



## 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

## 2021 年度版

2021年4月～2022年3月

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

 **MOONSHOT**  
RESEARCH & DEVELOPMENT PROGRAM



## 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
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
山本陽一郎	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部	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 ウイルス・再生医科学研究所	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	プロジェクトリーダー
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

### 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

#### 実施内容:

前年度の準備作業を踏まえ、本研究開発の患者生体試料リソースプラットフォームの構築において中心的な役割を果たす患者生体試料リソースプラットフォームを構築した。慶應大学、京都大学、および神戸大学の倫理申請書の情報を共有し、これらの情報を基に慶應大学を代表施設とした三施設共同の倫理申請を慶應大学において行い承認を得た。さらに、同倫理申請を基に各大学においても倫理申請を行い承認を得た。

平行して、研究開発プロジェクトでサンプル、データ等の共有を可能にするハード、ソフト、スタッフ等の整備を進めた。更にプロジェクト内の技術共有とデータ標準化のためのミーティングと情報交換を重ねた。これらを踏まえて、難治性がん患者から、正常組織、前がん病変、超早期がん、浸潤や転移を伴う進行がんの臨床検体(血液、がん組織、近傍の正常組織、およびそれら由来のオルガノイドなど)、臨床データ(血液生化学データ、画像など)、血液、体液、糞便などの多彩な生体試料リソースを取得する作業を開始した。

更に、一部検体を用い、独自にRNA-seq解析などのオミックス解析に着手した。また、膵がん患者を対象に、超早期から転移性に至る膵がんの自然史に沿った各段階の患者血液サンプルを採取し、miRNAなど侵襲の少ないバイオマーカー候補を探る作業を開始した。

膵がん、胆道がん、大腸がんなど、多彩な難治性がん患者由来のオルガノイドモデルの作製と保存に加え、既存の膵がん発症マウスモデルに加えて、膵前がん病変のモデル、胆道がんの前がん病変のモデルマウスの樹立に成功し、オルガノイドを用いた系の立ち上げ、薬剤の効果判定などを進めた。

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を進め、最適化したプラットフォームをチーム内で共有し、手法の標準化を行った。標準化した手法を用いて、チーム内で再現性高く患者由来オルガノイドが樹立可能であることを確認し、検体数を蓄積した。そして、網羅的な解析データを取得し、膵がんの進行に伴い起きる新たな現象と分子機構を見いだした。さらに、新しいオルガノイド樹立手法の開発、がん細胞と線維芽細胞との相互作用を解析に組み込むための共培養法の確立、患者由来がん関連線維芽細胞の樹立などを進めた。

多階層統合解析共有プラットフォーム構築の一環として、難治性がん由来の臨床検体・オルガノイドの全ゲノム解析を行うと共に、遺伝子異常の同定に向けた全ゲノム解析データ解析基盤の整備を進めた。さらに、その基盤に基づいて、臨床検体・オルガノイドのRNAシーケンスを実施した。また、包括的な脂質代謝物プロファイル・脂質メディエータープロファイルの取得、代謝解析のためのプロトコルの標準化などを進めた。オルガノイド樹立の栄養状態の制御など培養条件の代謝的な検証も進めた。

## 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

### 実施内容:

オミックスデータを用いた統計解析のための予備解析として、様々なステージの患者から得られるオルガノイドについて健常から超早期～末期にならべる疑似時系列解析のための手法の検討を行った。平行して、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を進めた。

機械学習を用いた探索的イメージ解析技術の開発、機械学習を用いた多階層データの統合解析を行う技術開発と、同手法による解析を進めた。

膵がん、胆道がん、大腸がんなど、多彩な難治性がん患者由来のオルガノイドモデルの作製と保存に加え、既存の膵がん発症マウスモデルに加えて、膵前がん病変のモデル、胆道がんの前がん病変のモデルマウスの樹立に成功し、オルガノイドを用いた系の立ち上げ、薬剤の効果判定などを進めた。(前項の一部を再掲)

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。また、がん細胞と微小環境ネットワークの相互作用の解析にむけて、微小環境構成細胞の分化誘導法の研究を開始するとともに、微小環境ネットワークを有したオルガノイドの化合物アッセイ系の構築を開始した。

