

平成 31 年 4 月 20 日

海外特別研究員最終報告書

独立行政法人 日本学術振興会 理事長 殿

採用年度 平成 29 年度

受付番号 医歯薬学 788

氏 名

藤原謙次

(氏名は必ず自署すること)

海外特別研究員としての派遣期間を終了しましたので、下記のとおり報告いたします。

なお、下記及び別紙記載の内容については相違ありません。

記

1. 用務地(派遣先国名) 用務地: Johns Hopkins University School of Medicine (国名: 米国)

2. 研究課題名(和文) ※研究課題名は申請時のものと変わらないように記載すること。

膵癌微小環境における DNA メチレーションによる間質細胞リプログラミング機構の解明3. 派遣期間: 平成 29 年 4 月 1 日 ~ 平成 31 年 3 月 31 日 (730 日間)

4. 受入機関名及び部局名

Johns Hopkins Medical Institute, Department of Oncology5. 所期の目的の遂行状況及び成果... 書式任意 **書式任意(A4 判相当 3 ページ以上、英語で記入可)**

(研究・調査実施状況及びその成果の発表・関係学会への参加状況等)

(注)「6.研究発表」以降については様式 10-別紙 1~4 に記入の上、併せて提出すること。

2017 年 4 月 1 日学術振興会海外特別研究員任期開始後から 2019 年 3 月 31 日任期終了までのプロジェクト進捗を報告する。筆者は任期開始前の 2015 年 10 月 1 日から Lei Zheng 研究室に在籍しており、開始前の研究において関連する内容も簡潔に記載する。最終的に申請内容を含め、大きく 4 つのプロジェクトに携わった。

Project 1: 膵癌微小環境における DNA メチレーションによる間質細胞リプログラミング機構の解明

膵癌は非常に予後不良の疾患の一つであり、手術以外に根治的治療がなく、かつその手術後の再発率も極めて高く抗がん剤治療の効果は低い。近年、膵癌の特徴である豊富な間質組織が抗がん剤抵抗性に関与し、また癌細胞の悪性度を増加させていることが明らかとなってきた。膵癌の微小環境の解明、そしてそれに基づく微小環境を標的とした補助療法が、膵癌患者の予後を今後大きく変えうるのではないかと期待されている。Zheng 研究室は膵癌微小環境の解明を研究の主軸に据え、多数の報告を行っている。筆者も携わったプロジェクトにおいて、微小環境において癌細胞がその環境を癌細胞に有利な状況に改変していく際に(リプログラミング)、癌細胞は周囲の細胞に DNA メチレーションを起こすことによって細胞の性質を変えている可能性を 2016 年に報告した(Xiao Q et al. Cancer Res. 2016)。この、DNA メチレーションを阻害することによって間質組織のリプログラミングを抑制できうれば、膵癌微小環境を標的とした治療へとつながるのではないかと期待された。

マウス組織において、SOCS1 遺伝子の DNA メチレーションが膵癌間質組織に豊富に存在する線維芽細胞の癌関連線維芽細胞へのリプログラミングに関与していることを報告した。研究を進めるに当たり、研究対象を間質細胞内の線維芽細胞および免疫細胞、特にマクロファージに広げることとし、また過去の研究結果より解糖経路の遺伝子に生じる DNA メチレーションが、間質リプログラミングにおいて重要な役割を果たしていると考えた。まず、癌細胞との共培養後にマウス骨髄由来マクロファージを分離し RNA と DNA を抽出した。RT-PCR およびメチル化特異的 PCR によって、マクロファージにおいて解糖経路および酸化的リン酸化関連遺伝子の DNA メチレーションが、M2 型マクロファージへの変化と関連していることを見出した。M1 型および M2 型マクロファージはマクロファージの表現型及び機能を極端に 2 分化し単純化した概念で研究分野においては広く認知されており、M1 型は癌細胞抵抗性であり M2 型は癌細胞を補助する能力を有するとされている。なお、この DNA メチレーションと極性化の関連はマウス細胞だけでなくヒト細胞においても確認しえた。ついで、機能面への影響の検証を行い、具体

