

令和元年6月18日現在

機関番号：82606

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2015～2018

課題番号：15K08588

研究課題名(和文)患者由来ゼノグラフトと3次元初代培養を用いた抗腫瘍薬感受性予測モデルの開発

研究課題名(英文) Development of ex-vivo sensitivity test for anti-cancer drugs using 3D primary culture and patient-derived xenograft

研究代表者

向原 徹 (Mukohara, Toru)

国立研究開発法人国立がん研究センター・東病院・科長

研究者番号：80435718

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,700,000円

研究成果の概要(和文)：我々は、乳癌細胞株を用いて、2D培養下と3D培養下における抗悪性腫瘍薬の薬効を比較した。その結果、殺細胞型抗がん薬では2D培養下で感受性が高い傾向にあり、抗HER2抗体では3D培養下で感受性が高い傾向にあった。実臨床での効果を考慮すると、3D培養がより生体環境を反映している可能性が示唆された。

悪性体腔液由来癌細胞の3D培養では、混入する血液細胞や中皮細胞が問題となったが、播種する細胞数や培養液中の血清濃度を調節することで実施できた。PDX由来乳癌細胞の3D培養では、脂肪幹細胞との共培養が癌細胞の増殖を増強すること、その作用には脂肪幹細胞由来のadipsinが関与することを見出した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

不確実な抗悪性腫瘍薬の効果を体外で事前に評価し、がん薬物療法の確実性を増すための技術開発は、過去数十年間種々試みられてきた。しかし、従来の2D培養では不正確であることは明らかであり、より生体に近いと推定される3D培養に期待が集まっている。我々の細胞株を用いた研究では、抗がん薬と分子標的薬でそれぞれ3D培養下での薬効が異なることを新たに見出し、3D培養に対する知見を深めることができた。当初の目標である、薬効試験に耐えうる3D培養技術の開発は達成できなかったが、体腔液内癌細胞の3D培養、脂肪幹細胞との3D共培養を試み、その礎を築くことができた。今後も、技術開発を推進したい。

研究成果の概要(英文)：We comparatively evaluated effects of anti-cancer drugs in 2D and 3D culture conditions using breast cancer cell lines. As a result, for cyto-toxic chemotherapeutic drugs, cells tended to be more sensitive in 2D culture than in 3D culture. On the other hand, for anti-HER2 antibody, cells are more sensitive in 3D culture. Considering efficacy in clinic, 3D culture was suggested to enhance in vivo environment.

While in 3D culture of cancer cells in malignant effusion we faced an issue of growing macrophage and mesothelial cells, we solved it by optimizing cell number to spread and serum concentration in culture media. In a project of 3D culture of patient-derived xenograft (PDX) cells, we found that co-culture with adipose-derived stem cells (ASCs) enhanced cell growth, and the effect was mediated by adipsin secreted by ASCs.

研究分野：実験治療学

キーワード：3次元培養 PDX

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19、CK - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

- 1) がん薬物療法の臨床的効果は極めて不確実であり、効果を予測する新たな手法の開発が急務である。
- 2) 患者腫瘍の微小環境を再現できない2次元(2D)初代培養を用いた効果予測モデルは臨床応用に至らなかった。
- 3) 2D培養の欠点を補完しうるモデルとして、3次元(3D)培養技術と患者由来ゼノグラフト(patient-derived xenograft, PDX)が注目されている。

2. 研究の目的

3D初代培養とPDXを相補的に用いて、抗悪性腫瘍薬の感受性を正確に予測するシステムを開発すること

3. 研究の方法

- 1) 乳癌細胞株を用いて、各種抗悪性腫瘍薬の薬効試験を2Dおよび3D培養下に行い、生物学的、生化学的反応の相違を評価する。
- 2) 乳癌PDX腫瘍の3D初代培養を、様々な条件の腫瘍細胞調節法、培養液、共培養系で試み、薬剤スクリーニングに耐えうる3D初代培養法を標準化する。