イメージング解析プラットフォームを構築し、バイオセンサー発現患者由来膵がんオルガノイドを用いた薬剤効果検出系の確立を行った。

イメージングプローブ開発に向けた研究を推進した。蛍光プローブ群の開発と臨床検体スクリーニングに向けて、本プロジェクトで使用する各種加水分解・酸化還元酵素蛍光プローブ群の合成・拡充を目指し、本年度は主に各種タンパク質分解酵素プローブの多色化を行い、400種類からなる赤色プローブライブラリーの合成を完了した。

超早期がんと周囲環境との相互作用理解の基盤を作るために、電子顕微鏡レベルの超微細形態解析が可能なイメージングプラットフォーム構築を進めた。更に、がん細胞と周囲環境の微細形態イメージングに関する技術改良を進めた。また、がん組織の透明化・三次元イメージング技術の開発を進めた。

## 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

### 実施内容:

患者生体試料、マウスの膵がん発症モデル、細胞株などを用いて、様々な視点から、生体内ネットワーク解析と創薬開発に向けた研究開発を進めた。

生体内で腸内細菌と細胞老化反応の解析を可能にする遺伝子改変マウスを作製して膵がんを中心とした難治がんの発症モデルシステムの構築を行った。更に、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、様々なヒトの生体試料を用いて検証するための解析システムの確立を行った。

in vivoにおけるアミノ酸代謝解析を可能とするアミノ酸代謝およびケト酸代謝変化を検出する二つの系(リアルタイムを含む)を確立し、正常細胞では異化代謝されていると考えられ

ている分岐鎖アミノ酸(BCAA)のがん細胞での代謝経路を同定した。

がん微小環境における様々な細胞ストレス(①断食、②アミノアシル tRNA 合成酵素阻害剤、③プロテアソーム阻害剤)が RNA 代謝(NMD)に与える機構の解析を進めた。

網羅的ゲノムワイド siRNA スクリーニングを実行し、老化細胞特異的な生存維持因子の複数の候補遺伝子を得た。強い酸化ストレスにより誘導されるパータナトスの分子メカニズムならびに酸化ストレス強度依存的な細胞死形態変化の分子メカニズムの解明を進めた。

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に向けて、フェロトーシス抵抗性を促進する微小環境について、これまでに作成した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シングルセル解析を実施し、フェロトーシス抵抗性への関与が疑われる候補遺伝子を絞り込んだ。

臨床検体を用いたがん幹細胞マーカーCD44v9 の検出と早期がんマーカー有用性検討に向けて、ELISA 法による発現検討を開始するために必要な倫理申請を、サンプルの採取を担当する神戸大学の児玉が進めた。

細胞極性に着目したがん治療コンセプトの創出に向けた研究の過程で、オートファジーとがん幹細胞の非対称分裂、細胞極性制御ネットワークとの関わりを見いだした。がん細胞の不均一性が生じる機構と考えられ、その機構の解析を進めた。公共データベース(TCGA など各種)から数理科学的な手法で抽出した分子群を含め、代謝シフト、細胞接着制御、との関わりを解析を進め、複数の候補遺伝子の同定に成功し、更なる解析を進めた。

EMT・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向け、糸状突起形成及び血管擬態形成の機構の一端、膵がん患者や肺線がん患者の予後不良との相関等を見いだした。また、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の機構の一端を見いだすなど、重要分子の抽出に成功した。

昨年度確立したファージ抗体ディスプレイスクリーニング系とマウスモデルを用いて、前がん病変のマーカー分子の探索を行い、膵臓前がん病変のマーカー分子を同定することに成功した。さらに、前がん病変の制御に関わる正常細胞と変異細胞間に生じる細胞競合の制御因子を同定するためのスクリーニング系を構築した。マウスの様々な上皮組織に RasV12 変異や ErbB2 変異を誘導することのできるモデルシステムを構築することに成功した。ショウジョウバエ上皮をモデルとして導入し、細胞競合を介したがん原性細胞の排除の分子機構を明らかにする RNAsequence を行い、がん原性細胞で発現が変動する遺伝子群などの抽出を行った。

