

令和 2 年 5 月 15 日現在

機関番号：34519

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2017～2019

課題番号：17K10658

研究課題名(和文) PDXを用いた難治性大腸癌の病態解明と薬剤耐性メカニズムの解明

研究課題名(英文) Study of the mechanism of colorectal cancer and drug sensitivity using patient-derived xenograft(PDX)

研究代表者

富田 尚裕 (Tomita, Naohiro)

兵庫医科大学・医学部・教授

研究者番号：00252643

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,500,000円

研究成果の概要(和文)：大腸癌・小腸癌などの腹部悪性腫瘍患者の手術摘出検体から腫瘍組織片を採取し、ヌードマウス皮下に移植し、継代可能な患者由来ゼノグラフト(patient-derived xenograft:PDX)を樹立した。一部はそれからの細胞株も樹立した。元の患者腫瘍組織の遺伝子変化の多くはPDX腫瘍や細胞株でも維持されていた。これらを用いたin vivoあるいはin vitroの抗癌剤感受性の評価が可能であった。患者癌組織からのPDX作成は、特に大規模臨床試験の困難な小腸癌などの希少癌において、薬剤選択による個別化療法の臨床応用に非常に有用であると考えられた。

研究成果の学術的意義や社会的意義

癌研究は、手術時摘出検体の癌組織を用いて行われることが多いが、採取される組織量は限られており、継続した研究は困難である。その点、患者の癌組織から採取されてヌードマウス皮下腫瘍として継代可能な患者由来ゼノグラフト(patient-derived xenograft:PDX)は元の腫瘍組織における遺伝子変化の多くを保持しており、これを用いた抗癌剤感受性試験で患者に有効な薬剤選択を行うことが可能である。すなわち、個別化化学療法への臨床応用として極めて有用である。また小腸癌など、標準治療策定のために通常行われる大規模臨床試験が困難な希少癌腫においては、このPDXの有用性は大きいと期待される。

研究成果の概要(英文)：We established the patient-derived xenograft (PDX) by transplanting surgically-resected tumor tissue subcutaneously to the flank of nude mouse and some cell lines were also established. Most genetic alterations in the primary tumor were maintained in both PDX tumors and cell lines. By using these PDX tumors and cell lines, in vivo and in vitro analysis of drug sensitivity can be performed. In conclusion, PDX which is established from patient tumor tissue is considered to be very useful for clinical application of individual chemotherapy, especially in rare tumor such as small bowel carcinoma in which large randomized controlled trial is quite difficult.

研究分野：消化器外科学

キーワード：PDX 薬剤感受性 大腸癌 小腸癌 primary culture 抗癌剤 個別化療法 ヌードマウス

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

(1) 一般の癌研究においては手術時に摘出された検体を用いることが多いが、手術検体の組織量には限界があり、継続反復して行う研究には、それから樹立して継代使用可能な患者由来ゼノグラフト(patient-derived xenograft:PDX)や細胞株 cell line が有用である。臨床応用としては、ある癌腫の抗癌剤感受性をこれら PDX や細胞株を用いて検討することが可能であれば非常に有用であるが、そのためには、これらにおいて元の患者腫瘍組織における性質と同様の性質が維持されていることが必要条件となる。

(2) 一方、癌の標準治療法の確立には通常、多数の患者さんの協力・参加に基づく大規模な第 III 相無作為割付比較試験 (randomized controlled trial:RCT) が必要となるが、小腸癌・肉腫など比較的頻度の低い癌腫においてはこれら大規模臨床試験の実施は実際上非常に困難であり、PDX や細胞株などを用いた pre-clinical model での検証に期待がかけられる。

2. 研究の目的

大腸癌・小腸癌などの腹部悪性腫瘍患者から患者癌組織由来のゼノグラフト(PDX)および細胞株を樹立し、抗癌剤感受性を検討するための *in vivo, in vitro* の pre-clinical model としての有用性を検討する。

