



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

2023 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



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

本研究開発プロジェクトでは、膵がんを中心にした難治性がんの予防法・予測法を2050年までに開発する。そのために、最初の5年間でプロジェクト内での基礎・臨床研究者や数理・AI研究者が緊密な連携・共同研究を通して必要な情報を有機的・体系的に収集するとともに、膵がんなどの難治性がんの予防・予測のためのバイオマーカーを抽出し、POCを取得する。今年度は、超早期（未病）・早期の解明に研究の焦点を当てて、前年度までに各研究課題推進者が取得した研究リソースや研究成果を集約するとともに、新たに参画した研究課題推進者（今井、垣内）の有する独自の技術基盤などを最大限に活用して、プロジェクト内での連携をさらに強化し予防法・予測法の開発に向けた基礎・臨床研究を推進する。ヒト膵臓オルガノイドを中心的な研究材料としつつ、早期膵がん組織検体やマウス膵がんモデルなどを利活用した基礎・臨床研究も並行して実施し、数理・AI解析との連携によるPDCAサイクルを通して研究を実効的に進める。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ともに、動物・オルガノイドモデル開発、がんの超早期・早期から難治化に至るプロセスの理解に向けた研究を体系的に進める。

(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）の理解に向けた独自で重要な技術の研究開発を進めた。特に、がんの超早期・早期から難治化に至るプロセスの理解に向けた体系的な研究を進めた。

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

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・加速化した。特に、膵正常、前がん病変に焦点をあてた生体試料収集を加速した。超早期膵がんオルガノイドなど、各ステージに適した培養方法を確立し、オルガノイドを安定的に樹立することに成功した。また、難治性がんの発症から進行に至る患者生体データの統合解析のために、同一患者からの複数クローンの樹立を推進した。さらに、膵上皮細胞の単一細胞由来オルガノイドを様々な年齢の患者か

ら樹立して解析する事により、膵上皮細胞における遺伝子変異の蓄積速度を決定することで変異数を分子時計として用いるための解析を実施した。

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。患者由来オルガノイドのうち、膵正常組織由来オルガノイドの樹立プロトコルを改良し、同一患者・同一組織内で由来細胞ごとにオルガノイドを樹立することが可能になった。がんの進行に応じた多細胞間相互作用ネットワークの理解に向けて、少量オルガノイド検体からのゲノム解析技術をチーム内で共有し、膵臓がん発症メカニズム解明の基盤となる正常組織における細胞種類ごとの全ゲノム配列データを取得した。

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、このようなプラットフォームを利用して、C-CAT データを用いて日本人のがんドライバー異常の全体像を解明し、GENIE・TCGA データと組み合わせてドライバー変異の共存・排他関係を網羅的に解明した (Horie, Saito Y, Cancer Discov, 2024)。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、成果を公表すると同時に知財化を進めた。

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

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解析を通じて、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手法を確立した。また、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を行った。他チームと協働した数理モデル作成を開始した。マルチモーダル型のデータ解析を行った。特に、膵がんについては、これまでの病理 AI システムを発展させ、抗がん剤における治療効果予測を可能とする探索的な機械学習手法を構築・発表した (Yamaguchi et al. Pancreas 2024)。各データに対しては、過学習を避けるために次元圧縮技術を適宜使用することで、将来的に複数施設のデータに対応可能な技術開発を行うことができた。

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。iPS 細胞から卵黄静脈様造血性血管内皮細胞を経て、肝類同内皮細胞を創出する独自の分化誘導プロトコルを基盤として、多層化ゲルと気液界面培養を組み合わせた手法によって、複数の血管内皮細胞と肝細胞・間葉系細胞を統合する培養手法を確立した。また、得られたオルガノイドに対して、シングルセルトランスクリプトーム解析を適応することで、ストロマ構成細胞において生じる多細胞間相互作用を担う分子経路を明らかにし、正常から発がん過程にいたる早期変化を分子レベルで解析する解析基盤を開発した。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な技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。

老化細胞の細胞死耐性機構の解析から、間質の老化細胞と膵がん細胞に共通して鉄依存性細胞死である Ferroptosis に耐性であることを見出したので、これらの細胞に Ferroptosis を誘導する方法を開発し特許を出願した。