細胞競合を介したスーパーコンペティション機構を明らかにする2種類の大規模遺伝学的スクリーニングを開始し、候補遺伝子群の抽出を行った。

## 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構築した。

患者より画像を含む臨床データ、血液、その他の体液(がん種により、膵液または胆汁、

腹水、尿、唾液、痰など)、糞便、がん組織、近傍の正常組織を採取・集積しバンク化することを旨し、倫理的基盤の構築を行った。本研究開発の患者生体試料リソースプラットフォームの構築において中心的な役割を果たす慶應大学、京都大学、および神戸大学の倫理申請書の情報を共有し、これらの情報を基に慶應大学を代表施設とした三施設共同の倫理申請を慶應大学において行い承認を得た。さらに、同倫理申請を基に各大学においても倫理申請を行い承認を得た。これにより、患者生体データの統合解析を可能とする解析プラットフォームの倫理基盤が構築・共有された。

研究倫理基盤の整備をうけ、研究開発プロジェクトでサンプル、データ等の共有を可能にするハード、ソフト、スタッフ等の整備を進めた。プロジェクト内の技術共有とデータ標準化のためのミーティングと情報交換を重ね、難治性がん患者から、正常組織、前がん病変、超早期がん、浸潤や転移を伴う進行がんの臨床検体(血液、がん組織、近傍の正常組織、およびそれら由来のオルガノイドなど)、臨床データ(血液生化学データ、画像など)、血液、体液、糞便などの多彩な生体試料リソースを取得する作業を開始した。まず進行した状態の膵がん、胆道がん、大腸がんを中心とするリソースを収集し、臨床データそれらの一部を研究開発プロジェクト内で共有した。今後、中長期的に前がん病変に関する作業を展開するための基盤を整備することが出来た。

更に、一部検体を用い、独自に RNA-seq 解析などのオミックス解析に着手した。また、膵がん患者を対象に、超早期から転移性に至る膵がんの自然史に沿った各段階の患者血液サンプルを採取し、miRNA など侵襲の少ないバイオマーカー候補を探る作業を開始した。

膵がん、胆道がん、大腸がんなど、多彩な難治性がん患者由来のオルガノイドモデルの作製と保存に加え、既存の膵がん発症マウスモデルに加えて、膵前がん病変のモデル、胆道がんの前がん病変のモデルマウスの樹立に成功し、オルガノイドを用いた系の立ち上げ、薬剤の効果判定などを進めた。

**課題推進者:** 妹尾 浩(京都大学)、児玉 裕三(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:

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の準備を行った。これまでの技術開発の経験を活かし、最適化したプラットフォームをチーム内で共有し、手法の標準化を行った。標準化した手法を用いて、チーム内で再現性高く患者由来オルガノイドが樹立可能であることを確認し、検体数を蓄積した。

正常組織からがんの進行に伴う変化について、多数の検体を用いた網羅的な解析データを取得した。特に、膵がんが進行とともに、Wnt/Rspondin の増殖因子非依存性を獲得し、その形質変化は低酸素及びニッチにおける Wnt の枯渇によって促進されることを見出した。さらにエピゲノム解析や代謝解析によって分子生物学的メカニズムを追求した。

従来のオルガノイド技術とは異なる新しい手法の開発を行った。細胞外基質の内容を調整し、培養皿を振盪することによって生体内に近い構造へとオルガノイドが形態変化することを見出した。さらに薬剤添加で YAP シグナルを活性化することにより、従来培養に必須であったマトリゲルフリーでの培養法を新たに開発した。また膵がんにおけるがん細

胞と線維芽細胞との相互作用を解析に組み込むため、共培養法の確立を行い、患者由来がん関連線維芽細胞の樹立も行った。

**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し、その運用を開始した。

難治性がん由来の臨床検体・オルガノイドの全ゲノム解析(20例)を行うと共に、遺伝子異常の同定に向けた全ゲノム解析データ解析基盤の整備を進めた。さらに、その基盤に基づいて、臨床検体・オルガノイドのRNAシーケンス(20例)を実施した。

超早期病変から進行がんに至る様々な段階の難治性がん患者の血液、体液、がん組織、近傍の正常組織、ならびそれら由来のオルガノイドを取得し、昨年度の研究開発で確立した手法にて、包括的な脂質代謝物プロファイル・脂質メディエータープロファイルの取得を開始した。

