

令和 4 年 5 月 24 日現在

機関番号：24303

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2019～2021

課題番号：19K08753

研究課題名(和文) 乳房外パジェット病の病態解明および新規治療法の開発

研究課題名(英文) Establishment of novel treatment for extramammary Paget disease

研究代表者

浅井 純 (Asai, Jun)

京都府立医科大学・医学(系)研究科(研究院)・講師

研究者番号：50438222

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)：乳房外パジェット病13症例よりがんオルガノイドの分離を試み、5例でがんオルガノイドの分離に成功した。このうちの2例では作成された担がんマウスより摘出した腫瘍組織を用いてがんオルガノイドを再度分離することに成功し、マウスを用いて継代することが可能であった。がんオルガノイドの至適培養条件を検討した結果、Heregulin-1を培地に添加するとがんオルガノイドの増生が促進されることが判明した。継代に成功した2例のがんオルガノイドを用いて抗がん剤を用いた薬剤感受性試験を行った。2例のうち片方ではドセタキセルに対する感受性を認めたが、もう片方ではドセタキセルによる増殖抑制効果はわずかであった。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究において、世界で初めて乳房外パジェット病からのがんオルガノイドの分離、継代に成功した。本研究により樹立されたがんオルガノイドを用いることで、乳房外パジェット病の病態解明や新たな治療開発の足がかりとなることが期待される。

研究成果の概要(英文)：CTOSs were successfully prepared from 3 primary lesions and 2 metastatic lymph nodes. Of these, 2 CTOSs (EMPD-3 and EMPD-4) could be maintained and passaged long term ex vivo. Following transplantation of CTOSs to NOD/Scid mice, CTOS-derived xenotumors exhibited ductal formation, indicating that CTOSs retained the original tumor characteristics. Chemo-sensitivity assays revealed that docetaxel significantly inhibited EMPD-3 growth in a dose-dependent manner, whereas EMPD-4 was not clearly inhibited. These findings indicate the heterogeneity of EMPD and potential use of chemosensitivity assays with patient-derived CTOS to select the most effective drugs for each patient.

To our knowledge, this study represents the first establishment of an ex vivo-EMPD disease model involving conventional cell lines. EMPD CTOSs might be useful for developing new therapeutic strategies.

研究分野：皮膚腫瘍学

キーワード：乳房外パジェット病 がんオルガノイド

## 様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

### 1. 研究開始当初の背景

乳房外パジェット病は主に外陰部に発生する皮膚癌の一つである。アジア人における罹患率は0.28人/10万人・年と極めて少なく、希少がんに分類される。乳房外パジェット病の多くは緩徐に進行し、表皮内癌の間に切除することができれば根治可能である。しかしながら遠隔転移を生じた進行期乳房外パジェット病では有効な治療法は確立されておらず、様々な化学療法のレジメンが試験的に試されたり、放射線療法が試されたりしているが、治療に難渋することが多い。

進行期乳房外パジェット病に対する標準治療が未だに確立されていない主な原因として、症例数が少なく臨床試験を行うことが困難であること、そして腫瘍細胞の細胞株が樹立されていないために基礎研究が全く行われていないことが挙げられる。これまでのがん研究は主に二次元培養樹立がん細胞株を用いて行われてきた。二次元培養樹立がん細胞株は通常、組織から採取したがん細胞同士の細胞接着を剥がし単細胞化して培養することが多い。この方法では乳房外パジェット病の様な比較的増殖が緩徐ながんにおいては腫瘍細胞が増殖できず、細胞株の樹立や初代培養が極めて困難であった。近年、がん細胞を三次元集塊(がんオルガノイド)のまま培養することにより、二次元培養より高率にがん細胞を分離、培養、継代する技術が開発されだしている。がんオルガノイドは細胞-細胞間接着を維持したまま三次元培養するため、従来の二次元培養細胞株と比較して患者腫瘍本来の分化的性質(組織学的特徴や細胞極性など)を高度に維持しており、癌細胞の臨床的性質を評価するための有用な培養系である。そこで本研究者は、がんオルガノイド三次元培養をいう新技術を用いて、乳房外パジェット病組織からがんオルガノイドを採取、培養し、基礎研究を可能とすることで進行期乳房外パジェット病に対する新たな治療法開発への足がかりとすることを考えた。

### 2. 研究の目的

本研究の目的は、進行期乳房外パジェット病に対する新たな治療法開発への足がかりとなるべく、乳房外パジェット病由来がんオルガノイド三次元培養法を確立すること、樹立した乳房外パジェット病がんオルガノイドを用いて薬剤感受性試験などの検討を行うこと、乳房外パジェット病担癌マウス・乳房外パジェット病皮膚三次元培養モデルを作成し、さらなる病態解明、有効な治療法の開発を行うことである。