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し、発現陽性細胞についての解析を進め、ERKの活性化との強い相関関係が示された。実際、MEK阻害剤をKCマウスに投与すると、ADM病変の生成が強く抑制された。MAPK経路の活性化が新たに同定したマーカー分子の上流で働いていることになる。

（3）プロジェクトマネジメントの実施状況

昨年度に再構築した PM 支援体制により円滑なプロジェクト運営を進めた。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、執行部の月例会議で「重要事項の調整」及び「進捗状況の把握」を行った。項目 1 への二名の課題推進者の追加により、臨床オルガノイドリソース整備など大きく拡充された。患者オルガノイド技術に関わる国際連携を目的として国際会議を開催した。月例で課題推進者の発表会を開催し、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することにより、事業化戦略及びグローバル展開、技術移転先、将来的な顧客開拓などに関して、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の拡充と利用を推進した。

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、髄液などの体液、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拡充と利用を推進した。

膵正常、前がん病変に焦点をあてた生体試料収集を加速した。各ステージに適した培養方法を確立し、オルガノイドの樹立を継続的に行った。超早期膵がんオルガノイドの樹立法を確立し安定的に樹立することに成功した。

膵上皮細胞の単一細胞由来オルガノイドを様々な年齢の患者から樹立して解析する事により、膵上皮細胞における遺伝子変異の蓄積速度を決定することで変異数を分子時計として用いるための解析を実施した。

また、難治性がんの発症から進行に至る患者生体データの統合解析のために、同一患者からの複数クローンの樹立を推進した。

これらの患者組織の解析に加え、患者由来オルガノイド用いたゼノグラフトモデルなどを用いて、各病態ステージに特徴的なオルガノイドの性状解析を進めた。また、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。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。また、並行してマウス早期病変オルガノイド、ヒトオルガノイドを充実させ、遺伝子改変を追加して、早期がん成立過程への理解を深めた。

膵癌組織を用いたオミックス解析や空間トランスクリプトーム解析、あるいは髄液中のタンパク質やエクソソームを用いた多層的なオミックス解析を進めた。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に努め、とくに超早期～早期膵がんを抽出する miRNA の検討が進んだ。

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: オルガノイドの生物学的解析基盤を確立する一環として、患者由来オルガノイドのうち、膵正常組織由来オルガノイドの樹立プロトコルを改良し、同一患者・

同一組織内で由来細胞ごとにオルガノイドを樹立することが可能になった。患者由来オルガノイドを用いた Genotype-phenotype association の同定の一環として、由来細胞ごとに樹立したオルガノイドのゲノム解析により、膵癌と共通する変異シグネチャーにおける差異を見出した。がんの進行に応じた多細胞間相互作用ネットワークの理解に向けて、少量オルガノイド検体からのゲノム解析技術をチーム内で共有し、膵臓がん発症メカニズム解明の基盤となる正常組織における細胞種類ごとの全ゲノム配列データを取得した。

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の構築を進めると同時に、その運用を推進した。

全ゲノム解析データ共有体制の構築を継続すると同時に、前年度までに整備した基盤に基づいて、正常・超早期・早期症例由来の臨床検体・オルガノイドの RNA シーケンスを実施した。また、RNA シーケンスデータ共有体制の構築を継続した。オルガノイド由来および公共データベースの統合オミックス解析データを用いて、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。具体的には、RNA シーケンスデータから疑似時系列解析を行い、各検体における正常-超早期-早期-がん病変への進展の程度を推定した。また、エピゲノム変化を解析するために ATAC シーケンスなどのエピゲノム解析データの解析アルゴリズム・パイプラインの開発・実装を実施した。さらに、このようなプラットフォームを利用して、C-CAT データを用いて日本人のがんドライバー異常の全体像を解明し、GENIE・TCGA データと組み合わせることでドライバー変異の共存・排他関係を網羅的に解明した (Horie, Saito Y, Cancer Discov, 2024)。