これまでに構築した、糖代謝やアミノ酸代謝、核酸代謝などの中心代謝経路の水溶性代謝物の解析システムおよび、LC-MSを用いた脂質メディエーターなどの脂溶性代謝物の解析システムなど網羅的な代謝物の解析が可能なメタボロームシステムを用いて、今年度は、本プロジェクトで収集を予定している膵癌などの難治性癌の腫瘍部位および周辺病変、正常部における代謝解析のためのプロトコルの標準化を図り、次年度以降の解析の基盤とした。

がん組織などからのオルガノイド樹立の栄養状態の制御など培養条件の代謝的な検証を進め、次年度以降に予定している臨床検体由来のオルガノイド樹立および解析のための基盤とした。

ATCC から購入した膵がんオルガノイド5種類および膵臓がん細胞株10種類を用いて、DNA 傷害抗がん剤ゲムスタビンの処理条件(処理時間、濃度、培養条件)における耐性オルガノイド、細胞株の樹立を進めた。また、5種の膵がんオルガノイド株のRNAseq解析を終了した。

**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(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準備作業を行った。

オミックスデータを用いた統計解析のための予備解析として、様々なステージの患者から得られるオルガノイドについて健常から超早期～末期にならべる疑似時系列解析のための手法の検討を行った。本研究における疑似時系列解析においては n 数が少ないと

考えられ、この問題に対処する必要がある。そこで、単なるトランスクリプトームデータを用いた疑似時系列解析ではなく、変異遺伝子の数や画像データから得られると考えるオルガノイドのがん進行度を考慮して解析するが、まず始めに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の検討などを行っている。また、データの平均値だけでなく、分散に注目した解析も行い、ある分子群は、平均値は同じにも関わらず分散だけ有意に変動しているなど、これまでとは異なる生物学的視点からの知見も得られつつある。

平行して、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を進めた。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。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った。

機械学習を用いた探索的イメージ解析技術の開発を進めた。当該年度は、膵癌組織データの蓄積前であったため、収集済みの他臓器がんのイメージデータを用いた技術開発を行った。特に、画像から生物学的な新規特徴量の抽出可能な、次元圧縮率の高い探索的イメージ解析 AI 技術の開発と、同手法による解析を実施した。技術的には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の開発を行った。さらに他の課題推進者らとの連携を深めることで、新規画像取得の準備を進めた。

機械学習を用いた複合データの統合解析に向けて、多階層データの統合解析を行う技術開発と、同手法による解析を実施した。

**課題推進者:**久保田 浩行(九州大学)、山本 陽一郎(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:

前年度に引き続き、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。また、がん細胞と微小環境ネットワークの相互作用の解析にむけて、微小環境構成細胞の分化誘導法の研究を開始するとともに、微小環境ネットワークを有したオルガノイドの化合物アッセイ系の構築を開始した。

がん研究に最適化したオルガノイド培養法の開発を進めた。難治性がん(前がん状態を含む)の患者から iPS 細胞を樹立した(前年度と合わせて計 5 症例)。樹立した iPS 細胞については、未分化マーカーの発現や核型が正常であること、初期化因子ベクターの残存がないことを確認した。さらに、得られた iPS 細胞の分化誘導法を検討し、間質系・免疫系細胞を含む肝臓オルガノイドや、がんの浸潤転移において必要な血管内皮細胞を構築した。

がん細胞と微小環境ネットワークの相互作用の解析を進めた。臓器特異的な血管内皮細胞や間質系細胞を患者由来 iPS 細胞の構築に必要となる、肝臓における類洞内皮細

胞の分化誘導法を開発した。さらに、得られた iPS 細胞由来血管内皮細胞をオルガノイドへ付加するための共培養方法の検討を開始した。

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に向け、微小環境ネットワークを擬似化するオルガノイドモデルによる化合物評価を実現するために、線維化活性のある間葉系細胞を含んだヒト iPS 細胞由来肝臓オルガノイドにおいて化合物の活性評価をするためのアッセイ系基盤を構築した。

