解析と Genotype-phenotype association の検証では、解析によって得られたゲノム病変に対し、ゲノム編集などの遺伝子改変を行い、表現型の確認を行った。患者由来がんオルガノイド培養プラットフォームの開発とその応用展開では、オルガノイドを用いた難治性がんの発症・浸潤・転移の病態解明を目指して、樹立した様々な進行度の正常-超早期-早期-進行がんオルガノイドを用い、がんの悪性度を評価できる生物学的な解析手法を確立した。

課題推進者:佐藤 俊朗(慶應義塾大学)

研究開発課題3:(オミックス解析基盤の構築・多階層統合解析共有プラットフォームの構築と運用)

当該年度実施内容:オミックス解析基盤、及び多階層統合解析共有プラットフォームを拡充した。

患者生体試料、および、それらから樹立したオルガノイドを用いて、多層的なオミックス解析とイメージ解析を進め、標準化した解析および解析データのシェアをできる研究基盤を構築し管理・運用を実施した。個体の生体試料とそれらから樹立したオルガノイドに関する様々なデータを取得し、それらのデータが紐づけられた解析共有プラットフォームを構築した。オルガノイドおよび公共データベースを用いて、正常-超早期-早期-がん病変へと進展するゲノム・エピゲノム変化を推定・解析するためのアルゴリズム・パイプラインを作成・実

装した。また、このようなプラットフォームを利用して、TCGA や UK Biobank データを用いて polygenic risk score により遺伝的がんリスク体質を定義し、体細胞異常に与える影響について網羅的に解明した。

これまでに構築した質量分析技術を応用したオミックス解析基盤、及び多階層統合解析共有プラットフォームを用いて、代謝物変動の視点から、がん超早期発症機序の解析に取り組んだ。生体試料およびオルガノイドの包括的脂質メディエーター解析を用いたがん超早期発症機序の解明では、標準化された患者由来検体・オルガノイドを用いた水溶性・脂質代謝物解析を推進し、脂質代謝物解析系の拡張を進めた。超早期膵がん発症モデルマウスの包括的メタボローム解析を用いたがん超早期発症機序の解明では、前がん病変発症前の段階より経時的な水溶性代謝物・脂質代謝物の包括的解析を推進した。

要素技術の開発では、(1) 代謝物の変換を追跡できる metabolomics 技術、(2) 代謝物の組織内分布を高空間分解能でイメージングできる Imaging MS 技術および、解析が困難であった polysulfide などの還元性代謝物を組織標本から直接解析することが可能な金基盤を用いたラマンイメージングシステム(SERS imaging)、(3) 低分子代謝物などの特異的受容体候補を細胞・組織から探索可能な affinity nanobeads 技術、(4) がん細胞から放出される膜小胞エクソソームの絶対定量システム、を推進し、膵がんなどの難治性癌における代謝変動解析およびマーカー分子探索を行うことにより、超早期のがんの診断や発症のメカニズムの解明を実施した。臨床血液検体などの代謝物の安定性を検証し、臨床血液検体における疾患特異的マーカー分子(代謝物、エクソソームなど)の選定のための評価系の構築を行った。また、抗がん機能を有する薬剤の受容体タンパク質の探索を行うとともに、難治性がん病変部位におけるチオール化修飾の変動が悪性化における制御に関わることを解明した。

オミックス解析基盤、及び多階層統合解析共有プラットフォームの構築に向けた準備を推進した。難治性がん、特に膵がんでは、抗がん剤耐性膵がんオルガノイドを樹立して、オミックス解析基盤及び多階層統合解析共有プラットフォームによる解析を進めている。また、生体サンプル由来の液性因子が細胞間接着と相補的あるいは相乗的に制御するシグナル経路については、生体試料からの抽出液を用いて生化学的解析を進めている。

課題推進者:片岡 圭亮(慶應義塾大学)、篠原 正和(神戸大学)、加部 泰明(慶應義塾大学)、片桐 豊雅(徳島大学)

## (2) 研究開発項目2:(超早期・早期・浸潤・転移機構の動物・オルガノイドモデル開発、統合解析と検証)

研究開発課題1:(患者生体データの統合解析を通じた発症・浸潤・転移のネットワーク解析)  
当該年度実施内容:患者生体データの統合解析のために、オミックスデータを用いた予備解析と数理モデル作成に向けた検討を開始した。

