

平成 28 年度 委託研究開発成果報告書

I. 基本情報 (公開)

- 事業名 : (日本語) 次世代がん医療創生研究事業
(英語) Project for Cancer Research and Therapeutic Evolution
- 研究開発課題名 : (日本語) 異分野先端技術融合による薬剤抵抗性を標的とした革新的複合治療戦略の開発
(英語) Development of combined strategy for treatment of drug-insensitive cancers with advanced technologies in interdisciplinary research areas
- 研究開発担当者 所属 役職 氏名 : (日本語) 国立大学法人京都大学 iPS 細胞研究所 教授 山田泰広
(英語) Center for iPS Cell Research and Application (CiRA), Professor, Yasuhiro Yamada
- 実施期間 : 平成 28 年 5 月 25 日 ~ 平成 29 年 3 月 31 日
- 分担研究 開発課題名 : (日本語) iPS 細胞技術を応用した創薬スクリーニングと治療感受性シグナルの同定
(英語) Drug screening and identification of target signaling pathway for cancer therapy with iPS cell technology
- 研究開発分担者 所属 役職 氏名 : (日本語) 国立大学法人京都大学 iPS 細胞研究所 教授 山田泰広
(英語) Center for iPS Cell Research and Application (CiRA), Professor, Yasuhiro Yamada
- 分担研究 開発課題名 : (日本語) CTOS 法による創薬スクリーニングと患者間および腫瘍内多様性の評価
(英語) High-throughput screening with evaluation of inter-patient and intra-tumor heterogeneity using CTOS panels
- 研究開発分担者 所属 役職 氏名 : (日本語) 地方独立行政法人大阪府立病院機構 大阪国際がんセンター (研究所) 総括研究員 (生化学部門長) 井上正宏
所属 役職 氏名 : (英語) Osaka Prefectural Hospital Organization Osaka International Cancer Institute, Department of Biochemistry, Principal Investigator Masahiro Inoue

分担研究 (日本語) iPS 細胞技術により作製したネオアンチゲン特異的キラーT 細胞を用いた免疫療法の開発

開発課題名 : (英 語) Development of a method for immune cell therapy against cancer utilizing the iPSC-derived cytotoxic T lymphocytes specific for neo-antigen

研究開発分担者 (日本語) 国立大学法人京都大学 ウイルス・再生研究所 教授 河本宏

所属 役職 氏名 : (英 語) Kyoto University, Institute for Frontier Life and Medical Sciences, Professor, Hiroshi Kawamoto

分担研究 (日本語) 肺がん、大腸がん臨床検体からの PDX モデル等の作製とそれらを用いた薬剤抵抗性機構の解析および新規標的療法の開発

開発課題名 : (英 語) Analysis of drug resistance mechanisms and therapeutic strategies by establishing lung and colorectal cancer patient derived xenograft models.

研究開発分担者 (日本語) 公益財団法人 がん研究会 がん化学療法センター基礎研究部
主任研究員 片山量平

所属 役職 氏名 : (英 語) The Cancer Chemotherapy Center of JFCR, Senior staff scientist, Ryohei Katayama

II. 成果の概要（総括研究報告）

和文

本研究では、iPS 細胞技術を薬剤抵抗性 CTOS および PDX に応用して革新的な創薬評価システムや種々の治療薬の個別化臨床効果予測システムを構築し、患者ごとに異なるがんの薬剤感受性に着目した画期的なスクリーニング法を開発し、ヒトがんの臨床に直結する独創的な個別化がん複合治療戦略の開発を目指す。これらの目標達成のために、以下の3項目について研究開発を行う。

- (1) iPS 細胞技術・CTOS を活用した独創的創薬スクリーニング
- (2) 薬剤抵抗性がん細胞を標的とした治療戦略開発
- (3) 個別化がん細胞培養法を活用したネオアンチゲンスクリーニングと iPS 細胞を使った免疫細胞再生による革新的治療法の開発

最終的に、薬剤抵抗性がんを標的とした、患者個々における治療感受性シグナルの同定に基づく分子標的療法と、免疫療法の併用による複合的個別化治療法の創出を目指す。研究計画は着実に進捗している。

