

令和 4 年 6 月 25 日現在

機関番号：72602

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2019～2021

課題番号：19K07723

研究課題名(和文) 体液試料からのオルガノイドによる化学療法の治療効果予測モデルの有用性

研究課題名(英文) Feasibility of organoid models established from bodily fluid for predicting chemotherapy efficacy in gastrointestinal cancer

研究代表者

大木 暁(OOKI, Akira)

公益財団法人がん研究会・有明病院 消化器化学療法科・医長

研究者番号：50348546

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,400,000円

研究成果の概要(和文)：高度腹水の患者において症状緩和目的に施行した除去腹水から、オルガノイドが樹立できることを確認した。一方、高度腹水の患者は化学療法の適応でない症例が多いためオルガノイドでの治療効果と実臨床での有効性との一貫性の評価が困難であった。血液試料からのがん細胞の濃縮・回収のために細胞径が異なるフィルターを使用した樹立が困難であった。全血から不要な血球細胞を除去するために、CD45を認識する複合体を形成させ、比重液上で遠心する事により、血球の除去後に培養を行ったが、やはりオルガノイドの樹立が困難であった。非侵襲的な分離精度の技術的向上が必要である。

研究成果の学術的意義や社会的意義

最小機能単位であるオルガノイドは腫瘍本体の形態・形質・機能を模倣することから研究の応用範囲は多岐にわたり注目されている。オルガノイド樹立のためには組織生検を使用することが一般であるが、侵襲を伴い生検困難な例も少なくない。そのため低侵襲的な方法でオルガノイドを樹立することは臨床的・研究的観点からも意義が大きい。本研究は腹膜播種による腹水からオルガノイド樹立が可能であることを証明したことは大変有意義であると思われる。一方、血液試料からは樹立が困難であったことから、さらなる技術的改良が必要である。

研究成果の概要(英文)：Organoids was established from the ascites removed for the purpose of symptom relief in patients with severe ascites. Since many patients with severe ascites are not indicated for chemotherapy, it was difficult to evaluate the consistency between the therapeutic effect of organoids and the efficacy in clinical practice. Filtration method was performed for selection of circulating tumor cells based on the different size, but it was difficult to establish organoids because of containing many hematopoietic cells. In order to remove hematopoietic cells from whole blood, negative selection depletion method was performed to enrich circulating tumor cells using antibodies that recognizes hematopoietic cells such as CD45 and subsequent density gradient centrifugation. However, it was still difficult to establish organoids. There is a need for technical improvements in non-invasive separation accuracy.

研究分野：がん幹細胞

キーワード：がん幹細胞 オルガノイド 消化器癌

## 1. 研究開始当初の背景

切除不能な進行消化器がんにおいて、分子標的治療薬を含め新薬が導入されており、予後は確実に延長しているが、治癒は困難である。現在、治療効果を予測できる薬剤はわずかであり、抗がん剤においては皆無である。実際に投与をして効果を評価するしかないのが現状であるが、治療効果がないにも関わらず有害事象出現や医療経済的負担のリスクが伴う。そのため、効果が期待できる薬剤を適切に提供するための個別化治療の開発が急務である。一般に抗がん剤は細胞周期に作用することで殺細胞効果を発揮するが、がん細胞集団にわずかに存在している“がん幹細胞”は薬剤排出・解毒活性が高く、休眠状態を呈することで抗がん剤治療に抵抗性を示すことが報告されている。さらに、自己複製能、腫瘍形成能および分化能を有するがん幹細胞は、再発および転移の原動力としても働くため、幹細胞性 (stemness) の維持に必要なメカニズムを解明することが、がん治療戦略の開発のために重要であることを私たちは明らかにしてきた。