さまざまなステージのがん患者から得られるオルガノイドについて、正常から超早期さらには末期がんへの進行を模倣したオルガノイドの疑似時系列解析を試みている。オルガノイ



ドを用いた疑似時系列解析における問題に対処してより深い解析を行うために、新たに専門的な研究者が参加した。まず、トランスクリプトームデータに対する相互情報量を用いたネットワーク推定の検討のために、400 サンプルのマウス肝臓の個体データに対して、相互情報量を用いたネットワーク推定を行った。今後、本手法により、がん細胞の発生・進展と微小環境の細胞の関係性が推定できると期待される。マウスを用いた多階層オームデータを用いた多階層ネットワークの推定では、多階層の時系列オームデータ(エピゲノム・トランスクリプトーム・発現プロテオーム・リン酸化プロテオーム・メタボローム)を用いて、数理的・統計的・バイオインフォマティクスの手法を用いて多階層の制御ネットワークを推定した。これにより、長期的な多階層にまたがるネットワークの変容がどのような順番で進行していくのかを検討することが出来るようになり、がんの発生と進展において今後得られる多階層オームデータの制御関係とそのタイミングを推定できると期待できる。

機械学習を用いた探索的イメージ解析技術の開発と実施では、超早期検出を目的とした、電子顕微鏡画像や広範囲細胞像と既存の組織像とを結びつける生成系機械学習をベースとした数理手法の開発を行い、病理画像からの電子顕微鏡レベルの微細構造を生成する画像処理手法を開発し特許申請した。機械学習を用いた複合データの統合解析については、膵がんや前立腺がんといった腫瘍性疾患を対象とした複合データの統合解析を行うと共に、マルチモーダルデータに対する特徴量選択と機械学習モデル選択を同時に行う特徴量組合せ選択法の基礎技術開発に成功し、特許申請を行った。

がんの自然史(超早期・早期・浸潤・転移)の理解を深化させるため、生物学チームと協働した数理モデル作成の準備を開始した。

課題推進者:久保田 浩行(九州大学)、山本 陽一朗(理化学研究所)

研究開発課題2:(難治性がんの動物モデル、オルガノイドモデルの展開とネットワーク解析・生体データの取得、発症・浸潤・転移のネットワーク解析)

当該年度実施内容:微小環境ネットワークを擬似化するがん研究に最適化したiPS細胞およびオルガノイド培養法の開発を遂行した。

国民一人ひとりに対し個人の特性に応じた最適ながん予防・診断・治療アプローチ(My Medicine)を提供できる社会の実現に向けて、前年度までに樹立してきたがん患者由来iPS細胞を活用しながら、がん研究に最適化したiPS細胞およびオルガノイド培養法の開発を推進した。また、オルガノイドによるがんの浸潤・転移メカニズム解明に資するアクセシ系を構築し、その有用性を評価しながら、微小環境ネットワークを擬似化する患者オルガノイド解析基盤を整備した。

課題推進者:武部 貴則(東京医科歯科大学)

研究開発課題3:(イメージング解析プラットフォームの構築と運用・イメージングプローブ開発と応用展開)

当該年度実施内容:膵がん患者由来オルガノイドを用いたイメージング解析とイメージングプローブ開発を推進した。がん細胞と周囲環境の微細形態イメージングプラットフォーム



ムを構築した。

マウスがん組織の長期間ライブイメージングを実施し、膵がん成長過程における分子活性変化を解析した。また、イメージング解析プラットフォームの多光子顕微鏡の運用を開始した。多数のオルガノイドの活性イメージングによりデータを蓄積した。具体的には、マウス腫瘍組織におけるがん細胞と宿主細胞の相互作用を可視化するライブイメージングプラットフォームの運用を開始してユーザー講習会を行った。また、ヒト患者由来膵がんオルガノイドにバイオセンサーを発現させ、多光子顕微鏡で観察する系を 10 種類のオルガノイドについて適用し、薬剤効果と遺伝子発現との関連性について検討した。

がんバイオマーカー酵素の発見に資する蛍光プローブ群の開発と臨床検体スクリーニングでは、プロテアーゼ、グリコシダーゼ活性検出蛍光プローブ群の合成・拡充と多色化(緑色と赤色)を達成し、これらのライブラリーを活用した臨床検体スクリーニングを、様々ながん種で行った。肺がんイメージングプローブについては、DPP-4 と PSA の 2 種の酵素活性が有効なバイオマーカーとなり得ることが明らかとなり、高い感度・特異度でのがんイメージングが達成された。その他、卵巣がん腹膜播種、卵巣明細胞がん、大腸がんに関しても、それぞれの外科と共同して新鮮臨床検体を収集し、スクリーニングを開始して、いくつかの候補プローブが見いだされている。

