

令和元年6月26日現在

機関番号：22701

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2016～2018

課題番号：16K09286

研究課題名(和文) 胃癌個別化医療実現のための3次元腫瘍バンクの構築

研究課題名(英文) Three-dimensional tumor bank for gastric cancer personalized medicine

研究代表者

田村 寿英 (Tamura, Toshihide)

横浜市立大学・医学研究科・共同研究員

研究者番号：70760065

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)：ヒト非癌胃粘膜での3次元初代培養(以下3D-PC)・継代、凍結保存後の再培養を確認した。作成した3D-PCは免疫・蛍光免疫染色で、胃形質を有することを確認した。ヒト癌胃粘膜で同手法の3D-PCを行ったが、(1)正常胃由来に比べ培養成功率が低い、(2)3D-PCが癌由来か判定する必要がある、(3)進行胃癌での3D-PCの対象症例が少ない、という問題が明らかとなった。

ヒト胃粘膜由来3D-PCから必要用のRNAを回収し、阻害薬を利用した薬剤スクリーニングで解析可能であった。また胃癌バンク組織を用いた次世代シーケンサーでの網羅的遺伝子・胃癌ドライバー変異の検索から、解析に必要なDNA量を検討した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

癌組織を用いた3次元初代培養は正常胃由来の3次元初代培養より培養に時間を有することが報告されており、多くの場合癌以外の正常胃由来の組織も培養系に入ってしまうと想定され、その場合は正常胃由来の3次元初代培養が主体となってしまう。培養した状態のまま癌由来の3次元初代培養であることを確認することは難しいため、この点の解決が3次元腫瘍バンクを胃癌個別化医療に活用する場合の課題であることが明らかとなった。

研究成果の概要(英文)： We confirmed three-dimensional primary culture, passage, and re-culture after cryopreservation using human gastric mucosa. The three-dimensional primary culture had gastric character by immunostaining and fluorescent immunostaining analysis. And we tried three-dimensional primary culture using human gastric cancer tissue. However, there are problems using human gastric cancer tissue compared to gastric mucosa: (1) low success rate of three-dimensional primary culture, (2) needs for confirm origin whether cancer or normal, (3) there are many early gastric cancer ESD cases, but advanced gastric cancer cases applicable for three-dimensional primary culture are limited.

RNA collected from three-dimensional primary culture was adoptable for drug screening analysis with inhibitor. And to investigate the required DNA amount, we performed next-generation sequencer analysis for comprehensive gene search and gastric cancer driver mutation search using gastric cancer tissue bank.

研究分野：消化器内科学

キーワード：胃癌 腫瘍バンク

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

1. 研究開始当初の背景

胃癌は本邦において罹患率・死亡率とも上位を占めるきわめて予後不良な悪性腫瘍である。内視鏡治療、外科治療、および抗癌剤による化学療法への進歩は著しいがその発癌機序にはいまだ不明な点が多く、また根治に至る有効な抗がん剤の誕生には至っていない。近年、次世代シーケンサーの登場で胃癌の発生機序が体系化され、生物学的製剤や抗がん剤として臨床応用されてきたが、ヒト胃癌を再現できるマウスモデルはない。

2. 研究の目的

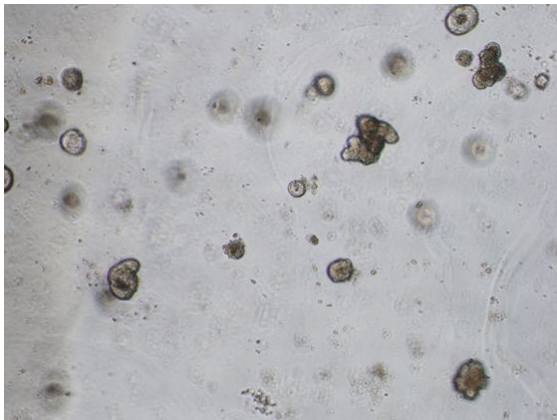
根治に至る抗がん剤の開発や選定を本研究の最終目標とし、その基本となる胃癌の発癌機序を明らかにするため、我々は本学バイオバンクなど利用可能な臨床検体から腫瘍細胞を3次元初代培養・バンク化し、従来型のマウス発癌モデルと融合させ胃癌の腫瘍・宿主因子を明らかにし、胃がん診療のトータルスクリーニングシステムを確立する。