的には浸潤実験チャンバーを使用することで癌細胞の移動能の変化を検証した。一般に癌細胞とマクロファージは共培養することで癌細胞の移動能は増加する（これは癌細胞がマクロファージを M2 型に近いとされる癌関連マクロファージへリプログラミングしており、特に M1 型に対し強く変化を促していると考えられる）。メチレーション阻害薬を事前にマクロファージに使用しマクロファージ内の DNA メチルトランスフェラーゼを抑制しておく、その後の癌細胞との共培養で癌細胞の移動能増加作用が弱まった。これは癌細胞によるマクロファージの DNA メチレーションを介したリプログラミングが抑制された可能性が考えられた。また、具体的にマクロファージによって癌細胞の移動能を増加させる際に生じている遺伝子変化を検証するため、移動能に関連した遺伝子の文献的検索を行い、まず計 16 の遺伝子を選択した。それらを PCR で細かく検証していき、特にマクロファージでの IL-10 および癌細胞での受容体 IL-10R を shRNA によって抑制することで、癌細胞の移動能に対する共培養効果が減少することを確認した。また、マウスを用いた *in vivo* の実験を行ったが、その実験概要を記載すると別のマウスより分離培養し分極化させた M1 型および M2 型マクロファージを、マクロファージ枯渇処理後の膀胱同所性移植マウスモデルに尾静脈より注入した。ほとんどのグループで高頻度に転移を認めていたが、唯一メチレーション阻害薬で前処置を行った M1 マクロファージのみにおいて転移が抑制されていた。Methylation array および RNA-seq のデータを加え、ここまでの内容で論文を作成し現在投稿中である。なお、膀胱間質組織の主要構成因子である線維芽細胞、その起源とされるマウス間葉系幹細胞でも実験を進めていたが、マクロファージでの研究結果が大きく前進しており、研究室は本報告執筆時点ではマクロファージ研究に中心を据えている。

さらにマクロファージ研究から得られた成果を記載する。先に癌細胞側の移動能変化に関わる研究を記載したが、マクロファージに生じている腫瘍誘発性 DNA メチル化を調節するメカニズムの研究を進めた。文献的考察から、特定のクロマチンのメチル化に DNA メチルトランスフェラーゼを誘導する chromatin remodeling complex Polycomb Repressive Complex 2 (PRC2) とその catalytic subunit の Enhancer of zeste homolog 2 (EZH2) がマクロファージの変化に関わっていると考え (Gan L, Biomark Res. 2018, Neele AE, J Exp Med. 2018)、詳しく検証した。EZH2 タンパク質と Ser21 リン酸化 EZH2 (pSer21-EZH2) タンパク質の割合を癌細胞との共培養前後で確認したところ、共培養した M1 マクロファージにおける pSer21-EZH2/EZH2 の割合が最も低値を示した。免疫沈降を行い、癌細胞が pSer21-EZH2 の Ubiquitin-dependent proteolysis を阻害し、M1 マクロファージにおいて EZH2 の安定化を促していることが示唆された。ここまでの内容で、2019 年 4 月 2 日 American Association for Cancer Research(AACR) Annual meeting 2019 において共同演者として発表した。現在は、さらに研究をすすめ申請書で当初計画していた治療標的となりうる関連する表面抗原をほぼ同定し検証を進めているが、未発表内容のため詳細は割愛する。