プローブ群応答の AI 解析に基づく患者の層別化と個別化医療サポート技術の確立では、様々な培養がん細胞が持つ酵素活性の網羅的評価を目指し、プレートリーダーを用いて細胞外に漏れ出てくる蛍光生成物の量・濃度を定量する方法を検討した。その結果、安定したデータが得られることが明らかとなり、現在様々な細胞種でデータの蓄積を実施している。

超早期、早期のがんの診断、あるいは再発予測に向けた数理的解析における、電子顕微鏡用サンプルの画像情報の有用性の検討では、今回導入した電子顕微鏡装置について、新しく雇用した技術補佐員にも関連技術の習得を開始させ、がんに関係する組織サンプルも使用を開始し、条件検討が進んで実際のデータを取得する段階まで進んでいる。がん再発予測などに向けた AI 技術開発のための既存の病理標本像と電子顕微鏡画像の情報量の比較検討を数理チームと共同で実施し、電子顕微鏡用に固定・包埋された試料は、切片を光学顕微鏡で観察した場合でも従来の病理切片より多くの形態情報があり、光学顕微鏡像から電子顕微鏡像を予測することが可能となった。

がん組織の透明化・三次元イメージング技術においては、従来型のライトシート顕微鏡ではセンチメートルサイズの大きな組織サンプルを観察対象としていたが、オルガノイド検体ではより高倍率・高解像に三次元観察する必要がある。そこで、市販の倒立顕微鏡にユニットとして接続可能であり、ステージトップ培養システムもそのまま利用可能な、単一对物レンズ型ライトシート顕微鏡を開発し、ミリメートルサイズの試料を高速に撮像可能であることを検証した。

課題推進者: 松田 道行(京都大学)、浦野 泰照(東京大学)、米村 重信(徳島大学)、黒田 真史(東京大学)

(3) 研究開発項目3:(がんの自然史(超早期・早期・浸潤・転移)の理解と細胞生物学的治療

## コンセプトの創出)

研究開発課題1: (腸内細菌叢、がん免疫、代謝の視点からの生体内ネットワーク解析と創薬開発)

当該年度実施内容: 患者試料とモデルマウスを用いた解析システムを構築し、代謝変化によるがん幹細胞性の維持、細胞ストレスによる RNA 代謝の変動とがん免疫、難治がんの発生及び進展に及ぼす腸内細菌の浸潤と細胞老化に関わる機構解析を推進した。

生体内での細胞老化反応を検出するために必要な内在性 p16蛋白質の発現をマウスの組織を用いて正確に検出できる方法の確立に成功した。さらに、マウスを用いた研究により明らかにされつつある難治がんの発生及び進展に及ぼす腸内細菌の浸潤と細胞老化の関係が、ヒトにも当てはまるかどうかを明らかにするために、ヒトの膵がん組織を用いた空間トランスクリプトーム解析システムの構築を行った。

がん細胞は、正常細胞とは異なった代謝経路を積極的に活用し、エネルギー産生や脂質・核酸・アミノ酸合成を行うことでがん組織の維持・増殖を行うことが知られている。そこで、代謝変化そのものが、がんの発生・進行を引き起こす一因であるという知見に基づき、新たながん幹細胞制御機構の解明を目指している。定量性・再現性が優れた HPLC および、細胞を生きたまま解析可能な個体 NMR を用いた解析の結果、アミノ酸代謝酵素ががん幹細胞性の維持やがんの悪性化に関与することが明らかとなった。これまでに、分岐鎖アミノ酸(BCAA)代謝は、複数のがん種において腫瘍維持に寄与することが明らかとなっているが、がんが発生・悪性化しやすい環境を作り出している可能性がある。その結果、乳がんにおいて BCAA 濃度が高い細胞が腫瘍形成能をもつことを見出した。また、松田らと共同で、バイオセンサーを用いた BCAA 細胞内濃度のライブイメージング法を開発し、藤田らと共同で、細胞競合において BCAA 濃度が上昇することを見出した。