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、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。また、がん細胞から放出される膜小胞エクソソームの市販の絶対定量システムを応用して、難治性癌の血液検体に含まれる癌由来エクソソームを検出するための疾患特異的なマーカー分子の選定を行い、膵癌患者の血液検体で特異的に上昇する糖鎖抗原候補を得ている (Cancers 2020)。さらにこのような膵癌特異的な糖鎖抗原を選別するためにレクチンを用いた網羅的に解析し、膵癌エクソソーム特異的に認識するいくつかのレクチンの同定に成功しており、AI を用いた機械学習による診断システムの構築を進めた。また、いくつかの抗腫瘍効果を有す

る薬剤に対する標的受容体たんぱく質の同定に成功しており、抗がん機能の新たな制御の解明を行っている (Cancers 2021)。これら受容体情報を基盤とした様々な疾患への検証も進めると同時に (Cell Stem Cell, 2023, Cell Rep., 2023)、知財化を進めた。

膵がんの臨床にて使用されている DNA 傷害抗がん剤ゲムシタビン (GEM) を用いて樹立した (50nM_GEM に対する耐性株) GEM 耐性獲得膵がんオルガノイドを 6 種類とそれぞれの親株のバルク RNAseq 解析、および顕著な耐性が確認された 2 種類のオルガノイドの耐性株と親株について 1 細胞 RNA シーケンス解析を完了し、数理解析チームとの連携を開始した。

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 (医薬基盤・健康・栄養研究所)

(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。

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； 5~20 週齢の 10 時点) を用いて、数理的・統計的・バイオインフォマティクス的手法を用いて多階層の制御ネットワークを推定した。また、統計的手法により発現プロテオームとリン酸化プロテオームの階層を繋げる手法も開発した。さらに、転写因子・miRNA・リン酸化酵素といった上流制御因子を既存のデータベースと時系列データから推定する手法を開発した。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、今後得られる患者膵がん由来オルガノイドの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、治療のターゲットとなる分子や時期の推定に貢献できる。また、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を行った。400 サンプルの肝臓の個体データ (100 サンプル×4 条件) 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。このネットワークを基に、特徴的なネットワーク構造 (中心性やノード次数) の検討、時計関連転写因子と脂質代謝関連分子の関係性の推定などを行った。今後がんと微小環境の細胞の関係性の推定に利用できると期待される。他チームと協働した数理モデル作成を開始している。例えば、山下研との共同で、がん抗原提示に関与する SMG1 阻害による RNA 分解の数理モデルの作成を行っている。

マルチモーダル型のデータ解析を行った。特に、膵がんについては、これまでの病理 AI システムを発展させ、抗がん剤における治療効果予測を可能とする探索的な機械学習手法を構築・発表した (Yamaguchi et al. Pancreas 2024)。各データに対しては、過学習を

避けるために次元圧縮技術を適宜使用することで、将来的に複数施設のデータに対応可能な技術開発を行うことができた。また、他課題推進者との共同研究を通してイメージデータを用いた技術開発を引き続き実施した。特許申請中(特願 2022-192062)の電子顕微鏡画像に対する生成 AI 技術については、実証試験のための症例を収集中である。引き続き、米村ら(徳島大学)と共に精度の高い技術へと改良を進める。また、黒田ら(東京大学)とヒトサンプル症例について組織透明化画像解析を行った。2022 年度に開発し特許申請中(特願 2022-155487)の統合データ解析技術の改良と、その実証のための前立腺癌症例を複数の大学病院より収集した。本手法は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である。これらの技術を膵癌時系列データへの拡張を目指すプロジェクトとして、妹尾ら(京都大学)と共同研究を開始した。本手法は技術的には個別臓器に限定されない「各種がん疾患」に適用可能な応用範囲の広い手法であり、幅広くプロジェクトに貢献できることが期待される。

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：がん研究に最適化したオルガノイド培養法、がん細胞と微小環境ネットワークの相互作用、患者オルガノイドを用いた薬剤感受性などの生物学的解析基盤の確立などを進めた。