本年度の成果は以下のとおりである。

（研究開発項目1）iPS 細胞技術・CTOS を活用した独創的創薬スクリーニング

細胞初期化抵抗性を指標としたスクリーニングとして、EGFR 変異肺がん細胞株でのスクリーニングを行った。EGFR 阻害剤がヒット化合物として抽出できることを確認した。KRAS 変異肺がん細胞株でのスクリーニングを開始した。明細胞肉腫細胞株でのスクリーニングの準備として初期化レポーターを持つマウス肉腫を誘導した。（山田）

CTOS 自動分配装置を用いて大腸癌 CTOS でスクリーニングし、候補薬剤を同定し、大腸癌で効果の多様性を検討した。群間比較によりバイオマーカーの探索を開始した。生物学特性を指標にしたスクリーニングのために、アピカル面のイメージング法を確立し、極性転換阻害を指標にスクリーニングを行った。（井上）

（研究開発項目2）薬剤抵抗性がん細胞を標的とした治療戦略開発

大腸癌、肺癌の CTOS パネル拡張を行った。卵巣癌の CTOS 感受性試験を開発し、由来する患者の治療成績と CTOS 感受性試験の照合を開始した。（井上）

肺がんおよび大腸がん臨床検体からの PDX モデルおよび PDC（がん細胞株）の作成が、予定通り着実に進んでいる。また薬剤抵抗性機構の解析についても順調に進んでおり、新たな薬剤抵抗性（耐性）機構の発見をし、論文化を目指している。また EGFR 変異陽性肺がんにおいて、第3世代の EGFR 阻害薬を含む全ての EGFR 阻害薬に抵抗性を生じる重複変異の克服にむけた新たな標的療法（併用療法）を発見し、論文として発表した（*Nature Communications* 2017）。（片山）

がん研および大阪国際がんセンターにおける臨床検体を用いて、薬剤抵抗性がん細胞、CTOS への細胞初期化因子の導入を開始した。薬剤抵抗性がん細胞を用いた細胞初期化抵抗性を指標とするスクリーニングの開始に向けて順調に進捗している。（山田・井上・片山）

（研究開発項目3）個別化がん細胞培養法を活用したネオアンチゲンスクリーニングと iPS 細胞を使った免疫細胞再生による革新的治療法の開発

抗原特異的な殺傷能力の高いキラーT細胞を iPS 細胞から分化誘導する方法を開発することが必須の課

題であったが、本年度はそれに成功し、出願するとともに、論文として発表した (*Cancer Research*, 2016)。また、TCR 遺伝子を iPS 細胞に導入する方法、さらにそのようにしてつくった TCR-iPS 細胞から高品質なキラーT 細胞を誘導することも本プロジェクトには必須の基盤技術であるが、これにも成功し、WT1 抗原特異的 TCR を導入した iPS 細胞から再生したキラーT 細胞ががん細胞を殺傷することを確認し、がん学会のシンポジウム (10 月) 等で発表した。(河本)

英文

The goal of the collaborative research project is to develop combined strategy for treatment of drug-insensitive cancers with advanced technologies in interdisciplinary research areas. To achieve our goal, we will employ a combination of iPS cell technology and unique methods to expand individual patients' cancer cells. Particularly, we will identify molecularly targeted drugs with unique screening platforms and develop a novel immunotherapy using iPS cell-derived T cells, both of which are effective for drug-insensitive cancer in each patient. Finally, we will propose a novel combined strategy targeting drug-insensitive cancers with these two approach, namely, molecularly targeted drugs and cancer immunotherapy. We believe that the strategy developed in this joint effort will hold significant value for realizing precision medicine for drug-insensitive cancers.