個々の患者における癌の遺伝的/表現的特徴を模倣したモデルとして、**patient-derived xenograft (PDX)**があり、治療効果予測モデルとしての有用性が報告されている。しかし、患者の癌組織をマウスに移植するため、手技が煩雑で高価であり腫瘍が形成されるまでに時間を要するため実臨床における化学療法の感受性モデルとしては実用的ではない。最近、これらの弱点を補う新たな治療効果予測モデルとして 3 次元培養組織(オルガノイド)の有用性が報告されている。オルガノイドは患者のがん幹細胞を三次元培養することによって樹立されるため、比較的安易・安価であり、オリジナルの腫瘍の機能的・遺伝的形質を再現するため、腫瘍の遺伝子・RNA・蛋白の解析への応用が報告されている。さらに、その特徴から薬剤スクリーニングのモデルとしても注目されている。臨床応用における問題点としては、オルガノイドは主に原発巣からの生検組織や手術検体を使用して樹立されていることが多く、原発巣が切除後の異時性転移に対しては転移巣からの生検が必要になるが、部位によっては生検困難なことが少なくない点である。さらに、治療に伴いがん細胞の獲得遺伝子変異やシグナル依存性の変化が起るため、治療の各プロセスで生検を行う必要がある。そのため、低侵襲な方法でがん細胞を採取しオルガノイドを樹立することも重要である。血液や腹水などの体液試料を使った **liquid biopsy** が低侵襲な方法として注目されているが、腫瘍の遺伝子、マイクロ RNA、蛋白等の情報を得ることが主な目的であるため、採取したがん細胞からのオルガノイド樹立の報告はわずかしかない。低侵襲な方法で樹立したオルガノイドモデルは個々の患者に適切な遺伝情報および治療を提供することが可能になるため実臨床において非常に有益である。

## 2. 研究の目的

がん幹細胞は 3 次元培養にて最小機能単位であるオルガノイドを形成し、腫瘍本体の形態・形質を模倣することから化学療法の効果予測の可能性が報告されている。本研究の目的は、患者から低侵襲で採取可能である体液試料(腹水、血液)を使用してオルガノイドの樹立がどの程度可能であるか、および樹立したオルガノイドが個々の患者の治療効果予測モデルとなりうるかを明らかにすることである。

## 3. 研究の方法

消化器癌において腹膜播種は主な転移形式のひとつであり、高度腹水による腹部膨満感および経口摂取困難をもたらし QOL を著しく低下させる。症状緩和目的に腹水除去が行われるが、症状の改善は一時的である。化学療法が奏効することにより、腹水除去後の腹水再貯留が抑制維持される可能性があるが、奏効しなかった際は状態のさらなる悪化に伴い、化学療法への忍容性が低下するリスクがある。そのため、より奏効が期待できる化学療法を選択することが重要である。本研究では高度腹水による腹部膨満感に対し症状緩和目的に腹水除去を行う患者を対象にしており、除去腹水に含まれるがん細胞を使用するため、新たに患者に侵襲を加えることはない。がん幹細胞は腫瘍形成能を有しており、腹水中のがん細胞は幹細胞様の形質を豊富に有することが報告されている。オルガノイドは幹細胞の分化に伴い形成されることから、癌性腹水に含まれるがん細胞からのオルガノイド樹立は可能と思われるため、本研究では最初に癌性腹水の患者を対象に行う予定である。一方、腹水からのオルガノイドは対象が限定的であるため、オルガノイド樹立および化学療法の治療効果予測モデルとしての有用性を確認した後に、低侵襲でほとんどの消化器がん患者が対象になりうる血液試料を使って同様の研究を行う予定である。本研究では、研究計画に添付された同意・説明文書による同意を得た症例を対象とし、匿名化を行ない、使用する。研究代表者である大木暁および研究協力者であるがん研究会有明病院・消化器化学療法科医師にて、患者に本研究の説明後、書面によるインフォームド・コンセントを取得