**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:

イメージング解析プラットフォームを構築し、バイオセンサー発現患者由来膵がんオルガノイドを用いた薬剤効果検出系の確立を行った。イメージングプローブ開発に向けた研究を推進した。超早期がんと周囲環境との相互作用理解の基盤を作るために、電子顕微鏡レベルの超微細形態解析が可能なイメージングプラットフォーム構築を進めた。更に、がん細胞と周囲環境の微細形態イメージングに関する技術改良を進めた。

多光子顕微鏡をセットアップしマウスがん組織ライブイメージングプラットフォームを構築した。バイオセンサーを用いることで、免疫細胞と腫瘍細胞の相互作用を解明し、免疫系による腫瘍細胞排除機構の一端を解明した。

ヒト患者由来膵がんオルガノイドに効率よくバイオセンサーを発現させる系を確立した。このオルガノイドを用いて、様々な薬剤が膵がんの細胞内情報伝達系や細胞増殖や分化状態などの細胞機能に及ぼす効果を定量的に解析するパイプラインを確立した。

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に向けて、本プロジェクトで使用する各種加水分解・酸化還元酵素蛍光プローブ群の合成・拡充を目指し、本年度は主に各種タンパク質分解酵素プローブの多色化を行い、400種類からなる赤色プローブライブラリーの合成を完了した。また実際に完成したライブラリーを活用した臨床検体スクリーニングとして、肺がんをターゲットとする研究を開始し、有望なプローブとターゲット酵素の同定に成功した。

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に向けて、これまでに開発してきた蛍光プローブ群、本プロジェクト研究項目(1)で開発予定の蛍光プローブ群を、各種培養がん細胞及びそのライセートへと適用し、その網羅的応答パターン解析を行う目的で、生細胞の酵素活性をイメージングマイクロプレートリーダーで評価する条件を種々検討した。

がん組織の透明化・三次元イメージング技術の開発として、マウスの肺および骨髄組織に対して、透明化技術を開発するとともに、これらマウス臓器に適したライトシート撮像系と画像解析手法を開発し、複数個体で三次元画像データを取得した。がん組織内細胞のエピゲノム情報抽出へ向けて、臓器内での細胞の三次元配置構造に着目し、その特徴を抽出することで、臓器の個体間比較に必要なレジストレーション、アノテーションのアルゴリズム開発を開始した。

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:

患者生体試料を用いた解析システムの構築とモデルマウスを用いた解析システムの構築を進めた。代謝変化によるがん幹細胞性の維持機構の解明に向けた研究を進めた。細胞ストレスとRNA代謝・翻訳制御・がん抗原発現機構に関わる機構解析を進めた。

生体内で腸内細菌と細胞老化反応の解析を可能にする遺伝子改変マウスを作製して膵がんを中心とした難治がんの発症モデルシステムの構築を行った。更に、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、様々なヒトの生体試料を用いて検証するための解析システムの確立を行った。

in vivoにおけるアミノ酸代謝解析を可能とするアミノ酸代謝およびケト酸代謝変化を検出する二つの系(リアルタイムを含む)を確立し、正常細胞では異化代謝されていると考えられている分岐鎖アミノ酸(BCAA)のがん細胞での代謝経路を同定した。

がん微小環境における様々な細胞ストレス(①断食、②アミノアシル tRNA 合成酵素阻害剤、③プロテアソーム阻害剤)がRNA代謝(NMD)に与える機構の解析を進めた。

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解析システムの構築に向けた研究を推進した。

老化細胞特異的な生存維持因子を網羅的に同定するため、ゲノムワイド siRNA スクリーニングを実行し、複数の候補遺伝子を得た。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に向けて、ライブセルイメージングによる細胞競合の新たな評価系を用いて、FGF21による細胞競合誘導機構を解明した。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に向けて、前年度明らかにした細胞死の形態が変化する酸化ストレス条件を用いて、強い酸化ストレスにより誘導されるパータナトスの分子メカニズムならびに酸化ストレス強度依存的な細胞死形態変化の分子メカニズムの解明を進めた。

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に向けて、フェロトーシス抵抗性を促進する微小環境について、これまでに作成した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シングルセル解析を実施した。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

