

令和 2 年 5 月 27 日現在

機関番号：84409

研究種目：基盤研究(C)（一般）

研究期間：2017～2019

課題番号：17K10572

研究課題名（和文）in vitroがん組織モデルによる個別化治療を目指した探索研究

研究課題名（英文）patient-derived in vitro cancer model for personalized medicine

研究代表者

三吉 範克（Miyoshi, Norikatsu）

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）・その他部局等・がん医療創生部プロジェクトリーダー

研究者番号：20528624

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,600,000円

研究成果の概要（和文）：in vitroがん組織モデルについて様々ながん腫へ適応をひろげて検討を行った。胃がん、膵がん、大腸がん、乳がん、小児腫瘍について検討した。個々の臓器に由来する環境因子を加味した培養方法の検討を行い、樹立効率を評価した。培養細胞は免疫不全マウスへの移植モデルも検討した。樹立したin vitroがんモデルは増殖能にはばつきがあるが、形態学的に、また遺伝子発現解析結果からも元の腫瘍の性質を反映しているものと考えられた。このモデルは薬剤等の治療効果をex vivoで検討できるツールとなりうることを示された。in vitroの結果を個々の患者の治療薬選択や開発につなげることができると期待される。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本モデルの特徴である、安定的に継代、増殖を保つ細胞を維持することが可能となった。培養細胞として薬剤感受性試験結果について再現性を持って行うことができ、臨床での抗がん剤の治療効果と比較検討することで、ex vivoでその治療効果を予測するモデルとして臨床応用が期待できるものとする。さらに症例を蓄積して統計学的に効果予測式を構築することができれば、in vitroの結果を個々の患者の治療薬選択につなげることができると考える。

研究成果の概要（英文）：Primary culture of cancer cells derived from patients' tumors can provide crucial information as each "individual tumor." The primary culture method of clinical cancer has not been clearly optimized in gastrointestinal cancers. We have developed a simple 2D/3D-culture method for primary cancer. We obtained clinical samples from surgically resected tumors. They were mechanically and enzymatically digested, followed by in vitro culture system. These primary cultured cancer cells were transplanted into the subcutaneous tissue of immune deficient mice, and the tumor growth and pathological examination were evaluated. The morphology and gene expression were similar to each parental clinical tumor. Multi-drug sensitivity assay including commonly used anti-cancer/molecular target drugs was performed. We examined in several types of tumors such as breast, gastric, colorectal, pancreatic cancers, etc. The primary cultured cancer cells lead to the personalized medicine.

研究分野：消化器癌

キーワード：消化器癌 悪性腫瘍 培養細胞 癌治療

様式 C-19、F-19-1、Z-19（共通）

1. 研究開始当初の背景

根本的ながん治療を目指す場合、個々の患者の「がん組織」に応じた治療薬の適切な選択が望まれる。しかし、現在研究分野で標準的に用いられているのは固定された臨床の組織検体もしくは細胞株と呼ばれる増殖能を獲得した比較的均一ながん細胞集団である。この実臨床と基礎研究との乖離は、対象とするマテリアルの違いによるものと考えられることから、実際の個体内におけるがんのミニチュアモデルとなるような多様性をもつ生きたがん組織を用いることができないかと考えた。このがんのミニチュアモデル（=in vitro がん組織モデル）となりえるものとして、臨床のがん組織に近い性質を保持している可能性の高い初代培養細胞が挙げられる。初代培養は技術的に困難で、古くから取り組まれているにもかかわらず、未だに臨床応用されるような確立された方法がないのが現状である。がん種に限れば大腸がんについては、近年、オルガノイドや3次元培養での初期培養成功率が比較的高いという報告があるが、その手技は煩雑であること、高価な試薬を用いること、解析などが可能な程度まで細胞を増殖させることが比較的困難であること、再現性などの問題が挙げられる。細胞を継代して安定的に増殖させることができなければ、実際に解析などを行うことが難しく、また多種多様な腫瘍に適応するためには、尚、改善および改良の余地があると考えられる。

われわれはこれまでに上記の課題を克服すべく、より簡便で再現性のある手技で、初代培養法を確立することを目的とし研究を行ってきた。申請者のこれまでの幹細胞に関する研究とその結果から、組織の培養環境と niche について考察を行ってきた。本手法を用いることで従来の細胞株とは異なり、臨床と非常に近い形態の生きたがん組織を得ることが可能であったことから、これを in vitro がん細胞モデルとして解析をすすめてきた。