申請書に記載していたヒト膀胱 209 症例の癌包埋組織である FFPE 組織を用いての大規模な発現解析は、新規実験手技である多重免疫染色を専門に行う研究室内のチームへ移行し、他の大規模な癌組織の解析と共に進められた。この研究手技は Oregon Health & Science University 内の Coussens lab とのコラボレーションによって当研究室で開始された。従来ヒト膀胱症例の FFPE 組織は非常に貴重であり、その使用に関しては貴重な結果を得られる可能性に関わらず慎重にならざるを得なかった。しかしこの手技を用いることによって、試行された免疫染色組織の抗体を取り除き再度の染色を繰り返すことが可能となり、同一の切片を用いて計 12 回の染色が可能となり大幅にヒト FFPE 組織使用量を減らせる (Tsujioka T, Cell Rep. 2017)。筆者は、任期開始前の 2016 年 10 月 Coussens lab において、論文著者である当時 Postdoctoral researcher (現、同大学 Adjunct Assistant Professor) の辻川敬裕氏から、直接同手技のトレーニングをご指導いただいた。Zheng 研究室に戻った後、複数月かけて研究室内の準備、そしてそれらを用いての手技の再現に成功しえた、以降の、海外特別研究員採用期間中も免疫染色チームへの手技の移行とデータの解析・検証に積極的に貢献した。実際の手技以上に難しいのがデータの解析であり、計 12 枚のスライドをコンピュータ上で融合させ、かつ細胞ごとに目的とする抗原の発現状況を数値化する必要があった。非常に複雑かつ手間がかかるため、チームと共に解析手技の頻回な検証を必要とした。すでに論文作成に移行しているデータもあり、遠からず発表できるものと思われる。

Project 2; 膀胱における Mass Spectrometry を用いた新規免疫抗原の同定

Project 1 と並行して、筆者は 2017 年 5 月より近年急激に注目を集めている Proteomics 分野の研究を進めた。Proteomics は、大規模な遺伝子研究の Genomics と対をなす用語であるが、Genomics があくまで遺伝子の情報からタンパク質発現を予想するものであるのに対し、Proteomics は実際に発現しているタンパク質を詳細に解析することから、より実際のタンパク質の発現状況を検証可能で臨床的に有意な情報を得られることが期待できる。しかし、タンパク質は容易に変化しその種類も遺伝子よりはるかに多いことから、タンパク質研究は遺伝子研究に比べて大幅に遅れてきた。しかし、近年 Mass Spectrometry(MS) を用いたタンパク質解析技術の大幅な進歩により、今後の大きな発展が期待されている分野である。Zheng 研究室は以前より膀胱免疫治療を研究の軸に据えていたが、2016 年に発表されたヒトメラノーマ組織からのネオエピトープ直接同定の報告を参考とし (Bassani-Sternberg M. Nature Commun. 2016)、ヒト膀胱組織からのネオエピトープ分離同定を目指し本プロジェクトが立案された。Bassani-Sternberg らは、癌組織中から HLA-I, HLA-II に結合しているペプチドを分離し、MS を用いてそれらが解析可能であることを示した。もし、同様にヒト膀胱組織からも治療標的となりうる HLA-I/II 関連ペプチドを同定で

できれば、有効な治療法の乏しい膵癌の治療に大きな革新をもたらせることが期待できうる。ただ、Zheng 研究室では proteomics 研究の経験者がおらず、開始時点で研究室でもっとも基礎研究経験が豊富であった筆者が中心になってプロジェクトを開始することとなった。本プロジェクトは大学内 Wilmer Eye Institute の Assistant professor である Pingbo Zhang 氏の協力指導の下、進めていった。