難治性がんの未病状態および発がん患者より細胞・組織より iPS 細胞を 10 件樹立し、浸潤・転移のネットワークを擬似化するために必要なオルガノイドモデルの誘導法を構築した。すなわち、膵癌の転移先となる肝臓を対象として、間質系・免疫系細胞が肝細胞と同時に発生するオルガノイドや、動脈系血管内皮細胞や肝類洞内皮細胞を含む多層血管構造を有したオルガノイドを構築した。また、これらのオルガノイドに対して、マイクロマニピュレーション技術を組み合わせることで、原発巣組織からがん細胞が浸潤・転移する挙動を *in vitro* で追跡可能なシステムを検討し、臨床がんを疑似化するモデルに与するための基盤的細胞操作技術を開発した。

iPS 細胞から臓器特異的な微小環境構成細胞を分化誘導し、オルガノイドの共培養統合化技術を構築した。具体的には、iPS 細胞から卵黄静脈様造血性血管内皮細胞を経て、肝類洞内皮細胞を創出する独自の分化誘導プロトコルを基盤として、多層化ゲルと気液界面培養を組み合わせた手法によって、複数の血管内皮細胞と肝細胞・間葉系細胞を統合する培養手法を確立した。また、得られたオルガノイドに対して、シングルセルトランスクリプトーム解析を適応することで、ストロマ構成細胞において生じる多細胞間相互作用を担う分子経路を明らかにし、正常から発がん過程にいたる早期変化を分子レベルで解析する解析基盤を開発した。

これまで手動で作成してきた微小環境ネットワークを有したオルガノイドモデルについて、96 ウェルプレートを用いた自動培養システムへと発展させることに成功した。これにより、さまざまな化合物や核酸医薬を評価するアッセイ系を構築し、候補物質ごとに薬剤有効性・安全性を最適化するための評価系を構築した。

課題推進者：武部 貴則(大阪大学)

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を構築した。

腫瘍組織のライブイメージングに関しては、3Dプリンターを用いたイメージングウィンドウの作成および最適化を行い、免疫不全マウスの膵臓にてヒト膵がん細胞を安定的に観察する実験系を確立した。さらに、ムーンショット内の共同研究により、腫瘍組織内の部位ごとの細胞増殖の違いを定量化することを可能とし、組織内の細胞外微小環境とがん遺伝子情報伝達系との関連を明らかにした。また、ERK バイオセンサーを発現する免疫不全マウスの作成が完了し、ヒト腫瘍細胞の移植および宿主細胞の観察を可能にした。個々の膵がん患者細胞の ERK 活性および AMPK 活性への依存性を検討し、それぞれの阻害剤が有効な細胞群と耐性を持つ細胞群の存在を明らかにした。

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に関しては、各種がん臨床検体やオルガノイド由来サンプルを用いたバイオマーカー酵素活性の網羅的スクリーニングを進め、卵巣がん、大腸がんに関してプローブが複数絞り込まれ、新鮮臨床検体でもその機能が十分に確認された。膵癌に関しては、血液検査によって早期がんの発見を目指す新たなアプローチとして、細胞外小胞 (extracellular vesicles, EVs) が持つ酵素活性のスクリーニングを本年度から開始し、血漿と EVs では大きく異なる酵素活性パターンが見られること、EVs に濃縮された特定の酵素活性によって、糖尿病患者と膵癌患者を初めて見分けることが可能となることなどが明らかとなった。さらに膵癌オルガノイド培養時に細胞外に放出される EVs の酵素活性パターンを明らかにする研究も開始した。

前年度までに光学顕微鏡像から電子顕微鏡像を予測できる可能性が浮上した。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を進め、9例のデータを取得し AI 解析チームに送る段階まで進んでいる。細胞間接着とがん微小環境のシグナル相互作用の解析を進めた。

がん組織の透明化・三次元イメージング技術に関して、膵臓や腎臓などより透明化の難易度が高い試料に対応するため、ライトシート顕微鏡を有機溶媒系の透明化手法に対応させるとともに、高解像を得るため高開口対物レンズの実装を行った。また、Cell Face ID を用いた回転不変な追跡方法を 2次元系で実装し、3次元化を模索するとともに、空間 3次元+時間データの画像解析に取り組んだ。