がん微小環境におけるストレスと mRNA 品質管理機構の一つであるナンセンス変異依存 mRNA 分解機構 (nonsense mediated decay: NMD)の阻害に注目したがん治療コンセプトの創出では、マウス生体における簡便な NMD 阻害法として、断食、アミノアシル tRNA 合成酵素阻害剤投与、プロテアソーム阻害剤投与を確立した。ストレス依存的 NMD 阻害タンパク質の同定を進めている。難治性がんにおけるストレスとがん抗原タンパク質発現機構の相関関係の解明については、モデル抗原を用いた実験系の確立を試みている。

課題推進者: 原 英二(大阪大学)、服部 鮎奈(京都大)、山下 暁朗(琉球大学)

研究開発課題2: (幹細胞、細胞死、細胞老化の視点からの生体内微小環境ネットワーク解析)

当該年度実施内容: がん幹細胞、細胞死、細胞老化と生体内微小環境ネットワークとの機能関連に関する研究を推進した。

細胞老化に着目したがん治療コンセプトの創出については、老化細胞特異的な生存維持因子を網羅的に探索・同定したスクリーニングに関して、陽性遺伝子の機能解析を進めた。さらに、メタボローム解析から老化細胞でポリアミン量が減少すること及びその代謝酵素が老化細胞の生存維持に必要であることを見出した。細胞競合による細胞死に着目したがん治療コンセプトの創出では、早期・超早期発がんにおける細胞競合の働きを解析す

るため、発がん早期を模倣した新たな細胞競合マウスモデルを構築した。物理化学的ストレスによる細胞死に着目したがん治療コンセプトの創出を目指して、高浸透圧ストレスに曝されたがん細胞株で糖代謝が急激に変化することを発見し、その代謝変化を抑制することでがん細胞の細胞死が亢進することを見出した。

がん幹細胞の維持に関わるフェロトーシス抵抗性ニッチに着目したがん治療コンセプトの創出では、がんの早期に腫瘍を引き起こす働きを有するがん幹細胞(腫瘍開始細胞)の生存に関わるフェロトーシス抵抗性を促進する変化について、フェロトーシス誘導可能なマウス膵癌細胞移植モデルを用いて微小環境の解析を行うためにシングルセル解析を基に研究を推進した。フェロトーシス抵抗性に関わる難治性がんのゲノム変化に着目したがん治療コンセプトの創出については、公共データベースの解析から明らかになったフェロトーシス抵抗性に関わる遺伝子変異を同定した。さらに、データベース解析から遺伝子の発現亢進が、がん患者の予後とフェロトーシス抵抗性の促進に関与することが示唆された分子についてトランスポーターの機能に対する新たな役割を発見した。臨床検体を用いたがん幹細胞マーカーの検出と早期がんマーカー有用性検討においては、神戸大学(児玉先生)にて採取された患者検体(膵液、十二指腸液などの体液)について、早期がんマーカー候補分子について慢性膵炎患者の膵液サンプルについて解析した。

難治性がんの発生と進行に関わる細胞老化や SASP を制御する分子メカニズムの解明では、がんの超初期病変の発症メカニズムについて、老化細胞分泌因子(SASP 因子)による細胞競合の制御機構の解析を藤田らと共同で実施した。SASP 因子の一つである HGF (hepatocyte growth factor) が、がん変異細胞排除機構である細胞競合を抑制し、Ras 変異細胞の上皮列における増殖や基底膜側への浸潤を促進することを明らかにした。加齢や慢性炎症に伴い発がん率が上がる要因の一つとして、発がんの超初期において SASP 因子による細胞競合の機能低下が関与している可能性が示された。生体の老化細胞を検出するマーカーを探索し新たな診断法を創出する目的で細胞外小胞(EVs)のプロテオーム解析を行い、老化細胞由来 EVs と Werner 症候群の患者細胞由来 EVs に共通して高発現するタンパク質を同定した。これら2つのタンパク質は、老齢マウスの血清中の EVs にも有意に濃縮されていたことから、新たな老化マーカーとして体内の老化細胞の存在を検出できる可能性が示唆された。

課題推進者: 一條 秀憲(東京大学)、永野 修(慶應義塾大学)、高橋 暁子(がん研究会がん研究所)

