

平成 29 年 5 月 25 日現在

機関番号：32202

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2014～2016

課題番号：26430097

研究課題名(和文) がんゼノ患者モデル/インタラクトーム多次元解析系の個別化がん治療システムへの展開

研究課題名(英文) Multi-dimensional interactome analyses of patient derived cancer xenograft model for personalized medicine system

研究代表者

千々和 剛 (Chijiwa, Tsuyoshi)

自治医科大学・医学部・講師

研究者番号：70642180

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,800,000円

研究成果の概要(和文)：がん患者由来ゼノグラフト(Patient-derived xenograft, PDX)の網羅的相互作用解析(Interactome)を行い、抗癌剤の効果予測・個別化医療への応用を検討した。Interactomeにて高依存性の相互作用に関する分子標的薬のin vivo実験では有意な腫瘍縮小効果が見られ、臨床効果とも相関した。PDX樹立過程解析にて、効果的なPDX樹立法を検討した。癌性胸水からの特殊なPDX樹立に成功し、手術検体より簡便に採取でき、より病態を反映するモデルを作成した。PDXを用いたInteractomeから最適な分子標的薬を選択することができる個別化医療システムへの展開が可能となった。

研究成果の概要(英文)：In this study, we performed the interactome analyses of Patient-derived xenografts (PDX) linked with clinical information. It disclosed cancer-stroma interactions associated with molecular target drug efficiencies comprehensively. High interactions were confirmed by in-vivo drug sensitivity tests or clinical effectiveness of molecular target drugs. Efficient establishment procedures of PDX were also statistically confirmed among from our results. We also established PDXs from malignant pleural effusion. The PDXs from malignant pleural effusion are efficient and valuable as same as from surgical specimen. It is possible to establish serial PDXs of the same patient less-invasively. Our results appear to be reliable for clinical simulations of chemotherapy and will definitely assist in the selection of the most sensitive anti-cancer drug for each patient. The fast and efficient establishment of individual PDXs will contribute to personalized anti-cancer therapies.

研究分野：動物実験モデル

キーワード：がん患者由来ゼノグラフト 疾患モデル NOGマウス インタラクトーム

1. 研究開始当初の背景

悪性腫瘍(がん)は日本人死因の第1位の疾患である。標準治療に抵抗性を示す進行がん症例の治療成績は今なお低く、がん患者個別に科学的な解析結果に基づく治療の選択が望まれている(個別化医療)。近年、進行がんの病態を形成する主体としてがん幹細胞(Cancer Stem Cell, CSC)の存在が注目されている。今後、進行がん化学療法の主流となっていくCSCをターゲットとした分子標的薬においては、従来の抗がん剤と違い、その効果をがんの増殖阻害・殺細胞効率ではなく、標的分子の阻害効率で評価する必要があり、臨床現場においてはどのようにして適切な分子標的薬を選択するかは未だ確立していない。がん患者個別に科学的に解析した結果に基づく治療・個別化医療が求められている。

2. 研究の目的

がん患者ゼノグラフト(Patient-derived xenograft, PDX)はがん幹細胞と微小環境との相互作用を維持し、疑似的ながん患者として抗がん剤治療をin vivoでシミュレーションできる高機能疾患モデルである。PDXモデルにおいて、インタラクトーム解析によるがん幹細胞-微小環境相互作用分子の網羅的解析結果と抗がん剤(特に分子標的薬)の臨床的効果を比較検討することにより、従来の抗がん剤感受性試験に比し高精度の抗がん剤治療効果予測システム確立のための基礎的データを集積する。PDX-インタラクトーム解析を患者個別のがん幹細胞に最適な抗がん剤選択を可能とする個別化医療支援がん解析基盤技術となるヒト型化高機能実験動物疾患モデルシステムとして構築することを目的とする。

3. 研究の方法

PDXをNOGマウスに移植しPDX/NOGモデルを樹立・作成する。生着したPDX/NOGより病理組織用、遺伝子検査用、凍結保存用に検体を採取する。病理組織検索にて臨床の病理組織構造を維持していることを確認し、遺伝子検査用検体よりtotalRNA抽出し、次世代シーケンサーを用いてインタラクトーム解析を行う。インタラクトーム解析ではがん細胞(ヒト)と間質・微小環境(マウス)の相互作用を遺伝子発現レベルにて3次元的に解析する。解析結果から上市分子標的薬の関連相互作用より有効性が期待できるものを選択し、PDX/NOGを用いたin vivo抗がん剤感受性試験あるいは実際の臨床経過と比較検討し、個別化医療プラットフォームとしての応用を図る。