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：膵がん組織への腸内細菌のコンタミを極力防ぐプロトコールと倫理申請、発がん過程における細胞老化誘導遺伝子 p16^{INK4a} 遺伝子の発現ダイナミクスの解析、患者試料とモデルマウスを用いた解析システムの構築と代謝変動の解析、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。

昨年度までに作出した細胞老化誘導遺伝子 p16^{INK4a} 遺伝子の機能を保持したまま発現を可視化し、更に発現細胞を死滅させることが出来るマウスなどを用いた解析を複相的に進め、マウスの発がん過程における p16^{INK4a} の発現ダイナミクスの詳細な解析を開始した。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進めた。また、膵がん組織への腸内細菌の浸潤を解析するためにはサンプル調製過程でのコンタミを極力防ぐ必要がある。そのために手術室より病理部を経ずに直接検体を入手できるように倫理審査の承認を得、現在までに 3 症例を解析した。

がん幹細胞の制御因子であるアミノ酸代謝制御因子 CAT1 の局在制御機構に着目した解析から、分裂面に微小管と共局在すること、エピゲノム制御と細胞分裂制御を介して腫瘍細胞の分化阻害を引き起こすことを見出した。分岐鎖アミノ酸(BCAA) 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と、BCAT1 また 2 のノックアウトマウスを用いた解析を進めた。

がん微小環境におけるストレスと NMD 阻害に注目したがん治療コンセプトの創出に向けて、マウス生体における簡便な NMD 阻害法を複数確立することに成功した。これらの方法を用いて、マウス生体モデルにおける、がん免疫療法の促進の解析を進める。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向けて新たに Panc-02 膵がん細胞において ovalbumin モデル抗原を恒常発現する細胞株を樹立し、活性化すると LacZ を発現する OVA 認識 T 細胞ハイブリドーマの活性化の評価に成功した。

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。

老化細胞特異的な生存維持因子を網羅的に探索・同定し、分子 X が RNA と結合する機能を有することを見出した。また、がん抑制遺伝子 Scrib 欠損により、前がん病変マーカー FGF21

の発現誘導及び細胞競合が誘導する時に ASK1 の S-ニトロシル化が亢進する機構を探索し、一酸化窒素産生酵素 NOS3 が Scrib 欠損により発現上昇することを見出した。さらに、正常マウスの肝臓に細胞競合を誘導可能な新たなモデル系を構築し、このモデルを用いて、生体内においても正常細胞に囲まれた Scrib 欠損細胞が FGF21 依存的に排除されることを見出した。

がん幹細胞の維持とフェロトーシス抵抗性ニッチの理解に向けて、マクロファージチェックポイント分子である CD47 に着目して研究を進めた。公共データベースの解析から同定したフェロトーシス抵抗性に関わる遺伝子変異に着目した解析を進め、慢性膵炎から膵がんが発生する際にオートファジー不全状態が誘導される可能性があることを示唆する結果を得た。また、すい臓の早期がんマーカーとしての可溶性 CD44v の発現意義を明らかにするために、慢性膵炎の患者における患者検体（膵液、十二指腸液などの体液）を用いて、早期がんマーカー候補分子であるがん幹細胞マーカー CD44v9 について Western blot 法による発現解析を実施した。

がん微小環境の理解に向けて、ペリセントロメア領域のエピゲノム解析（4C 解析と ATAC シークエンス解析）の結果、間質の老化細胞と多くのがん細胞においてはゲノムのペリセントロメア領域がオープンになり活性化しており、NFκB や STAT 結合領域との相互作用が増加していることが明らかとなった。乳がん患者検体を用いた DNA-FISH 解析と single cell ATAC シークエンス解析の結果から、がん細胞や間質の CAF では老化細胞と同様のエピゲノム異常が炎症性遺伝子の発現誘導に関わることを明らかにした (Miyata *et al.*, PNAS, 2023)。さらに、ペリセントロメア領域から転写されるサテライト II RNA が細胞外小胞に取り込まれて周囲の細胞に炎症形質を伝搬する責任因子として、YBX1 (Y-box binding protein 1) を同定した (Chiba *et al.*, IJMS, 2023)。そこで、膵がん患者由来組織検体を用いて、サテライト II RNA の発現を指標に膵がんの超早期病変を検出することを目的として RNA-ISH 解析を開始した。また、膵がんモデルの KPC マウスと KC マウスを導入し single cell RNA シークエンス解析などを行った。また、老化細胞の細胞死耐性機構の解析から、間質の老化細胞と膵がん細胞に共通して鉄依存性細胞死である Ferroptosis に耐性であることを見出したので、これらの細胞に Ferroptosis を誘導する方法を開発し特許を出願した。