### 研究開発課題3: (がん超早期・早期病変に対する細胞生物学的治療コンセプトの創出)

当該年度実施内容: ヒトがん細胞株、膵がん発症マウスモデル、ショウジョウバエ上皮モデルを用いて、がん細胞排除機構、細胞極性制御機構の解明を推進した。

がん発症プロセス、がん幹細胞の非対称分裂、がん悪性化プロセスに関わる分子ネットワークの新規構成因子について、分子メカニズムの解析を進めた。上皮細胞の極性制御機構から迫るがん発症プロセスの解明では、PKC  $\lambda$  シグナリングの構成因子が上皮細胞の極性を制御する分子機構を解析した。がん幹細胞の非対称分裂から迫るがんの不均一化の解明については、オートファジーによる PKC  $\lambda$  タンパクの翻訳制御メカニズムが、がん幹

細胞の非対称分裂とがんの不均一な代謝特性パターンを制御する分子機構の解析に取り組んだ。がん細胞の代謝シフトから迫るがん進行プロセスの解明は、前年度までに得られた代謝関連候補分子が、細胞極性タンパク質に依存して、がん細胞の代謝を制御する分子機構の解析を実施した。タイトジャンクション関連分子ががん細胞の転移を促進する分子メカニズムの解析にも取り組んでいる。さらに、がん患者ゲノクスデータに対して相互情報量を用いたデータマイニングを行い、乳がんの晩期再発に関連する遺伝子群を抽出した。

細胞形態変化・血管擬態に着目したがん治療コンセプトの創出については、極性制御分子 Ror1 の発現量が、膵がんなどの難治性がんの生命予後と正の相関を示し、がん微小環境での低酸素・低栄養条件下での生存に重要な血管擬態形成の関与が示唆された。さらに、グリオブラストーマ細胞においては低酸素シグナルや Notch シグナルにより Ror1 の発現が誘導され、がん微小環境から供給される Wnt5a (Ror1 のリガンド分子)の作用によりグリオブラストーマ細胞の幹細胞性維持機能が亢進することを見出した。代謝変動に着目したがん治療コンセプトの創出については、卵巣がん細胞でのシスプラチン（プラチナ製剤）の作用が脂質過酸化を介したフェロトーシス誘導によることと耐性化がミトコンドリアに局在する鉄硫黄クラスタータンパク質の発現誘導を介することを明らかにした。この成果は、鉄硫黄クラスタータンパク質が、卵巣がんの再発における抗がん薬の選択や予後判定に関わるマーカーであることを示唆している。EMT (epithelial-mesenchymal transition)・極性変化に着目したがん治療コンセプトの創出では、Wnt5a 刺激が浸潤突起の形成・伸長を介してがん細胞の浸潤能を亢進する分子メカニズムを解明した。また、肺腺がん細胞では、低分子量 G タンパク質が Wnt5a-Ror1-Dvl2 シグナルを活性化することにより細胞外基質との相互作用を介して浸潤方向への極性を持った糸状突起形成や細胞増殖を促進し、肺腺がんの浸潤・増悪化に大きく寄与することを明らかにした。

細胞競合研究を応用した前がん病変診断マーカーの同定については、Ras 変異細胞を特異的に認識する抗体を複数同定しており、上皮細胞に RasV12 変異タンパク質の発現をモザイク様に誘起できるマウスモデルで、これら抗体が Ras 変異細胞を特異的に認識することが明らかになった。膵臓上皮細胞特異的に Ras 変異と p53 変異を誘起する KPC マウスモデルにおいては、膵臓がんの前がん病変である ADM (acinar-ductal metaplasia)に、これら抗体が特異的に集積することが明らかになった。膵臓がんの前がん病変のマーカー分子候補を同定するとともに、ADM の生成メカニズムについても重要な知見を得ることができた。これら抗体の認識する分子は、細胞競合による変異細胞の排除機構に関与する可能性があり、標的分子のノックダウンが正常上皮細胞と Ras 変異細胞間で生じる細胞競合現象に与える影響を解析したところ、Ras 変異細胞で集積した標的分子を隣接する正常細胞が認識して排除を促進している可能性が示された。

ショウジョウバエ上皮モデルでは、がん細胞排除機構、EMT・細胞極性を制御する分子メカニズムの解明に向けた遺伝学的スクリーニングおよび器官培養系を用いたライブイメージング解析を実施した。細胞間相互作用を介したがん治療コンセプトの創出については、細胞競合を介したがん原性細胞の排除機構の遺伝学的解析を行い、エクソサイトシスが細胞競合に寄与することを明らかにした。突然変異を獲得した前がん細胞が組織内で増殖・拡大していく過程での、スーパーコンペティシ