4. 研究成果

1) 細胞株と用いたプロジェクト

3D初代培養に取り組むのに先立ち、樹立した細胞株を用いて、3D培養下と2D培養下の薬効試験を比較するプロジェクトを2つ行った。

最初のプロジェクトでは、乳癌細胞株を用いて、乳癌治療に用いられる各種殺細胞型抗がん薬の薬効試験を行った。用いた6種類の細胞株のうち、密なスフェロイド(dense spheroid, DS)を形成するものが3種類、疎なスフェロイド(loose spheroid, LS)を形成するものが3種類であった。DSを形成する細胞株では、3D培養下で2D培養下に比べてパクリタキセルによる増殖抑制効果、アポトーシス誘導効果とも弱く、LSを形成する細胞株では両培養条件間に差はみられなかった。Hypoxia probeを用いた評価では、DSでのみ低酸素状態が観察され、パクリタキセル耐性に関わっていることが示唆された。また、DSを形成するBT-549では、ki67陽性細胞が3D培養下に2D培養下よりも明らかに少なく、G0期に留まる細胞がM期で作用するパクリタキセルの効果を回避すると推測された。同じくDSを形成するBT-474では、caspase-3の発現レベルが3D培養下で2D培養下よりも低く、2D培養は好アポトーシス環境にあることが示唆された。さらに、ki67とcaspase-3の発現レベルを、PDX由来細胞の2D培養、3D培養、新鮮PDX腫瘍、PDXを提供した患者の腫瘍、と比較したところ、2D培養で最も高いki67、caspase-3レベルを示し、3D培養がよりin-vivo環境下の腫瘍の状態を反映していることが示唆された。

2つ目のプロジェクトでは、PIK3CA変異が抗HER2抗体トラスツズマブの耐性機構となるとの仮説を基に、PIK3CAの遺伝子型の異なるHER2過剰発現乳癌細胞株を用いて、トラスツズマブの効果を3D培養下と2D培養下で比較した。その結果、PIK3CA野生型細胞を3D培養したときのみ、トラスツズマブ単剤にて細胞死が確認され、生体内で観察される腫瘍縮小を反映していることが示唆された。すなわち、トラスツズマブの効果は3D培養下で2D培養下より高いことになり、殺細胞型抗がん薬でみられた傾向と逆であった。3D培養下には、接着因子等からのシグナルが2D培養下よりも弱いと推測され、細胞がHER2に強く依存することが要因として示唆され、PIK3CA遺伝子型のトラスツズマブ感受性に及ぼす影響も強くなると推測された。この所見の治療学的意義をさらに深めるため、PIK3CA変異による抗HER2剤への耐性を、PI3K経路阻害薬で克服できるかを検討した。その結果、PIK3CA変異型細胞株でのみ、PI3K経路阻害薬の上乗せ効果が観察された。

2) 悪性体腔液(胸水、腹水)からのがん細胞の3次元(3D)初代培養の試み

研究計画では、7種類の乳癌患者由来ゼノグラフト(patient-derived xenograft, PDX)を用いて、3次元(3D)初代培養の方法を確立する予定であった。しかし、PDX腫瘍細胞は、間質組織成分や壊死組織の混入により、安定して3D培養をすることは困難であった。患者腫瘍では、PDX腫瘍以上に癌細胞以外の成分の混入が予想されるため、腫瘍からの3D培養に取り組む前に、患者胸水、腹水(体腔液)由来の癌細胞の3D初代培養にまず取り組むこととした。3D初代培養にはSphereMax(日産化学)を用いた。

体腔液の3D培養では、当初癌細胞に加え、マクロファージや中皮細胞の増殖が観察された。中皮細胞の増殖は、3D培養プレート上に播種する細胞数を十分少なくすることで抑制できた。一方、マクロファージには足場依存性がないためか未だ増殖がみられたが、培養液中の血清濃度を10%に減じることで、ある程度抑制された。8症例の悪性体腔液から3D培養が可能であったのは、3例であり、うち継代が可能であったのは1例(甲状腺がん由来)であった。