実験の概要を述べる。①HLA-I, HLA-II 分子を結合させる抗体をマウスハイブリドーマ細胞の上清より抽出する。②ビーズと抗体の結合後に、結合を安定化させるため cross-link を行い抗体架橋ビーズを作成する。③ヒト膵癌組織 lysate を作成し、架橋ビーズを用いて HLA-I および HLAII 分子を分離、脱塩およびペプチド抽出を行う。④MS を用いての解析、⑤RAW データからのバイオインフォマティクス解析である。抗体作成には ATCC よりハイブリドーマ細胞 HB95 細胞および HB145 細胞を入手した。Cross-linking の後にビーズの検証のため、ヒト癌細胞株及びヒト末梢血単核球細胞をサンプルとして使用し、免疫沈降でビーズが有効に目的抗体を分離できるか確認した。この際、HLA-I 抗体架橋ビーズはサンプル中の HLA-I 蛋白を高率に回収できることを確認したが、HLA-II 抗体架橋ビーズは目的タンパクの回収効率が低く、抗体の再作成や条件設定の検証の上で、最終的にビーズの材料を変更することにより回収効率を改善できた。ヒト膵癌組織から得られたペプチドは Johns Hopkins University 内の Mass Spectrometry Core にて MS 解析が行われた。その後のバイオインフォマティクス解析は研究室で行ったが、一回の解析に 2-3 日間を要するため、周到なプログラムの設定、検証を必要とした。全症例において、MaxQuant with Andromeda (MPI of Biochemistry)を用いた Database search analysis、および Novor (Rapid Novor Inc.)を使用した De novo sequencing の異なる 2 つのプログラム解析を行った。前者は既存のアミノ酸配列と比較検証するものでありデータの信頼性が高いが、あくまで既存の正常とされる配列のみを提示しうる。その一方後者は、異なったアルゴリズムでデータを解析しており、純粋にアミノ酸配列をデータベースとの比較なしに提示しうるが、データの信頼性は前者より著しく劣る。将来的な変異タンパク質の同定を目指し後者も使用し、両者のデータを比較検討した。なお、解析での結果として Database search で得られたアミノ酸配列の 20-25%が De novo sequencing では認められたが、それはすなわち 75-80%の配列は重複されていないことを意味する。どちらのアルゴリズムが絶対的に正しいとは現時点では断言できず、Proteomics の解析結果は絶対と言えるものではなく Genomics を含めた様々な結果を交えデータの信頼性をあげていき、最終的に最も信頼しうるペプチド配列を選択する必要があると考えられた。計 3 症例の解析が終了した時点で、2018 年 4 月米国ボルチモアで開催された Pancreas 2018, Innovations in the Care of Pancreatic Cancer においてポスター発表を行った。

HLA-II 架橋ビーズによって分離したサンプルに標的外のペプチドの混入を認めたため、Protocol の再検証を必要とした。こちらは残念ながら本申請書作成時点でもなお検証中の段階である。HLA-I ペプチドは、計 14 症例からのペプチド分離が終了し、データを総計し多数の候補ペプチドの同定に至った。免疫治療に使えるペプチドを選択した上でのさらなる実験も含めて、プロジェクトは現時点で大きく前進している。ただし、未発表の内容を多く含んでいるためここでの記載は残念ながら割愛する。すでに論文作成に取り組んでる段階であり、遠からずほとんどのデータを正式に発表できるものと考えている。

Project 3: 膵癌における放射線療法と免疫チェックポイント阻害薬併用の有効性検証

筆者は、2018 年 5 月より免疫チェックポイント阻害薬の膵癌における有効性検証のプロジェクトに参加した。免疫チェックポイント阻害薬は 2018 年の本庶氏のノーベル賞受賞で大きな注目を集めたが、当研究室においては以前より膵癌への適応が可能か検証を行っていた。残念ながら膵癌治療での有効性は証明されていないものの、他の薬剤との併用で有効性を示す可能性はありうる。研究室では複数のプロジェクトが進行中であるが、その中で申請者は放射線治療およびインドールアミン酸素添加酵素 (IDO1)阻害薬との併用の有効性を検証した。IDO1 阻害薬は単独では有効性に乏しく、放射線治療もマウス実験では短期的に有効性を示せるものの長期的には効果の消失が認められた。放射線治療と PD1 抗体との併用で腫瘍の増殖が抑えられ、かつ生存率が患者において増加することは既に報告されていたため (Aliru ML. et al. Immunotherapy. 2018)、今回放射線治療、PD1 抗体、IDO1 阻害薬の triple therapy を行い、大きな生存期間の延長が期待された。マウスは、他のマウスに形成された皮下腫瘍を 2 mm 大に細かく細切し、B6 マウスの膵体尾部に同所性に移植した。その後、放射線治療、PD1 抗体、IDO1 阻害薬それぞれ単独治療および併用治療にグループ分けを行った。効果の評価は、超音波を用いた経時的な腫瘍径の評価、そして最終的な生存期間の比較で行った。実験は既に複数回が終了し、有意な結果が得られた。さらに同様の実験内容ではあるが生存実験ではなく治療開始 1 週間後にマウスを安楽死させ、腫瘍を摘出、Flow cytometry および NanoString での免疫細胞の腫瘍内の動態を比較検証した。こちらも有望な結果が得られたが、結果未発表のため詳細は割愛する。すでに論文作成には着手しており、遠からず発表できるものと考えている。