Research projects:

- 1) Drug screening based on refractoriness to reprogramming of cancer cells
- 2) Uncovering mechanisms underlying drug insensitivity and exploiting a novel strategy for drug-insensitive cancer treatment
- 3) Developing a novel cancer immunotherapy using iPS cell-derived T cells

Achievement in FY2016:

- 1) Drug screening based on refractoriness to reprogramming of cancer cells

In the FY2016, we performed the reprogramming-based screening in EGFR-mutated lung cancer cells. To this end, we confirmed that EGFR inhibitors are successfully identified as hit compounds. We started the reprogramming-based screening in KRAS-mutated lung cancer cells. To initiated the reprogramming-based screening in rare sarcomas, we established a mouse model with reporter allele to monitor *Nanog* expression. We also introduced reprogrammable allele into drug-insensitive cancers, which have been established in Cancer Institute (JFCR) and Osaka International Cancer Institute (Yamada, Katayama, Inoue).

- 2) Uncovering mechanisms underlying drug insensitivity and exploiting a novel strategy for drug-insensitive cancer treatment

Using newly developed automatic pipetting machine, we performed high-throughput screening with colorectal cancer CTOS. Candidate drugs were evaluated with a CTOS panel for assessing variation of sensitivity and developing biomarkers. For a phenotypic screening, we established an imaging method of CTOS polarity, and performed screening. We continued to expand CTOS panels for colorectal and lung cancer. We optimized CTOS method for ovarian cancer, and initiated comparison between the sensitivity assay and clinical outcome (Inoue).

Patient Derived Xenograft (PDX) and Patient Derived Cell line (PDC) model from lung cancer and colorectal cancer clinical specimens have been progressed steadily as planned. Analysis of the drug resistance mechanism has also steadily progressed, and recently identified new drug resistance mechanisms are preparing

for publication. We also discovered a new targeted therapy (combination therapy) for overcoming the triple mutation (EGFR-C797S/T790M/activating mutation) that confers resistance to all clinically available EGFR inhibitors including osimertinib, the third generation EGFR-TKI, in EGFR mutation positive lung cancer. The finding was published as a peer-review paper (*Nature Communications* 2017) (Katayama).

3) Developing a novel cancer immunotherapy using iPS cell-derived T cells

It has been a prerequisite in this project to develop a method by which cytotoxic T lymphocytes (CTLs) with high antigen specific cytotoxic activity can be induced from T cell-derived iPSCs. In this fiscal year (2016), we have succeeded in developing such a method. This achievement was published as a manuscript (Maeda et al, *Cancer Research*, 2016). Another important technology required for this project is to transduce iPSCs with exogenous TCR gene (TCR-iPSCs) and to induce high quality CTLs from such TCR-iPSCs. We have succeeded in developing this method, and have confirmed that regenerated CTLs from TCR-iPSCs are as potent as those from T-iPSCs. This achievement was reported in a symposium of annual meeting of Japanese Cancer Society (Yokohama, Oct 2016) (Kawamoto).

III. 成果の外部への発表

(1) 学会誌・雑誌等における論文一覧 (国内誌 3 件、国際誌 1 2 件)

1. Hashimoto K, Yamada Y, Semi K, Yagi M, Tanaka A, Itakura F, Aoki H, Kunisada T, Woltjen K, Haga H, Sakai Y, Yamamoto T, ***Yamada Y**. Cellular context-dependent consequences of Apc mutations on gene regulation and cellular behavior. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2017 114(4):758-763.
2. Taguchi J, ***Yamada Y**. Unveiling the role of senescence-induced cellular plasticity. *Cell Stem Cell*. 2017 20(3):293-294, Preview.
3. Komura S, Semi K, Itakura F, Shibata H, Ohno T, Hotta A, Woltjen K, Yamamoto T, Akiyama H, ***Yamada Y**. *EWS-FLII*-induced osteosarcoma model unveiled a crucial role of impaired osteogenic differentiation on osteosarcoma development. *Stem Cell Reports*. 2016 6(4):592-606.
4. Tanaka N, Mashima T, Mizutani A, Sato A, Aoyama A, Gong B, Yoshida H, Muramatsu Y, Nakata K, Matsuura M, **Katayama R**, Nagayama S, Fujita N, Sugimoto Y, Seimiya H. APC Mutations as a Potential Biomarker for Sensitivity to Tankyrase Inhibitors in Colorectal Cancer. *Mol Cancer Ther*. 2017, 16(4):752-762.
5. Uchibori K, Inase N, Araki M, Kamada M, Sato S, Okuno Y, Fujita N, ***Katayama R**. Brigatinib combined with anti-EGFR antibody overcomes osimertinib resistance in EGFR-mutated non-small-cell lung cancer. *Nature Commun*. 2017, 8:14768.,
6. ***Katayama R**. Therapeutic strategies and mechanisms of drug resistance in anaplastic lymphoma kinase (ALK)-rearranged lung cancer. *Pharmacol Ther*. 2017, Feb [Epub ahead of print], Review
7. Gainor JF, Dardaei L, Yoda S, Friboulet L, Leshchiner I, **Katayama R**, Dagogo-Jack I, Gadgeel S, Schultz K, Singh M, Chin E, Parks M, Lee D, DiCecca RH, Lockerman E, Huynh T, Logan J, Ritterhouse LL, Le LP, Muniappan A, Digumarthy S, Channick C, Keyes C, Getz G, Dias-Santagata D, Heist RS, Lennerz J, Sequist LV, Benes CH, Iafrate AJ, Mino-Kenudson M, Engelman JA, Shaw AT. Molecular