セプトの創出に向けて、公共データベースから作成したフェロトーシス抵抗性への関与が疑われる変異遺伝子リストから 9 つの変異遺伝子に着目して、すでにフェロトーシス抵抗性を促進することが判明している KEAP1 以外の 8 遺伝子について機能およびフェロトーシスへの関連について解析を開始した。

臨床検体を用いたがん幹細胞マーカー CD44v9 の検出と早期がんマーカー有用性検討に向けて、ELISA 法による発現検討を開始するために必要な倫理申請を、サンプルの採取を担当する神戸大学(児玉先生)にて進めた。

腫瘍微小環境に存在する間質の老化細胞に Senescence-associated secretory phenotype (SASP) が起こる分子メカニズムの解析を行った。また、生体のもつ重要ながん抑制機構である細胞老化と細胞競合の機能連関の解析を行った。さらに、老化細胞や老化細胞分泌因子 (SASP 因子) を標的とした超早期病変の新たな診断法・治療法の創出を目指してスクリーニングを開始した。

**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:

マウスの膀胱がん発症モデル、細胞株などを用いて、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細胞生物学的解析システムの構築を行なった。

細胞極性に着目したがん治療コンセプトの創出に向けた研究の過程で、オートファジーとがん幹細胞の非対称分裂、細胞極性制御ネットワークとの関わりを見いだした。がん細胞の不均一性が生じる機構と考えられ、その機構の解析を進めた。具体的には、公共データベース(TCGA など各種)から数理科学的な手法で抽出した分子群を含め、代謝シフト、細胞接着制御、との関わりを解析を進め、複数の分子の同定に成功した。

EMT・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向け、糸状突起形成及び血管擬態形成の機構の一端、膀胱がん患者や肺線がん患者の予後不良との相関等を見いだした。また、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の機構の一端を見いだすなど、重要分子の抽出に成功した。

昨年度確立したファージ抗体ディスプレイスクリーニング系とマウスモデルを用いて、前がん病変のマーカー分子の探索を行った。その結果、膀胱前がん病変のマーカー分子を同定することに成功した。さらに、前がん病変の制御に関わる正常細胞と変異細胞間に生じる細胞競合の制御因子を同定するためのスクリーニング系を構築した。

マウスの様々な上皮組織に RasV12 変異や ErbB2 変異を誘導することのできるモデルシステムを構築することに成功した。ショウジョウバエ上皮をモデルとして導入し、細胞競合を介したがん原性細胞の排除の分子機構を明らかにする RNAsequence を行い、がん原性細胞で発現が変動する遺伝子群の抽出を行った。また、細胞競合を介したスーパーコンペティション機構を明らかにする2種類の大規模遺伝学的スクリーニングを開始し、候補遺伝子群の抽出を行った。

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

##### 進捗状況の把握とプロジェクトの運営

###### ○ 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、大学院医学研究科腫瘍病理学教授で構成された PM 支援チームで、PM 事務を支援する。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、Zoom などを用いて情報共有の即時化と効率化を進めた。

###### ○ 重要事項の調整(運営会議、研究チーム)

前年度に、「難治性がん克服に向けた技術開発」を縦糸とし、その技術を用いた解析「難治性がんの生物学」を横糸とした、相互に組み合う形の研究チームを構成した。各チームにはチームリーダーと運営委員を置き、月に1回の研究チーム運営会議を開催して、研究開発プロジェクトの進捗状況及び重要事項の調整を進める。通常は、メール、Slack 掲示板、Dropbox など Cloud での情報共有、Zoom 会議を組み合わせで開催する。必要に応じて、可能な限り対面での会議も実施し、リアルな人的関係の構築にも務めた。

###### ○ 研究開発機関における研究の進捗状況の把握(各チーム毎の会議、運営会議、課題推進者会議、サイトビジット等)

上述の研究チームの勉強会、会合、チームを横断する様々な共同の取り組みを行った。ここには PM も参加する。これらを通じて、PM に加え各チームリーダー及び運営委員が、チームのメンバーの進捗状況を定期的に把握する。これに加えて2ヶ月程度毎に、担当者の全員が出席する全体会議(課題推進者全体会議)を開催した。さらに、メンバー(課題推進者)専用 HP を構築し、昨年末から運用を開始した。この HP には、関係の連絡が一目でわかるようになっている。これに加え、Slack を利用した、日常的な情報交換の仕組みを構築した。PM は、必要に応じて、Slack やメールで、課題推進者と個別に情報交換を行った。これまで、各研究開発機関における研究の進捗状況の把握の目的で、サイトビジットを行う事が叶わなかったが、少しずつ開始した。