Project 4: 膵癌における神経浸潤に関与する因子の同定及び新規治療の開発

申請者は膵癌神経浸潤に関する Project において、共同研究者として貢献した。膵癌における神経浸潤

は外科的に切除された膵臓癌に多く認められ、再発および転移と関連し予後不良因子とされる。神経浸潤の存在は転移の初期段階を表していると考えられるが、前癌病変及び初期膵癌における研究は少ない。Zheng 研究室では、以前に axon guidance gene family の一部である分泌タンパク質 Semaphorin 3D (Sema3D) の膵癌の転移への関与を報告した (Foley K. Sci Signal. 2015) が、その後の検証で、Sema3D がその共受容体である Plexin D1 および Neuropilin-1 と相互作用して、膵癌細胞における浸潤および転移能を高めることを見出した。今回癌細胞と神経細胞の共培養での先の因子の関与を検証した。in vitro モデルにおいて共培養実験で浸潤能の評価を行ったが、生後 1 週間のマウスから採取した Dorsal root ganglion を神経細胞として使用し、shRNA と中和抗体を Invasion assay で併用することで検証した。転移能は PlexinD1 ノックアウトマウスを用いて免疫組織学的検査によって転移の評価を行った。なお膵癌自然発生モデルでの検証では両蛋白の発現が癌の進行とともに増加し、また PlexinD1 ノックダウンは担癌マウスにおける転移発生率を減少させた。さらに検証を進め、分子シグナル伝達経路の解明に取り組み、この Sema3D-Plexin D1 経路において ADP-ribosylation factor 6 (Arf6) および解糖系代謝経路の活性化、乳酸分泌が関与している可能性が見出された。中和抗体によって Sema3D および PlexinD1 の経路を遮断すると、通常みられていた解糖遺伝子発現の増加作用は弱められていた。研究内容を膵癌細胞と神経細胞だけに留めず、さまざまな因子との関連性も検証していった。膵癌に高率に変異がみられるがん遺伝子である Kras の関与についても検証を行った。変異型 Kras を発現しない Panc02 膵癌細胞においては Sema3D 投与での Arf6 活性化は示されず、このことから Sema3D シグナル伝達に変異型 Kras 発現細胞において特に影響が強いことが示唆された。また、別の検証として Project 1 の研究対象である腫瘍関連マクロファージの神経浸潤との関連も検証した。マクロファージが分極化する際に Sema3D を投与したマクロファージは、膵癌細胞と共培養した後に分離し RNA の解析を行うと、抗腫瘍と考えられる M1 型マクロファージの関連遺伝子の発現が減少しており、対照的に腫瘍細胞を補助すると考えられる M2 型マクロファージの分極マーカーの発現が増加していた。同研究内容は 2018 年 4 月および 2019 年 3 月に AACR Annual meeting において、共同演者として報告した。またすでに記載内容のうち前半のデータを用いた論文作成は終了しており、投稿中の段階である。

申請者は上記以外にも研究室内の多数のプロジェクトに積極的に貢献した。特に外科医の前歴を有することから、マウス実験における外科的処置において、中心的術者でありかつ技術指導を行った。Zheng 研究室のみに留まらず、Johns Hopkins 大学内の他の 4 つの研究室からの技術指導の依頼にも積極的に対応した。その一つの成果として、2019 年 4 月に新たな MRI イメージング用薬剤である dextran-peptide conjugate の膵癌イメージングの有効性を報告した (Han Z, et al. Bioconjug Chem. 2019)。論文内では、膵癌皮下腫瘍モデルの作成を担当した。簡潔に記載すると、dextran-peptide conjugate はその過剰発現された微小環境バイオマーカー、extradomain-B fibronectin (EDB-FN) を介して膵癌の MR 分子イメージングを行うために開発された。dextran は、放射性核種または金属標識を必要とせず、chemical exchange saturation transfer (CEST) MRI によって直接検出することができ、それは実際にマウスの皮下腫瘍モデルにおいて実証された。