- Mechanisms of Resistance to First- and Second-Generation ALK Inhibitors in ALK-Rearranged Lung Cancer. *Cancer Discov.* 2016, 6(10):1118-1133.
8. Ikawa T*, Masuda K, Endo TA, Endo M, Isono K, Koseki Y, Nakagawa R, Kometani K, Takano J, Agata Y, Katsura Y, Kurosaki T, Vidal M, Koseki H, ***Kawamoto H**. Conversion of T cells to B cells by inactivation of polycomb-mediated epigenetic suppression of B lineage program. *Genes & Development.* 2016 30 (22): 2475-2485.
 9. Maeda T, Nagano S, Ichise H, Kataoka K, Yamada D, Ogawa S, Koseki H, Kitawaki T, Kadowaki N, Takaori-Kondo A, Masuda K, ***Kawamoto H**. Regeneration of CD8 α β T cells from T cell-derived iPSC imparts potent tumor antigen-specific cytotoxicity. *Cancer Research.* 2016 76 (23): 6839-6850.
 10. Tashiro T, Okuyama H, Endo H, Kawada K, Ashida Y, Ohue M, Sakai Y, **Inoue M**. *In vivo* and *ex vivo* cetuximab sensitivity assay using three-dimensional primary culture system to stratify KRAS mutant colorectal cancer. *PLOS ONE* 2017 12(3): e0174151.
 11. Endo H, Okami J, Okuyama H, Nishizawa Y, Imamura F, **Inoue M**. The induction of MIG6 under hypoxic conditions is critical for dormancy in primary cultured lung cancer cells with activating EGFR mutations. *Oncogene* 2016 [Epub ahead of print]
 12. Kimura H, Fumoto K, Shojima K, Nojima S, Osugi Y, Tomihara H, Eguchi H, Shintani Y, Endo H, **Inoue M**, Doki Y, Okumura M, Morii E, Kikuchi A. CKAP4 is a Dickkopf1 receptor and is involved in tumor progression. *J Clin Invest* 2016. 126(7):2689-2705.
 13. がん細胞におけるエピゲノム制御とがん幹細胞モデルの作製, 柴田 博史、**山田 泰広**, 大腸がん Perspective, 2016, Vol.2, No.4, 39-45.
 14. エピゲノムリプログラミングによるがん研究, 田口純平、**山田泰広**, 実験医学増刊号 エピゲノム研究-修飾の全体像の理解から先制・個別化医療へ, 2016, Vol.34 No.10 (p1611-1616)
 15. **井上正宏**. 抗がん剤開発を目指したがん細胞三次元初代培養法の確立. *バイオサイエンスとインダストリー (B&I)*. 75(1), 22-6, 2017.