ョン（変異細胞が細胞競合を介して正常細胞を駆逐してその領地を拡大する）の役割を明らかにするために2種類の大規模遺伝学的スクリーニングを実施した。これまでに、スーパーコンペティションを抑制する系統を9系統、促進する系統を2系統単離することに成功しており、抑制する4系統については、変異細胞が隣接した正常細胞に対してオートファジーを誘導することで細胞死を非自律的に引き起こすことを明らかにしている。本年度は、スーパーコンペティションを引き起こす1系統について、その責任遺伝子を同定した。また、がん遺伝子の活性化と上皮細胞の apico-basal 極性の崩壊を同時に起こした悪性腫瘍モデルについて、遺伝学的解析および器官培養系を用いたライブイメージングを実施し、マクロファージによる貪食が非自律的にがん促進を引き起こす可能性を見いだした。

課題推進者:大野 茂男(順天堂大学)、南 康博(神戸大学)、藤田 恭之(京都大学)、大澤 志津江(名古屋大学)

### 3. 当該年度のプロジェクトマネジメント実施内容

#### (1) 研究開発プロジェクトのガバナンス

##### 進捗状況の把握及び研究開発プロジェクトの展開

###### ○ 代表機関のPM支援チーム

順天堂大学の研究戦略推進センターのMS担当職員、PM支援職員、PM支援教員、などで構成されたPM支援チームで、PM事務を支援した。重要事項の連絡とリアルタイムでの共有を担うメンバー専用HP(課題推進者向け)、Slack(課題推進者及び研究参加者)、メール、Dropbox、Boxを用いた情報共有体制を継続した。

###### ○ 重要事項の調整(執行部、運営会議、研究グループ)

プロジェクトマネジメントの業務は、学術的な状況把握から、事務書類の精査と修正まで、極めて多岐に渡り、PM及び代表機関のPM支援チームだけでは対応に無理があることが明らかとなってきた。さらに、本年度は、プロジェクトの加速化に向けた追加予算の申請に向けて、体制及び戦略の強靱化に向けた様々な事項を調整し、決定する取り組みを行なった。そのような中で、プロジェクト開始から2年を経た昨年末に、プロジェクト推進のマネジメント体制を強化する目的で、プロジェクトの学術面と戦略面での重要事項をPMに助言するサブPMを配置すると同時に、サブPMと補佐、プロジェクト事務局責任者と副責任者、補佐からなる、執行部を新たに設置し、特に「重要事項の調整」及び「進捗状況の把握」に関わるPMの業務を協力に支援する体制を整え、運用を開始した。

###### ○進捗状況の把握とプロジェクト運営の迅速化

前年度に設置した研究チームを、これまでの研究内容・成果等を踏まえて、研究グループを再編成し、グループ内・グループ間の連携や共同研究などをさらに活性化した。各グループにはグループ長とサブグループ長を置き、各グループ長・サブグループ長を構成員とし、執行部で統括する体制とした。

###### ○「臨床検体・オルガノイド」リソースの構築の加速化に向けたタスクフォースの設置と運用、及び課題推進者の追加

追加予算を用いて、主に項目1で進める「臨床検体・オルガノイド」リソースの整備と運用の加速を

担うタスクフォースをサブPMの佐藤教授のもとに設置した。そして、膵がんをフォーカスした「臨床検体・オルガノイド」リソースの構築の加速化に向けて、研究開発項目1に、二名の新たな課題推進者(今井俊夫(神戸大学)、垣内伸之(京都大学))を追加した。両名共に、膵臨床検体及びオルガノイド作成の経験を豊富に有する。さらに、垣内伸之(京都大学)は、オルガノイドを樹立する前の膵がん組織の詳細な解析を担う。

#### ○「臨床検体・オルガノイド」リソースの整備と運用をコーディネートする専門事務職の配置

主に項目1で進める「臨床検体・オルガノイド」リソースの整備と運用は、慶應大学、京都大学、神戸大学の3機関に分散して行われることになる。その加速化には、3機関で行われる整備を一体的に進める仕組みが必要である。そこで、3機関の各機関の担当者との調整、機関を超える調整を通じて、におけるリソースの整備状況(倫理・知財から学術的側面までを包含)の日常的なモニターと、調整・事務支援の体制として、代表機関にコーディネーターを配置し、育成と運用を開始した。