課題推進者：一條 秀憲（東京大学）、永野 修（藤田医科大学）、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。

上皮細胞の極性制御ネットワークのがんの発症プロセスにおける役割の理解が必要であ

る。昨年までに難治性乳がんの幹細胞において、極性制御因子 PKC λ シグナリングが非対称分裂を制御していることを見出してきたが、今年には公共 DB 及び膵がん Panc-1 細胞を用いた解析から、PKC λ が幹細胞の非対称分裂を制御すると同時に、膵がんの予後を不良にすることを見出した (Kasai et al., 2023)。膵がんでも極性制御因子 PKC λ が、非対称分裂の制御を通じて、がん組織の不均一性を増加させていることが強く示唆された。PKC λ の発現量の調節機構、非対称分裂に加えて下流で起きる代謝シフトの機構に関する解析も進めた。加えて、公共 DB のゲノム及び RNA 発現データから、先入観なしにがんとの関わりを探索する方法論として、「相互情報量」を用いた新たな情報科学的な手法を用いることにより、診断時に 10～15 年後の晩期再発を予測する遺伝子群を同定した。同定した遺伝子群が確かに晩期再発の予測因子となることを、異なる 2 つのコホートで検証した。さらに、がん幹細胞の休眠後の晩期再発を想定し、がん休眠モデルのシングルセル RNA 配列データとノックダウンから、晩期再発遺伝子の一つが、がんの休眠状態に関与することを見出した (原著論文の準備中)。

膵がん、肺腺がんにおいて高発現している極性制御分子 Ror1 とそれと共役する低分子量 G タンパク質 Rif について、Wnt5a-Ror1-Dvl2 シグナルを制御することにより、細胞増殖に加え、極性を持った糸状突起形成を介して細胞外基質 (ECM) 分解や浸潤を促進することを明らかにした (J. Biol. Chem., 2023)。マトリゲル中で血管擬態形成が見られない膵がん細胞 Panc1 では、Ror1 と Wnt5b の恒常的な発現が見られ、Wnt5b-Ror1 シグナルにより増殖が誘導されること、また膵がん臨床検体において Ror1 の高発現が検出されることが示された (Genes Cells, 2024)。Ror1 の高発現は膵がん患者や肺腺がん患者の予後不良と相関するが、膵がん細胞 (Panc1) では Ror1 が Wnt5a 依存的にミトコンドリア膜電位を減少させ、ROS 産生を抑制することにより細胞増殖を促進することや卵巣がん細胞のフェロトーシス耐性に関与する鉄硫黄クラスタータンパク質 Ferredoxin1 (FDX1、後述) が膵がん細胞においても高発現すること、等を明らかとした。また、諸種のがん細胞における浸潤突起形成や浸潤突起への物質輸送にモータータンパク質 KIF1C が重要な役割を担うことを明らかにした。新たに同定した ADM マーカー分子陽性細胞の周辺にはマクロファージが高頻度に集積していた。さらに、マクロファージを除去した際に、ADM の発生・進展が抑制される。これらのデータは、マクロファージが ADM の進展を促進するファクター X (の一つ) であることを示している。ADM 病変に集積するマクロファージにおいて発現が亢進する分子群を同定するために single-cell RNAseq 解析を行った。その結果、ADM/PanIN 病変に集積するマクロファージには 10 を超える異なった発現プロファイルを有するサブタイプが存在し、早期 ADM の周囲に集積するマクロファージは、IL-6、fibronectin、THBS1 を高発現することが分かった。加えて、ADM 病変では、ERK の活性化と ADM マーカー分子陽性の強い相関関係が示された。実際に、MEK 阻害剤を KC マウスに投与すると、ADM 病変の生成が強く抑制された。このことから、MAPK 経路の活性化が上流で働いていることが分かった。次に、ADM マーカー分子ノックアウトマウスと KC マウスを掛け合わせることによって、ADM マーカー分子の前がん病変における機能を調べた。すると、ノックアウト KC マウスでは、ADM の発生・進展が部分的に抑制されていた。このデータは、ADM マーカー分子が前がん病変の進展に重要な役割を果たしていることを示すとともに、MAPK 経路の下流で、他の何らかの分子が