3. 研究の方法

(1) ヌードマウス Balb/c, nu/nu 4 週齢を以下の実験に使用した。全身麻酔下に、大腸癌などの腹部悪性腫瘍患者の手術摘出検体から採取した 5mm 片の癌組織をマウスの皮下に移植した。第 2 継代の皮下腫瘍が 10mm 以上の大きさまで増大した時に、患者由来ゼノグラフト(Patient-derived xenograft:PDX)が樹立できたと判断した。次いで PDX 腫瘍をヌードマウス皮下に移植し、5mm 大の大きさまで増大した時点で、無作為に無治療群と化学療法群の 2 群に分け、化学療法群における腫瘍増大抑制の程度から、腫瘍の抗癌剤感受性の検討を行った。腫瘍の大きさは、 $Tumor\ volume(mm^3) = a \times b^2$, a:tumor length, b:tumor width として、週 2 回測定した。

(2) 肝転移・腹膜播種を伴った進行小腸癌患者からの PDX 作成を試みた。前述の手法にて、手術摘出検体の腫瘍組織片からヌードマウス皮下腫瘍として継代可能な PDX を樹立し、それからの細胞株 cell line も樹立した。

(3) 次いで、この小腸癌 PDX について、元の患者癌組織、PDX 腫瘍および細胞株、以上 3 種における遺伝子変化の解析を行った。

4. 研究成果

(1) 大腸癌・小腸癌・直腸神経内分泌腫瘍(NET)などの腹部悪性腫瘍症例 30 例の手術摘出組織から PDX 作成を試みた結果、大腸癌 7 例、小腸癌 2 例で PDX が樹立された。うち大腸癌 2 例、小腸癌 1 例で最終的な Primary culture が可能であった。

(2) 大腸癌由来の PDX29 では oxaliplatin(OHP)+5-FU で中等度の、camptothecin(CPT)+5-FU と Triple レジメン(OHP+CPT+5-FU)では高度の皮下腫瘍増大抑制が見られた(図 1)。同じく大腸癌由来の PDX33 では CPT+5-FU で中等度の、OHP+5-FU では高度の増大抑制が見られた(図 2)。