3. 研究の方法

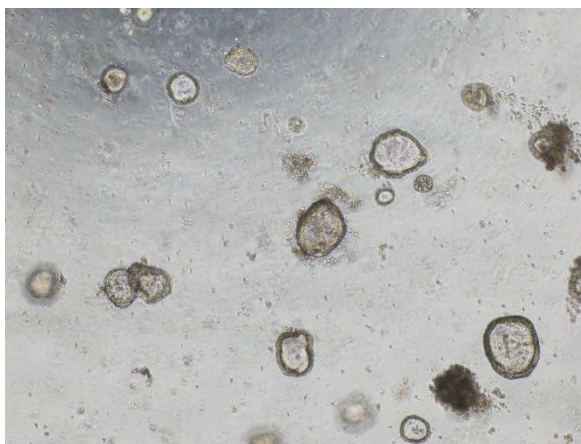
- (1)ヒトの非癌胃粘膜を用いて3次元初代培養を行った。
- (2)(1)の確立後に癌胃粘膜を用いて3次元初代培養の培養方法の検討を行った。
- (3)ヒトの非癌胃粘膜を用いた3次元初代培養を用いて阻害薬を利用した薬剤スクリーニング解析を行った。
- (4)胃癌バンク組織を用いた網羅的遺伝子検索・胃癌ドライバー変異の分子生物学的検索について次世代シーケンサーを用いて行った。

4. 研究成果

- (1)3次元初代培養・継代、凍結後の再培養を確認できた。ヒト胃粘膜3次元初代培養は病理学的な免疫染色、蛍光免疫染色で評価を行い、胃の形質を有することを確認した。



(図1: ヒト胃粘膜3次元初代培養)



(図2: 継代後のヒト胃粘膜3次元培養)

- (2)正常胃由来に比べて癌胃粘膜由来では培養の成功率が低かった。各種培養条件の検討を行ったが、癌胃粘膜由来の最適な培養条件を決定するまでには至らなかった。癌胃粘膜を用いて培養を行った場合でも、正常胃組織が混入してしまうため、作成された3次元初代培養が癌由来であるのか正常胃由来であるかを判定する必要があるが、培養を継続したまま確認する方法は確

立できず、課題となった。早期胃癌 ESD 症例が多く、進行胃癌での 3 次元初代培養の対象症例が少なく、バンク構築が予定通り進まなかった。

(3) ヒト胃粘膜由来 3 次元初代培養から必要量の RNA を回収し、阻害薬を利用した薬剤スクリーニングが解析可能であった。癌胃粘膜由来 3 次元初代培養を用いた同様な系の確立が課題として残った。

(4) 解析に必要な組織量、DNA 量の検討を行うことができた。癌以外の組織の混入を減らすことが重要であり、癌由来の 3 次元初代培養と正常胃由来の 3 次元初代培養の混入下では解析が難しくなり、癌由来のみを培養できる培養条件の設定が重要であることがわかった。

5 . 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計 1 件)

Wataru Shibata, Soichiro Sue, Sachiko Tsumura, Yasuaki Ishii, Takeshi Sato, Eri Kameta, Makoto Sugimori, Hiroaki Yamada, Hiroaki Kaneko, Tomohiko Sasaki, Tomohiro Ishii, Toshihide Tamura, Masaaki Kondo, Shin Maeda. Helicobacter-induced gastric inflammation alters the properties of gastric tissue stem/progenitor cells. BMC Gastroenterology. 2017. (査読有)

〔学会発表〕(計 1 件)

Shibata W, Tsumura S, Sue S, Sato T, Kameta E, Sugimori M, Ishii Y, Yamada H, Kaneko H, Sasaki T, Ishii T, Tamura T, Kirikoshi H, Kondo M, Maeda S. Targeting DNA sequencing for advanced gastric carcinoma using next generation sequencing. 第 89 回 日本胃癌学会総会 oral presentation, 2017.

〔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：芝田 渉

ローマ字氏名：Shibata Wataru

所属研究機関名：横浜市立大学

部局名：先端医科学研究センター

職名：准教授

研究者番号 (8 桁)：00435819

研究分担者氏名：前田 慎
ローマ字氏名：Maeda Shin
所属研究機関名：横浜市立大学
部局名：医学研究科
職名：教授
研究者番号（8桁）：40415956

(2)研究協力者
なし

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。