### 3. 研究の方法

#### (1) 乳房外パジェット病由来がんオルガノイドの分離、三次元培養法の確立

外科的手術により摘出した乳房外パジェット病組織の一部を検体として用い、一部はがんオルガノイド培養の工程へ、一部は免疫不全マウスに移植して患者組織移植腫瘍マウス(patient derived xenograft-tumor:PDX)の作成に用いた。また、樹立したがんオルガノイドの至適培養条件について、培地や添加物を変えて培養し、検討した。

#### (2) がんオルガノイド移植による乳房外パジェット病モデルマウスの作成

(1)で樹立したがんオルガノイドを、免疫不全マウスに移植し、乳房外パジェット病モデルマウスを作成した。

#### (3) 薬剤感受性試験

樹立したがんオルガノイドに対して、各種抗がん剤を投与し、その有効性を検討した。

### 4. 研究成果

### (1) 乳房外パジェット病がんオルガノイドの樹立

乳房外パジェット病 13 症例よりがんオルガノイドの分離を試み、5 例でがんオルガノイドの分離に成功した。これらは全て結節性病変もしくはリンパ節転移病変であった。4 例で担がんマウスの作成を試み、2 例で成功した。また、この 2 例では作成された担がんマウスより摘出した腫瘍組織を用いてがんオルガノイドを再度分離することに成功し、マウスを用いて継代することが可能であった。分離したがんオルガノイドは凍結保存可能であった。また、がんオルガノイドを病理組織的に検討したところ、管腔構造が確認され、オルガノイドを構成する細胞は CK7 陽性の腫瘍細胞であることが証明できた。(図 1)

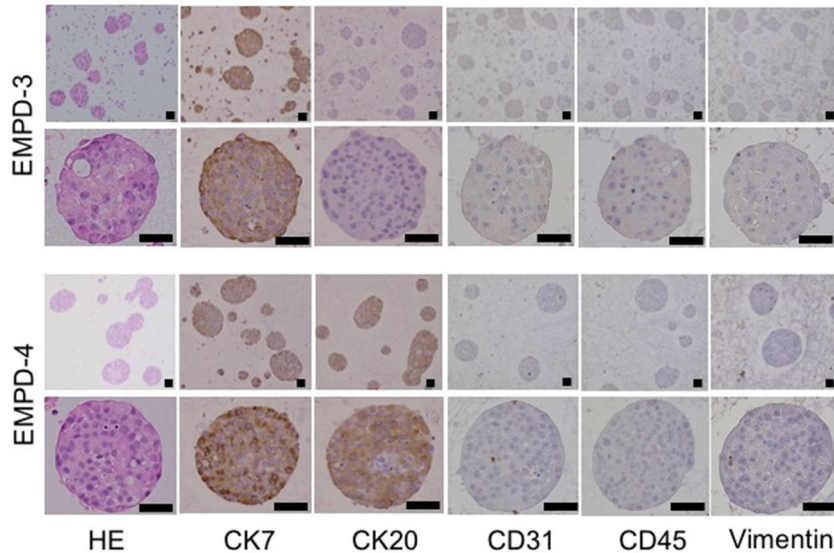


図 1 がんオルガノイドの病理組織学的検討。オルガノイド内に管腔構造をみとめ、オルガノイドを構成する細胞は CK 7 陽性 CD31 陰性 CD45 陰性 Vimentin 陰性であり、もとの腫瘍細胞の性質と一致していた。

### (2) がんオルガノイド培養の至適条件の設定

乳房外パジェット病から分離したがんオルガノイドの至適培養条件を検討した結果、Heregulin- 1 を培地に添加するとがんオルガノイドの増生が促進されることが判明した。また、培地に PI3K/AKT 経路の阻害薬である LY294002 を添加するとがんオルガノイドの増生が阻害され、乳房外パジェット病腫瘍細胞の増殖に HRG-HER3 シグナルを介した PI3K/AKT 経路が重要な役割を担っている可能性が示唆された。

### (3) 乳房外パジェット病モデルマウスの作成

乳房外パジェット病から分離したがんオルガノイドをマトリゲルに浮遊させ、免疫不全マウス背部皮下に局所注射したところ、約 3 ヶ月後より結節を作成し、約 6 ヶ月後には長径 15mm 大の結節となった。組織を採取し、病理組織学的検討をおこなったところ、管腔構造を認め、元の腫瘍の性質や極性が保たれていることが示された。(図 2)