Growth inhibition in CRC PDX29

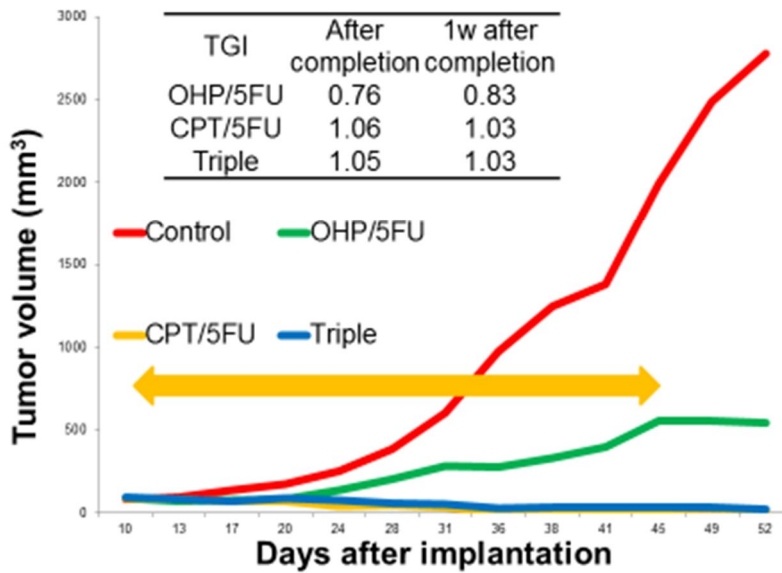


図 1、大腸癌由来の PDX29 を用いた抗癌剤感受性の検討

Growth inhibition in CRC PDX33

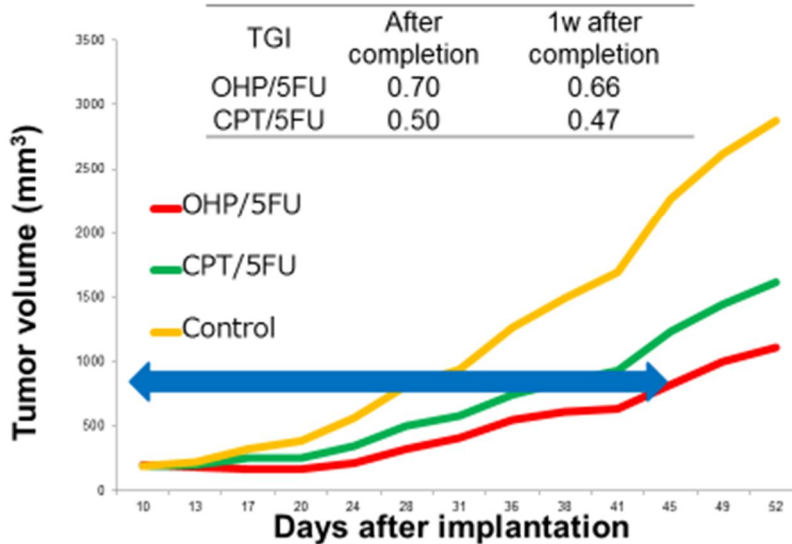


図 2、大腸癌由来の PDX33 を用いた抗癌剤感受性の検討

(3) 小腸癌 PDX 腫瘍を用いた抗癌剤感受性の検討では、5-FU 単剤で中等度の感受性がみられたが、OHP, CPT では低感受性であった。ところが、小腸癌由来の PDX26 を用いて複数の抗癌剤の組み合わせのレジメンによる感受性を検討したところ、5-FU+paclitaxel で中等度の、5-FU+OHP で高度の腫瘍増大抑制が見られ、進行大腸癌の第一選択の標準治療の一つである 5-FU+OHP 療法が小腸癌においても著効を示す可能性が示唆された (図 3)。

Growth inhibition in SBA PDX26

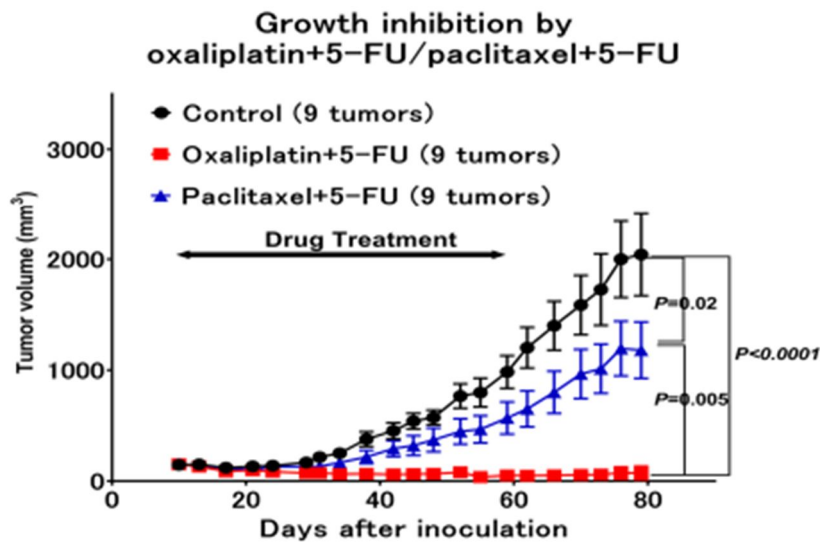


図3、小腸癌由来のPDX26を用いた抗癌剤感受性の検討

(4) この小腸癌 PDX における元の患者癌組織、PDX 腫瘍および細胞株、以上3種における遺伝子変化の解析結果では、microsatellite status, および、*TP53*, *APC*, *HRAS*, *CSF1R*, *FGFR3*, *FLT3*, *PDGFRA*, *RET* などの変異はすべてに共通して保持されていた。一方、PDX 腫瘍のみに検出される遺伝子変異も同定され、PDX として樹立される過程で獲得した遺伝子変化であることが推測された。