3) PDX由来がん細胞の間質系細胞との3D共培養の試み

patient-derived xenograft (PDX)由来細胞を Nanoculture plate (Organogenix) を用いて 3D を行う中で、がん細胞単独での 3D 培養は困難であることが分かった。そこで、PDX 由来がん細胞と脂肪幹細胞との 3D 共培養試みたところ、がん細胞のみの 3D 培養に比べて、がん細胞の増殖が修飾されることを見出した。我々は、この現象を説明する分子を同定するため、がん細胞単独培養下と、脂肪幹細胞との共培養下の細胞培養液をサイトカインアレーを用いて比較し、adipsin が共培養下に脂肪幹細胞から高分泌されていることを見出した。adipsin は補体副経路において、C3a および C3b の産生に関わる分子であり、実際、共培養下の培養液中には、がん細胞単独培養下の培養液中よりも高濃度の C3a の濃度が含まれていることを確認した。さらに、adipsin を特異的阻害薬またはノックダウンを行うと、スフェロイド形成が抑制されるとともに、がん細胞表面の stem-cell marker である CD44 やケモカインである CXCL4 の発現が抑制されることを見出した。以上より、脂肪幹細胞は乳癌の微小環境において重要な構成因子であり、脂肪幹細胞が分泌する adipsin はがん細胞の増殖や幹細胞様形質の維持に関わっていることが示唆された。さらに、adipsin 阻害薬により、脂肪幹細胞による in vivo、in vitro (3D) 腫瘍形成性の促進が解除されることを示し、治療学的意義を確認した。

5 . 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計 3 件)

1. Goto H, Shimono Y, Funakoshi Y, Imamura Y, Toyoda M, Kiyota N, Kono S, Takao S, Mukohara T, Minami H. Adipose tissue-derived stem cells enhance human breast cancer growth and cancer stem cell-like properties through adipsin. *Oncogene* 2018, in press.
2. Tatara T, Mukohara T (corresponding), Tanaka R, Shimono Y, Funakoshi Y, Imamura Y, Toyoda M, Kiyota M, Hirai M, Kakeji Y, Minami H. 3D culture better represents apoptosis induced by trastuzumab than 2D monolayer culture. *Anticancer Res* 2018;38:2831-2839.
3. Imamura Y, Mukohara T (corresponding), Shimono Y, Funakoshi Y, Chayahara N, Toyoda M, Kiyota N, Takao S, Kono S, Nakatsura T, Minami H. Comparison of 2D- and 3D-culture models as drug-testing platform in breast cancer. *Oncology Rep* 2015;33(4):1837-1843.

〔学会発表〕(計 3 件)

1. Tatara T, Mukohara T, Tanaka R, Shimono Y, Toyoda M, Kiyota N, Hirai M, Kakeji Y, Minami H. 3D culture may better represent trastuzumab resistance associated with PIK3CA mutation than 2D culture. *AACR* 2017.
2. Mukohara T, Tanaka R, Imamura Y, Nakagawa T, Yamamoto K, Chayahara N, Toyoda M, Kiyota N, Hirai M, Minami H. Comparison of 2D- and 3D-cultures in in vitro evaluation of trastuzumab in HER2-overexpressing breast cancer cell lines. *JSMO* 2016.
3. Imamura Y, Mukohara T, Minami H. Comparison of 2D- and 3D-culture models as drug-testing platform in breast cancer. *AACR* 2015.

〔図書〕(計 0 件)

〔産業財産権〕

出願状況 (計 0 件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
出願年：
国内外の別：

取得状況 (計 0 件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
取得年：
国内外の別：

〔その他〕
ホームページ等

6. 研究組織

(1) 研究分担者

研究分担者氏名：
ローマ字氏名：
所属研究機関名：
部局名：
職名：
研究者番号（8桁）：

(2) 研究協力者

研究協力者氏名：下野洋平
ローマ字氏名：Yohei Shimono

科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属されます。