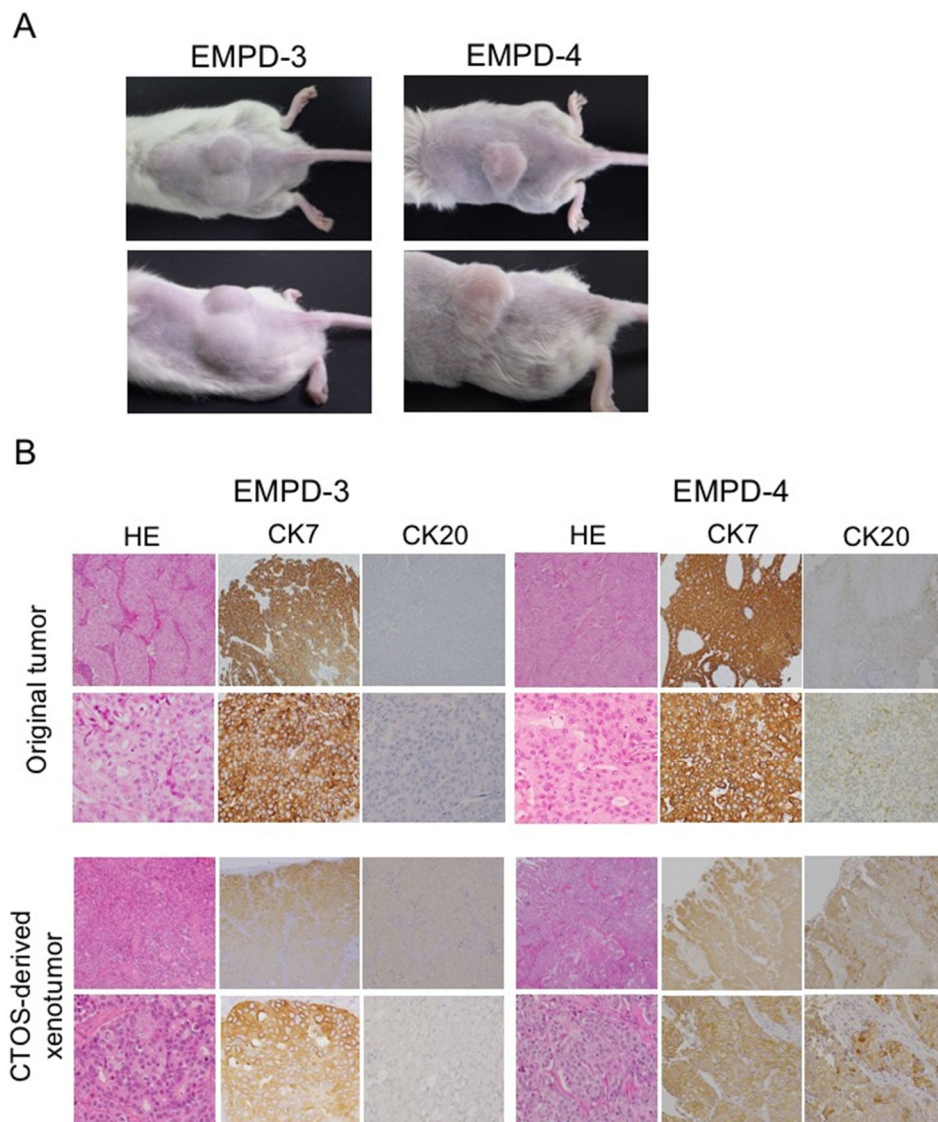


図2 A 作成した乳房外パジェット病モデルマウス。背部に結節を認める。B 乳房外パジェット病モデルマウスに生じた腫瘍組織は、病理組織学的に元の腫瘍組織と同一の性質を有していた。

#### (4)薬剤感受性試験

継代に成功した2例のがんオルガノイドを用いて抗がん剤を用いた薬剤感受性試験を行った。2例のうちの片方ではドセタキセルに対する感受性を認めたが、もう片方ではドセタキセルによる増殖抑制効果はわずかであった。5 フルオロウラシル、シスプラチンについては、両者ともに増殖抑制効果は認められなかった。

#### (5) 考察

本研究において、世界で初めて乳房外パジェット病からのがんオルガノイドの分離、継代に成功した。本研究により樹立されたがんオルガノイドを用いることで、乳房外パジェット病の病態解明や新たな治療開発の足がかりとなることが期待される。

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 0件）

1. 著者名 Takahiro Arita, Jumpei Kondo, Yuka Kaneko, Miho Tsutsumi, Mai Kanemaru, Mari Matsui, Yukiyasu Arakawa, Norito Katoh, Masahiro Inoue, Jun Asai	4. 巻 99(3)
2. 論文標題 Novel ex vivo disease model for extramammary Paget's disease using the cancer tissue-originated spheroid method	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Journal of Dermatological Science	6. 最初と最後の頁 185-192
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.jdermsci.2020.07.006	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
---------------------------	-----------------------	----

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
---------	---------