2. 研究の目的

本研究では、がん細胞の初代培養として、様々ながん種（胃がん、膵がん、大腸がん、小児腫瘍等）へ応用可能な in vitro 培養モデルの樹立方法について検討する。さらにこの in vitro がん細胞を解析することで、元のがん組織との類似性や相違、治療薬剤に対する感受性について評価を行った。

3. 研究の方法

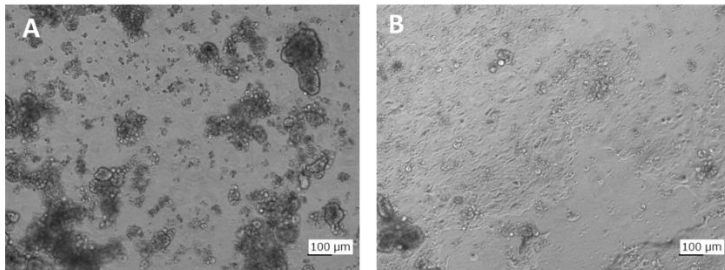
食道がん、胃がん、肝がん、膵がん、乳がん、肺がん、腎がん、精巣腫瘍、卵巣腫瘍、肉腫などについて培養方法の検討を行った。その際に個々の臓器に由来する niche について培養液の組成について検討した。培養された細胞について樹立効率を評価し、形態学的観察を行うため免疫不全マウスへの移植を行い、組織学的評価を行った。

手術時の切除検体からがん組織を採取し、洗浄とコラゲナーゼ等を用いて細胞を分離させた後、フィルターを用いて細胞集塊を回収、培養プレートに接着させる方法で維持・継代した。これらの細胞の内、2継代を超えて培養できたものを樹立された初代培養がん細胞として、遺伝子変異解析（Bridged Nucleic Acid 遺伝子変異検出、理研ジェネシス）、網羅的発現

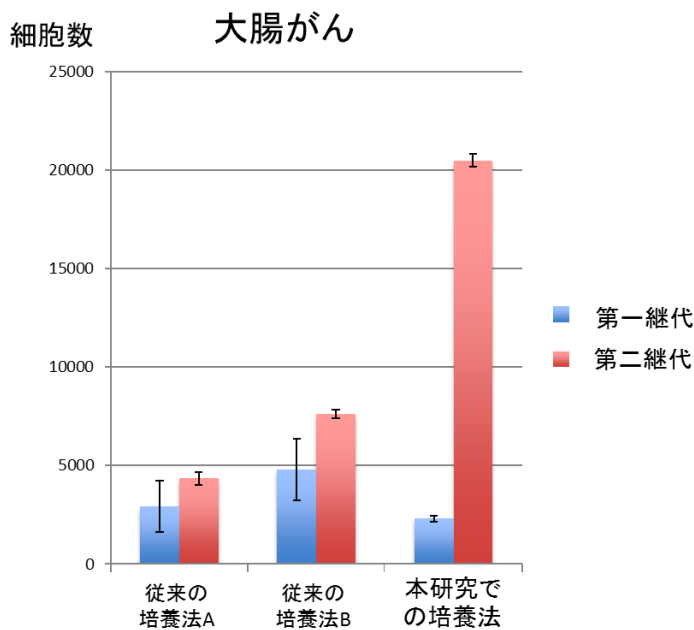
解析（マイクロアレイ解析、Agilent SurePrint G3 Human GE）等を用いて元の臨床検体との相違、in vitro がん組織モデル自体の評価を行った。さらに、培養細胞の薬剤感受性（5-FU、CPT-11、L-OHP）について検討し、臨床での治療薬に対する効果と比較検討した。

4. 研究成果

大腸がん、乳がん、肺がんと比較して、食道がん、胃がん、膵がん、肝がん（肝細胞癌）、小児腫瘍では、初代培養の樹立が困難であった。これらの中で安定的に大腸がんについては8割以上の樹立効率を認めたことから、大腸がんの初代培養について in vitro でがん細胞を安定的に培養する培養液の組成等に関する検討を行うこととした。元々のがん組織とがん細胞株のマイクロアレイの解析結果から、腫瘍臓器に特異的な因子および腫瘍組織に由来する環境因子を加味した培養方法の検討を行い、培養したがん細胞の樹立効率を評価した。がん種によってばらつきが大きいですが、3-8割程度の樹立効率を得ることができた。この培養モデル（in vitro がん組織モデル）は増殖能にばらつきがあることも明らかとなった。