機能していることを示唆している。さらに、KC マウス由来のオルガノイドに同定した化合物を投与し、ADM 様の構造の出現にどのように影響を与えるかについて調べた。その結果、MEK 阻害剤と抗下痢剤として臨床的に使用されている loperamide が ADM 様病変の生成を阻害することが明らかになった。さらに、MEK 阻害剤については、KC マウスへの腹腔内投与によって、ADM の生成・進展を強く阻害することが示された。これらのデータは、膵臓前がん病変に対する、予防的治療薬の開発に道を拓くものと評価できる。

タンパク質合成能が低下した *Minute* 変異細胞が細胞競合の敗者となってショウジョウバエ組織から排除される細胞競合モデルを用いて、細胞競合制御因子の候補を網羅的に同定する RNA-seq 解析とそれに続く *in vivo* RNAi スクリーニングを実施してきた。*Minute/+* 翅原基を用いてエキソサイトーシスの役割を遺伝学的に解析した。その過程で、①JNK シグナル依存的にエキソサイトーシスが亢進し、細胞死が誘導されること、および、②JNK シグナルにより誘導されるモルフォゲン Wingless (Wnt ホモログ) がエキソサイトーシスにより分泌されることを見いだした。一方、突然変異を獲得した前がん細胞が細胞競合の“勝者”として周囲の細胞を駆逐しながらその領地を拡大するスーパーコンペティション機構を明らかにする目的で、前年度までに大規模遺伝学的スクリーニングを実施し、進化的に保存されたがん抑制性 Hippo 経路を不活化した細胞群によるスーパーコンペティションを細胞非自律的に促進する突然変異体の責任遺伝子として、*echinoid* を同定することに成功した。さらに、がん遺伝子 Ras 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 (*Ras^{V12}/scrib^{-/-}* 腫瘍) をモデルとし、前年度までに、「がん組織に浸潤したマクロファージが、死にゆくがん細胞の貪食を介して非自律的な細胞増殖を誘導する」という全く予期しなかった現象を見いだしたが、本年度はその機構の解析を進め、その分子機構の一端を明らかにした。

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)

昨年度に整備した新執行部体制を通じて、「重要事項の調整」及び「進捗状況の把握」に関わるPMの業務を強力に支援する体制を整え、順調に運用した。

○ 進捗状況の把握とプロジェクト運営の迅速化

昨年度に再編成した研究グループを通じて、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。

○膵がんに関心した「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強化した研究開発項目1における研究を推進した。特に早期、超早期で起きている事象の解明に向けた取り組みを推進した。

○「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

慶應大学、京都大学、神戸大学の3機関に分散して行われている取組の加速化には、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。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。特に、オルガノイドなどの試料及びデータの共有化（まずはプロジェクト内での利用）に向けたマニュアルの作成、リストの作成を進めた。

○オルガノイド技術に関わる国際会議の開催

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会議を開催した。

○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運営した。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。これに加えて、月例で2名ずつの課題推進者が自身の進捗状況を報告する「課題推進者など発表会」を開催した。

(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、上述の月例の課題推進者など発表会において、様々な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。例えば「サイエンスアゴラ2023」に若手研究者として垣内が参加し、目標2が目指す2050について議論した。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。従来の市民向けの講座、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。