#### 研究開発プロジェクトの展開

##### ○研究開発体制における競争と協働について

プロジェクト開始早々であり、まずは、協働研究を推進するところから始めている段階

であると判断している。競争と協働を促進する目的で、三つの研究項目を横断した6つの研究チームを立ち上げた。そして、各チーム内、及びチーム横断の勉強会を、各研究室の若手を中心に企画運営してもらう仕組みを作った。

チームは、横軸となる(A) 臨床サンプル・オルガノイドチーム、(B) 難治性がんのイメージングチーム、(C) 生体内ネットワークの数理・オミックス解析チーム、をつくと同時に、縦糸としての生物データ取得解析チーム (D1～D3)からなっている。複数のチームに入っている課題推進者もいる。

○研究開発の進捗、成果を踏まえた時機を逸しない研究開発課題の大幅な方向転換や研究開発課題の廃止・追加について

○研究開発プログラム計画の実現のため、研究開発プロジェクト全体の再構築について  
全ての研究が、ほぼ当初の計画通りのペースで進んでいると判断しており、大幅な方向転換をする時期ではないと判断している。ただ、これまで誰も成功してはいない「様々な段階の膵がん組織の採取と、オルガノイドの樹立」をさらに加速し、前倒して推進する為には、特に、オルガノイドに熟練した医師と熟達した研究者の数が限られていることを踏まえ、彼らを強力に支援する体制の整備が必要であると考えている。

## (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の計画

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求めてきた。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てきた。更に、上述した情報流通の仕組みを利用して、PM がこれを把握する事により、PM が公表に先だって、知財状況を把握できる仕組みを構築し運用している。今後、工業所有権情報・研修館(INPIT)から知財に関わる専門職員(知財プロデューサー)の配置を検討する。

○ 技術動向調査、市場調査等の計画

現段階では、PM として上記調査を行う考えはないが、必要に応じて行う予定である。

○ 事業化戦略、グローバル展開戦略等の立案に向けた体制、計画等

事業化戦略及びグローバル展開に関しては、専門家を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する予定である。

○ 技術移転先、将来的な顧客開拓に向けた対応に関する計画

必要に応じて、迅速に対応する予定である。

## (3) 広報、アウトリーチ

○ シンポジウム等の開催による国民との対話の計画

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。従って、多くの国民への宣伝活動を

行う。その方法として、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)手法を取り入れる。「広告医学」の専門家のアドバイスを求めつつ検討を進めている。

#### ○ ホームページ、リーフレット等による積極的な広報、アウトリーチ活動

ホームページは、極めてコストパフォーマンスのよい手法であるので、大いに活用する。それに加えて、双方向の情報交換ができる手法など、様々な工夫を取り入れる。これも、「広告医学」の専門家のアドバイスを求めつつ検討を進める。