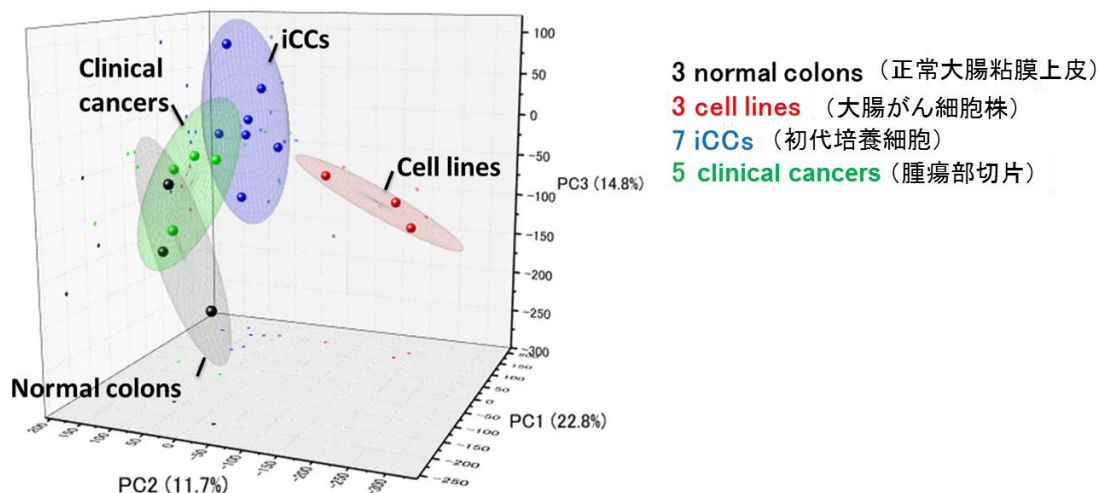
培養組成に改良を加えることで従来の培養方法では樹立が困難であったがん細胞(A)のin vitroでの培養が可能となった(B)。



培養経過中の細胞数の変化について検討したところ、第二継代目の時点で増殖速度の低下を著しく認めるものがあることが多いことが明らかとなった。そこで培養組成に添加する増殖因子

について、第一継代および第二継代目の細胞数を指標に評価した。これまでに検討されている培養方法と比較して、培養プレートをマトリゲル（BD Bioscience）でコーティングして、メディアウムに TGF- β 等を添加することで、培養細胞の安定した増殖を認めた。

主成分解析の結果



安定的に培養できるようになった大腸がん初代培養細胞について、網羅的発現解析を行い、正常大腸粘膜上皮、細胞株、手術時の腫瘍部切片における遺伝子発現と比較検討した。主成分解析の結果から、初代培養がん細胞は細胞株とも異なる発現パターンを示すことが明らかとなった。手術時の組織についてはがん組織（組織片）と正常組織（正常大腸粘膜上皮）については遺伝子発現パターンの重なる部分を認めていたが、初代培養がん細胞については正常組織や細胞株とは発現パターンが異なること、一方でがん組織とは発現パターンの重なる部分のあることが確認できた。

初代培養がん細胞は手術時の切除検体から採取して in vitro で樹立していることから、その形態学的変化を比較するため、培養細胞を免疫不全マウス（NOD/SCID）の皮下へ移植して観察した。免疫不全マウスに移植した初代培養がん細胞（ 1×10^6 個）は4週ほどで腫瘤を形成し、これをホルマリン固定後にパラフィン切片を作製、ヘマトキシリンエオジン染色で形態を観察したところ、組織学的に元の腫瘍と類似していることが示された。また遺伝子発現解析を行い元の腫瘍と類似した発現パターンを示していることも示された。臨床で第一選択レジメンの化学療法（5-FU、CPT-11、L-OHP）を選択した症例について、がん組織を採取し、樹立した初代培養がん細胞を用いて薬剤感受性の評価を行った。これらの初代培養がん細胞の薬剤感受性については in vitro における薬剤暴露後の細胞の生存率を用いることで評価した。プレートに初代培養がん細胞を播種し48時間定着させ、その後対象となる薬剤を暴露した後、72時間経過した時点の細胞の生存率を評価した。がん細胞の各薬剤に対する反応と臨床での同薬剤に対する反応を比較したところ、7-8割の一致率を認めた。また、実臨床で用いることは困難であるが治療薬