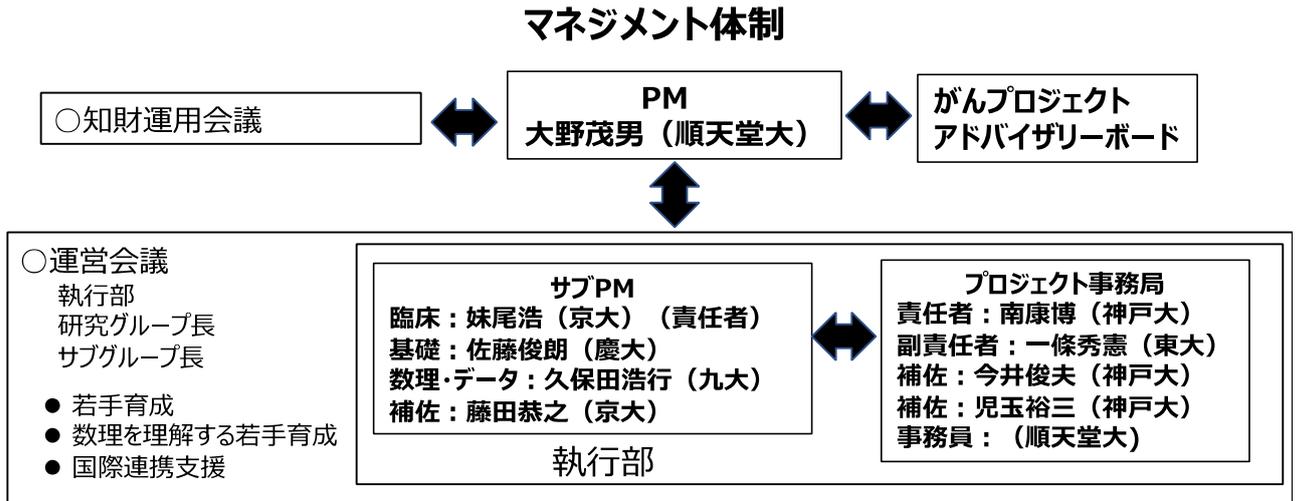
（４） データマネジメントに関する取り組み

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進めた。

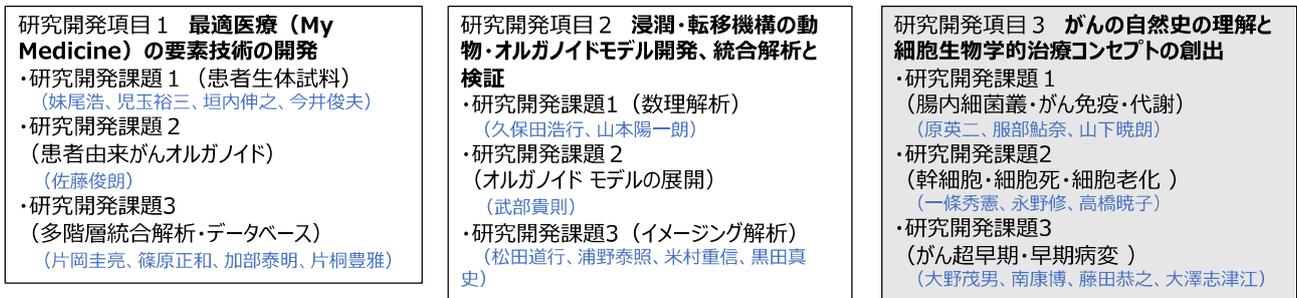
本プロジェクトでは、臨床検体を利用する。三機関の倫理委員会の承認を得ている。このような試みには、患者の理解と同意が必要であり、倫理面に加えて、ELSI面での幅広い見地からのアドバイスを受けて行う必要がある。その為の取り組みを進めた。

収集したデータは、ま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	7	6	0	0
登録件数	0	0	0	0
合計 (出願件数)	7	6	0	0

会議発表数			
	国内	国際	総数
招待講演	78	29	107
口頭発表	34	2	36
ポスター発表	33	12	45
合計	145	43	188

原著論文数 (※proceedings を含む)			
	国内	国際	総数
件数	5	32	37
(うち、査読有)	5	32	37

その他著作物数 (総説、書籍など)			
	国内	国際	総数
総説	5	6	11
書籍	0	1	1
その他	0	0	0
合計	5	7	12

受賞件数		
国内	国際	総数
7	0	7

プレスリリース件数
7

報道件数
46

ワークショップ等、アウトリーチ件数
8