(5) 今回の PDX においては、遺伝子レベルで多くの遺伝子変化が元のまま保持されていることも確認されたことから、元の腫瘍の性質がかなり保持されていると考えられ、PDX 腫瘍を用いた抗癌剤感受性の検討は今後の個別化化学療法への臨床応用としての有用性が期待された。また、本 PDX モデルは、大腸癌などの比較的 popular な癌腫と共に、小腸癌などの希少癌においては特にその有用性が高いと考えられる。この PDX の癌研究における有用性は、臨床応用に向けての臨床研究のみならず、癌の病態解明に向けての基礎研究においても同様であり、PDX が今後の臨床・基礎両面での癌研究における重要な tool となることがおおいに期待される。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計1件（うち査読付論文 1件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 1件）

1. 著者名 Tomoki Yamano, Shuji Kubo, Naohiro Tomita	4. 巻 0
2. 論文標題 A patient-derived xenograft and a cell line derived from it form a useful preclinical model for small bowel adenocarcinoma	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Cancer Medicine	6. 最初と最後の頁 1-7
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1002/cam4.2986	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 -

〔学会発表〕 計6件（うち招待講演 0件/うち国際学会 1件）

1. 発表者名 山野智基, 宋智亨, 木村慶, 馬場谷彰仁, 瀨中美千子, 小林政義, 塚本潔, 野田雅史, 池田正孝, 富田尚裕
2. 発表標題 Patient derived xenograft (PDX)を用いた大腸癌併用化学療法の検討
3. 学会等名 第73回日本消化器外科学会総会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 山野智基, 宋智亨, 木村慶, 馬場谷彰仁, 瀨中美千子, 小林政義, 塚本潔, 野田雅史, 池田正孝, 富田尚裕
2. 発表標題 Patient derived xenograft (PDX)を用いた大腸癌併用化学療法の検討
3. 学会等名 第73回日本消化器外科学会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 Yamano Tomoki, Song Jihyung, Kimura Kei, Babaya Akihito, Hamanaka Michiko, Kataoka Kozo, Beppu Naohito, Noda Masafumi, Ikeda Masataka, Tomita Naohiro
2. 発表標題 A patient-derived xenograft model demonstrates the effectiveness of combined oxaliplatin and 5-fluorouracil for advanced small bowel adenocarcinoma.
3. 学会等名 American Association for Cancer Research (AACR)（国際学会）
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 山野 智基, 宋 智亨, 木村 慶, 馬場谷 彰仁, 濱中 美千子, 片岡 幸三, 別府 直仁, 野田 雅史, 内野 基, 池田 正孝, 池内 浩基, 富田 尚裕
2. 発表標題 希少がんである小腸腺癌に対する基礎研究モデルの構築
3. 学会等名 第119回日本外科学会定期学術集会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 山野 智基, 木村 慶, 馬場谷 彰仁, 濱中 美千子, 片岡 幸三, 別府 直仁, 内野 基, 池田 正孝, 池内 浩基, 富田 尚裕
2. 発表標題 当科におけるPatient derived xenograft(PDX)作成の現状と将来について
3. 学会等名 第74回日本消化器外科学会総会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 山野 智基, 久保 秀司, 小湊 智子, 木村 慶, 池田 正孝, 富田 尚裕
2. 発表標題 【転移における組織間相互作用】腹腔内へのPDX由来直腸癌細胞播種は肝・脾への遠隔転移を起こす.
3. 学会等名 第78回日本癌学会学術総会
4. 発表年 2019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
研究 分担 者	山野 智基 (Yamano Tomoki) (00599318)	兵庫医科大学・医学部・准教授 (34519)	