#### ○オルガノイド技術に関わる国際会議の企画と準備

日進月歩で進化発展している患者オルガノイド技術に関わる国際連携の一環として、来年度に国際会議を開催する為の準備を進めた。

○長期の目標を見据えて進めている本MSプロジェクトの目的の達成のためには、5年後、10年後を担う若手人材の育成が極めて重要である。特に、数理・AIなどのドライ研究と発がんモデルなどを用いたウェット研究の両者を理解し、使いこなすことができる人材の育成が必須である。その目的で、若手育成プログラムとして、課題推進者の研究室の若手の研究成果を相互に議論するセミナーシリーズを開始した。Zoomを利用したものに加えて、一泊二日のリアルの会議も行なうなどの取り組みにより、人材育成面のみならず、学術面で大きな成果をあげた。

## (2) 研究成果の展開

○ 研究開発プロジェクトにおける知財戦略や知財出願に関して、本研究開発プロジェクトで得られた成果の公表に先だって、知財の観点からの熟考を、全ての研究開発課題推進者に日常的に求めた。そして、必要に応じて気軽に各々の所属研究機関の知財担当者の助言を得ることを求めた。更に、上述した情報流通の仕組みを利用して、公表に先だってPMが知財状況を把握できる仕組みを構築し運用した。また、今後の展開に備えて、工業所有権情報・研修館(INPIT)からの、知財に関わる専門職員(知財プロデューサー)の配置を検討した。

○事業化戦略及びグローバル展開、技術移転先、将来的な顧客開拓に関して、様々な関連分野の専門家をプロジェクトのアドバイザーとして招聘し、定期的、及び必要に応じた助言を受ける体制を構築した。

## (3) 広報、アウトリーチ

○ ホームページを活用した広報、アウトリーチ活動を行なった。本研究開発プロジェクトは、全国民に直接関わる可能性のある目標を掲げているという意味で、これまでの研究開発プロジェクトとは一線を画している。なにより、MS目標の達成には、全国民の理解と強力な支援が必要である。従来 of 市民向けの講座、シンポジウムなどとは一線を画した、効率的な(コスパのよい)手法も取り入れるべく、「広告医学」の専門家のアドバイスを求めつつ検討を進めた。

#### (4) データマネジメントに関する取り組み

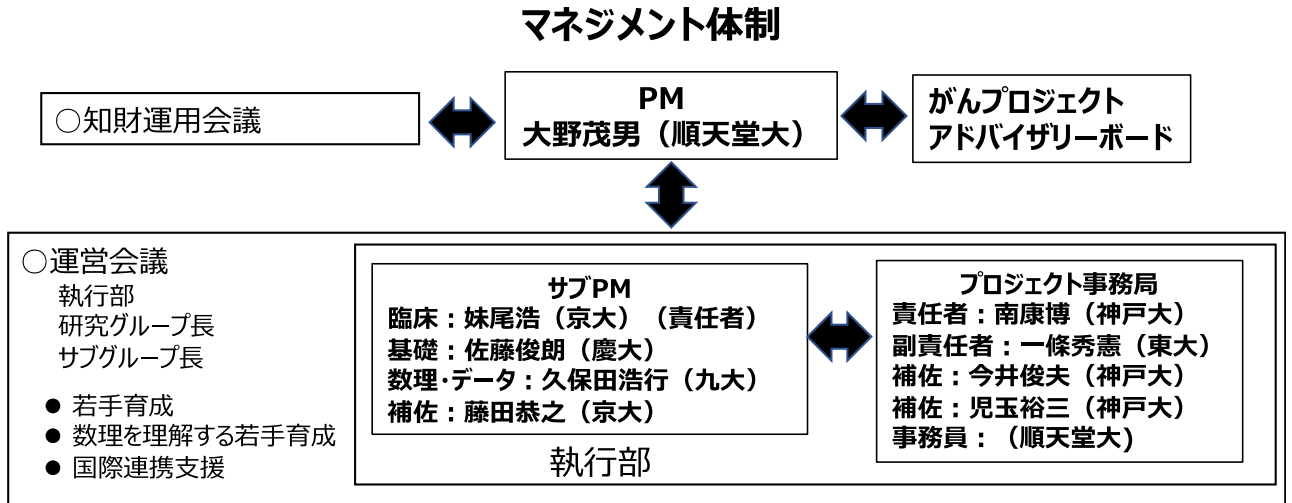
本プロジェクトでは、様々な解析機器から得られるデータを標準化することにより、研究室を超えた利用、数理解析の専門家の利用を可能とする。その為には、各解析プラットフォーム内部、そして数理解析プラットフォームとの綿密な調整を開始した。