候補となりうる低分子化合物等についても検討したところ、同じがん種の細胞株では効果を認めないものの、初代培養がん細胞では増殖抑制効果を認めるものが少なからず存在したことから、既存のがん細胞株を用いることでは見いだせなかった新たな治療薬候補の探索が可能になるのではないかと考えられた。

本研究におけるがん細胞モデルは薬剤等の治療効果を *ex vivo* で検討できるツールとなりうると考えられた。*in vitro* の結果と臨床での治療効果を比較検討することで、個々の患者の治療薬選択や、新規治療薬開発につなげることもできると期待される。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計6件（うち査読付論文 5件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 2件）

1. 著者名 Fujino S, Ito A, Ohue M, Yasui M, Mizusima T, Doki Y, Mori M, Miyoshi N	4. 巻 -
2. 論文標題 Phenotypic heterogeneity of 2D organoid reflects clinical tumor characteristics	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Biochem Biophys Res Commun	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） なし	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -

1. 著者名 Wada Y, Miyoshi N, Fujino S, Ohue M, Yasui M, Takahashi Y, Takahashi H, Nishimura J, Takenaka Y, Saso K, Tomokuni A, Sugimura K, Akita H, Takahashi H, Kobayashi S, Omori T, Miyata H, Yano M.	4. 巻 -
2. 論文標題 New marking method involving a light-emitting diode and power source device to localize gastrointestinal cancer in laparoscopic surgery	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Sci Rep	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） なし	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -

1. 著者名 Miyoshi N, Fujino S, Ohue M, Yasui M, Takahashi Y, Sugimura K, Tomokuni A, Akita H, Kobayashi S, Takahashi H, Omori T, Miyata H, Yano M.	4. 巻 48
2. 論文標題 The POU5F1 gene expression in colorectal cancer: a novel prognostic marker	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Surg Today	6. 最初と最後の頁 709-715
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） なし	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Fujino S, Miyoshi N	4. 巻 -
2. 論文標題 Oct4 gene expression in primary colorectal cancer promotes liver metastasis	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Stem Cell Int	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） なし	査読の有無 無
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Fujino S., Miyoshi N., Ohue M., Takahashi Y., Yasui, M., Hata T., Matsuda C., Mizushima T., Doki Y., Mori M.	4. 巻 39
2. 論文標題 Platelet-derived growth factor receptor-beta gene expression relates to recurrence in colorectal cancer	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Oncology Reports	6. 最初と最後の頁 2178-2184
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3892/or.2018.6290	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Miyoshi N., Fujino S., Ohue M., Yasui M., Takahashi Y., Sugimura K., Tomokuni A., Akita H., Kobayashi S., Takahashi H., Omori T., Miyata H., Yano M.	4. 巻 in press
2. 論文標題 The POU5F1 gene expression in colorectal cancer: a novel prognostic marker	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Surgery Today	6. 最初と最後の頁 in press
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1007/s00595-018-1644-9	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

[学会発表] 計6件 (うち招待講演 0件 / うち国際学会 2件)

1. 発表者名 三吉範克
2. 発表標題 新しい初代培養と治療感受性予測
3. 学会等名 第77回日本癌学会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 三吉範克
2. 発表標題 大腸がんにおけるPOU5F1発現の意義と予後についての検討
3. 学会等名 第17回日本再生医療学会総会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 三吉範克
2. 発表標題 外科手術における間葉系細胞を用いた再生医療
3. 学会等名 第118回日本外科学会定期学術集会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 Norikatsu Miyoshi
2. 発表標題 Colorectal cancer stem cell expressing POU5F1 promotes liver metastasis
3. 学会等名 AACR (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 三吉範克
2. 発表標題 大腸がんにおけるPOU5F1遺伝子の発現と予後についての検討
3. 学会等名 日本再生医療学会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 Norikatsu Miyoshi
2. 発表標題 PDFGR-beta gene expression relates to recurrence in colorectal cancer
3. 学会等名 ESMO Asia (国際学会)
4. 発表年 2017年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
--	---------------------------	-----------------------	----