(2) 学会・シンポジウム等における口頭・ポスター発表

1. **Yamada Y**, DISSECTING CANCER BIOLOGY WITH iPSC TECHNOLOGY, *The 41st NAITO Conference*, 2016/7/7, 国内
2. **Yamada Y**, Dissecting the cancer biology with iPS cell technology, *The 9th Guangzhou International Conference on Stem Cell and Regenerative Medicine*, 2016/12/21, Guangzhou, China
3. **Yamada Y**, Dissecting cancer biology with iPS cell technology, *The 13th National Cancer Conference*, 2016/11/8, Bangkok, Thailand
4. **片山量平**, Tumor cell and stromal cell mediated drug resistance in driver oncogene positive non-small cell lung cancer, 第 74 回日本癌学会学術総会, シンポジウム口頭, 2016/10/6, 国内.
5. **片山量平**, ALK 戦線異常アリ: 多様な TKI 耐性機構とその克服, 第 57 回日本肺癌学会学術集会, シンポジウム口頭, 2016/12/19, 国内.
6. **片山量平**, ドライバーがん遺伝子陽性がんにおける分子標的薬耐性機構とその検索, 口頭, 第 1 回 Liquid Biopsy 研究会, 2017/1/21, 国内.

7. **井上正宏**, 細胞集塊における浸潤・転移の特性, 第 20 回日本がん分子標的治療学会学術集会, ワークショップ口頭, 2016/6/1, 国内
8. **井上正宏**, 大腸癌の極性転換と肝転移, 第 68 回日本細胞生物学会大会 (日本ケミカルバイオロジー学会 合同大会), シンポジウム口頭, 2016/6/16
9. 多代尚広, 奥山裕照, 萩原健, 遠藤洋子, 河田健二, 大植雅之, 坂井義治, **井上正宏**, KRAS 変異大腸癌はセツキシマブおよび併用療法に対する感受性が異なる群に層別化される, 第 75 回日本癌学会学術総会, 口頭, 2016/10/7, 国内
10. **井上正宏**, マウス腫瘍と CTOS 法による in vivo/ ex vivo シャトルシステム, 第 75 回日本癌学会学術総会, シンポジウム口頭, 2016/10/7, 国内
11. 遠藤洋子, 奥山裕照, 久保田哲, 久木田洋児, **井上正宏**, 患者腫瘍移植モデルと ex vivo 培養間のシャトルシステムによる臨床効果評価技術の確立, 第 75 回日本癌学会学術総会, ポスター, 2016/10/8, 国内
12. **Inoue M.**, The application of a primary culture method of 3D cancer cells to high throughput screening, Epithelial Biology Center Seminar (Vanderbilt University Medical Center), 口頭, 2016/10/28, 国外
13. **井上正宏**, 初代がん細胞三次元培養法の開発と生細胞利用システムの構築, 細胞アッセイ研究会シンポジウム 細胞アッセイ技術の現状と将来, シンポジウム口頭, 2017/1/31, 国内
14. **Inoue M.**, Characteristics of cancer cells revealed by a method of primary culture spheroids, Kumamoto University Advance Research Project A & Program for Advancing Strategic International Networks to Accelerate the Circulation of Talented Researchers International Symposium, シンポジウム口頭, 2017/2/11, 国際
15. **井上正宏**, 最小機能単位としての癌細胞集団, 第 16 回日本再生医療学会総会, シンポジウム口頭, 2017/3/9, 国内

(3) 「国民との科学・技術対話社会」に対する取り組み

1. iPS 細胞作製技術を用いたがんエピゲノム研究, **山田泰広**, 名古屋市立大学オープンカレッジ, 2016/11/18, 国内
2. iPS 細胞を使ってがんを知る, **山田泰広**, 日本がん分子標的治療学会学術集会 20 回記念 特別企画 市民公開講座, 2016/6/1, 国内
3. iPS 細胞からキラーT 細胞をつくってガンを退治! **河本宏**, 日本免疫学会主催免疫ふしぎ未来 2016 ショートトーク、科学未来館 (お台場)、2016/8/7, 国内
4. 「免疫って何だろう」から「免疫の最前線まで」 **河本宏**, JICA 主催企画展「生きる。暮らす。守る。-つながる世界の命と健康-」、名古屋地球広場、2017/2/28, 国内

(4) 特許出願

該当なし