本プロジェクトでは、臨床検体を利用する。三機関の倫理委員会の承認を得た。このような試みには、患者の理解と同意が必要であり、倫理面に加えて、ELSI面での幅広い見地からのアドバイスを受けて行う必要がある。その為の取り組みを進めた。

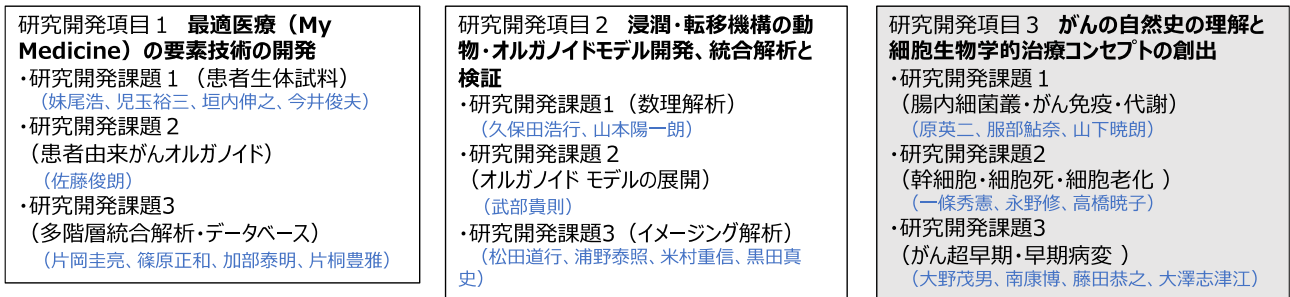
収集したデータは、先ずはプロジェクト内で利用中である。臨床情報を含むデータは、匿名化の後に、解析共有プラットフォームへアップロードし、プロジェクト内で利用する。その保存と流通を目的として、Cloudを利用したシステムを構築する必要がある。その為の取り組みを進めた。



#### 4. 当該年度の研究開発プロジェクト推進体制図



### 研究開発項目・課題



### 研究グループ



- A. 超早期ヒト難治がん臨床試料集積・オルガノイド作製 (G長：児玉)
  1. 臨床試料集積 (妹尾、児玉、垣内、今井、佐藤) (サブG長：児玉)
  2. オルガノイド作製 (佐藤、武部、妹尾、児玉、垣内、今井、片岡、浦野) (サブG長：武部)
- B. ヒト難治がんの超早期での発症・進展機構 (G長：原)
  1. 臨床研究 (妹尾、児玉) (サブG長：児玉)
  2. 基礎研究 (サブG長：高橋)
    - 2-1. がん生存・排除解析 (高橋、大澤、一條、藤田)
    - 2-2. がん微小環境解析 (永野、大野、南、佐藤、今井)
    - 2-3. 臓器連関解析 (原、服部、山下)
- C. オミックスと動的・超微形態 (G長：松田)
  1. オミックス解析 (片桐、片岡、篠原、加部) (サブG長：片桐)
  2. 動的・超微形態解析 (松田、浦野、米村、黒田) (サブG長：浦野)
- D. 数理・データ解析 (G長：久保田) (久保田、山本)

## 5. 当該年度の成果データ集計

知的財産権件数				
	特許		その他産業財産権	
	国内	国際(PCT含む)	国内	国際
未登録件数	5	0	0	0
登録件数	0	0	0	0
合計(出願件数)	5	0	0	0

会議発表数			
	国内	国際	総数
招待講演	69	28	97
口頭発表	38	4	42
ポスター発表	28	7	35
合計	135	39	174

原著論文数(※proceedingsを含む)			
	国内	国際	総数
件数	3	50	53
(うち、査読有)	3	49	52

その他著作物数(総説、書籍など)			
	国内	国際	総数
総説	6	3	9
書籍	0	0	0
その他	0	0	0
合計	6	3	9

受賞件数		
国内	国際	総数
2	2	4

プレスリリース件数
3

報道件数
0

ワークショップ等、アウトリーチ件数
13