し、また、協力患者の診療情報を収集する。併せて患者の体液試料を収集する。採取した検体は、 $-80^{\circ}\text{C}$ 凍結保管する。

### 3 次元培養組織の樹立及び細胞障害性試験

採取した腹水を遠心し、回収した viable な single cells をマトリゲルとオルガノイド特異的な培養液 (WENR・WENR-AS 培地) を使用して 3 次元培養を行い、継代可能な培養組織が得られた場合は、凍結保存を行う。in vitro 細胞障害性試験では、96 well plate で樹立したオルガノイドに該当患者に実臨床で使用予定の抗がん剤を様々な濃度で治療を行い、50%阻害濃度を測定する。最終的には実臨床での治療効果と比較して効果予測モデルとしての有用性を検証する。血液試料からオルガノイドを樹立するためには循環腫瘍細胞 (circulating tumor cells, CTCs) を分離する必要がある。一般に、上皮細胞接着分子 (Epithelial cell adhesion molecule: EpCAM) に基づく同定法が用いられているが、上皮間葉転換や間葉系由来のがん細胞からの CTCs は検出できない点および生きた腫瘍細胞の採取の問題点がある。最近、細胞径が異なる点を利用して CTCs を濃縮するための微小フィルター法が注目されている。共同研究者は、現在特許申請中である CTCs を濃縮および回収しやすくしたフィルターを開発しており、本研究ではこのフィルターを使用する。また、別の CTCs isolation アプローチ法として全血から CD45 陽性細胞を除去する事で CTCs を濃縮するために RosetteSep™ Human CD45 Depletion Cocktail を使用する。さらに、オルガノイド特異的な培養では正常細胞は腫瘍細胞よりオルガノイド樹立が困難である点を利用することにより、濃縮された CTCs でのオルガノイドの樹立を目指す。

## 4. 研究成果

腹膜播種による高度腹水を伴う患者において症状緩和目的に施行した除去腹水を使用して WENR・WENR-AS 培地で培養を行った。腹水細胞診陰性症例 (2 例) ではオルガノイド樹立不可であったが、細胞診陽性の腹水 (3 例) からはオルガノイドが樹立できた。一方、高度腹水の患者は全身状態が低下しており化学療法の適応でない症例が多かったためオルガノイドでの治療効果と実臨床での有効性との一貫性の評価が困難であった。このように腹水からのオルガノイドモデルは樹立が可能であることを確認できたが、実用面での問題が残った。そのため血液試料からオルガノイドの樹立が必要と考えた。血液試料からオルガノイドを樹立するためには循環腫瘍細胞を分離する必要がある。血行性転移を有する消化器がん患者の血液試料からのがん細胞の濃縮・回収のためにフィルトレーション法として共同研究者が特許申請中である細胞径が異なるフィルターを使用した。回収した細胞を WENR・WENR-AS 培地で培養を何度か行ったが樹立が困難であった。血球細胞が多数回収されることが原因の一つであることが考えられたため、全血から血球細胞を除去するために、CD45、CD66b、glycophorin A を認識する複合体を形成させ、比重液上で遠心する事により、白血球および赤血球の除去をおこなった後に同培地で培養を行ったが、やはりオルガノイドの樹立が困難であった。

血液試料からオルガノイドが樹立できなかった原因としては、循環中の腫瘍細胞自体が少ないことが考えられる。さらに anoikis により生細胞での分離の問題も残る。そのため血液中からがん細胞のみを取りこぼし無く、かつ、血球の混在無く精製するための非侵襲的な分離精度の技術的向上が必要である。数的な稀少な循環腫瘍細胞の分離後の増殖のための培養方法のさらなる検討も行う必要がある。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計0件

〔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	芝 清隆  (SHIBA Kiyotaka)  (40196415)	公益財団法人がん研究会・がん研究所 蛋白創製研究部・部長   (72602)	
研究分担者	八尾 良司  (YAO Ryoji)  (80291095)	公益財団法人がん研究会・がん研究所 細胞生物部・部長   (72602)	

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関