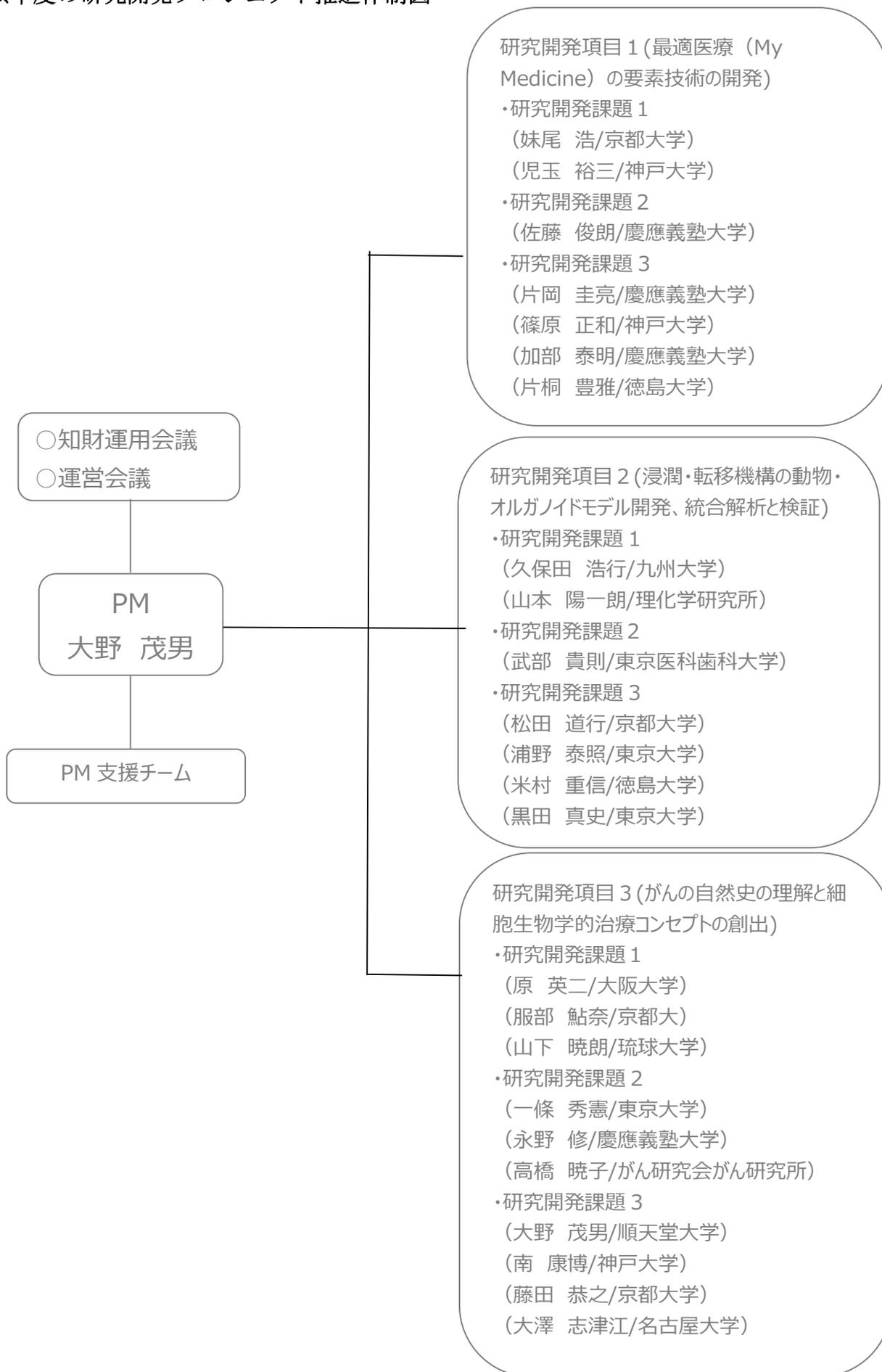
#### (4) データマネジメントに関する取り組み

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る。

本プロジェクトでは、臨床検体を利用する。従って、倫理委員会の承認を得ることが必要である。特に、同一患者から体液を含む様々な試料を採取し、集積して利用することとなる。その為に、これらの一括同意書を取得している。また、本プロジェクトでこれらの試料と情報を利用する全ての研究者が、臨床検体や臨床情報などを利活用することが出来るように、予め全参画機関で倫理委員会の承認を得るようにする手続きを進めた。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、まずはプロジェクト内で利用する。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。その為の準備を進めた。

#### 4. 当該年度の研究開発プロジェクト推進体制図



## 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	2	0	0	0
登録件数	0	0	0	0
合計(出願件数)	2	0	0	0

会議発表数			
	国内	国際	総数
招待講演	49	17	67
口頭発表	37	3	40
ポスター発表	15	1	16
合計	102	21	123

原著論文数(※proceedingsを含む)			
	国内	国際	総数
件数	2	43	44
(うち、査読有)	2	41	43

その他著作物数(総説、書籍など)			
	国内	国際	総数
総説	4	8	12
書籍	0	0	0
その他	0	0	0
合計	4	8	12

受賞件数		
国内	国際	総数
6	0	6

プレスリリース件数
6

報道件数
2

ワークショップ等、アウトリーチ件数
7