4. 研究成果

神奈川県立がんセンターより提供された各種がん手術検体(原発・転移)を速やかにNOGマウス皮下に移植し、3代以上継代移植されたものをPDX/NOG樹立とし実験に使用した。

本研究期間中に100株以上のPDXを樹立した。正着に關与する条件を統計学的に検討し、効率的なPDX樹立方法を検討した(図1)。また、肺癌癌性胸水からのPDX樹立にも成功し、手術検体からのPDXと同様のheterogeneityを保っていることを確認した(図2)。より低侵襲で個別PDXを樹立することができるようになった。

	Established	Failed	Total	%	P-value
Original tumor sites					0.29 ^a
Gastrointestinal	29	21	50	58	
Other digestive	10	10	20	50	
Respiratory	10	5	15	67	
Breast and female genital	3	6	9	33	
Urological	4	3	7	57	
Neurological	1	6	7	14	
Others	4	4	8	50	
Total	61	55	116	53	
Tumor type					<0.001 ^b
Carcinomas	58	40	98	59	
Sarcomas	3	15	18	17	
Tumor site					<0.001 ^b
Primary	10	27	37	27	
Metastasis	51	28	79	65	
Time to engraftment ^c					0.49 ^b
Early	47	46	93	51	
Delayed	14	9	23	61	

^aChi-square test, ^btwo-sided Fisher's probability exact test, ^cengraftment on the day of surgery or the next day was considered 'early', and engraftment after 2 days was considered as 'delayed'.

図1. PDX生着率の条件比較



図2. PDX遺伝子発現heatmap(1-5手術検体, 6-7癌性胸水)

PDX/NOGよりmRNAを抽出しインタラクトーム解析を行った。食道癌脳転移症例PDX/NOGのEGF-EGFR相互作用は高依存性であり、PDX/NOGを用いたEGFR阻害薬Cetuximabのin vivo感受性試験では著明な増殖抑制効果が認められた(図3)。また大腸癌、肺癌PDX/NOGインタラクトーム結果は臨床における効果をよく反映していた(図4, 5)。またこれらのデータ蓄積によりCetuximabと

Bevacizumab の効果と相互作用依存性の間には約 1:3 の差があることが示唆され、薬剤選択の際の基準と成り得ると考えられた。

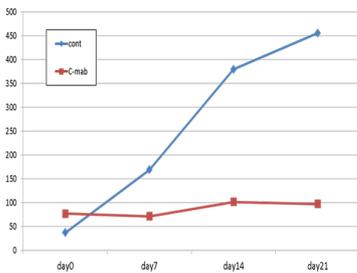
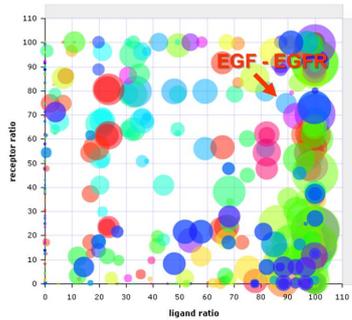


図 3 食道癌転移 PDX における EGF-EGFR 相互作用と Cetuximab 感受性試験

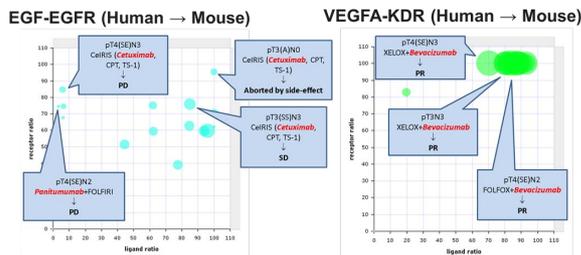
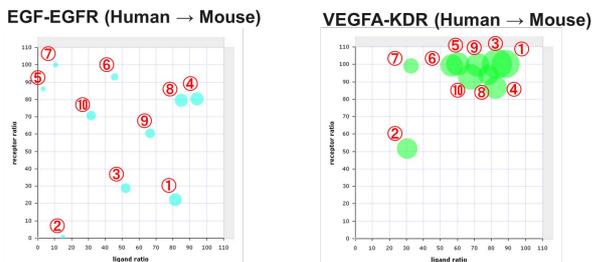


図 4 大腸癌 PDX における EGF-EGFR, VEGF-KDR 相互作用と臨床情報の対比



No.	age	gender	site	path	therapy	prognosis
1	43	M	Brain metastasis	AdSq	Erlotinib	Died after 3 months
2	60	M	Brain metastasis	Ad, por	Gamma Knife	Died after 1 month
3	69	F	Brain metastasis	SCC	CBDCA+DOC	Died after 3 months
4	64	M	Brain metastasis	Ad, por	(1)CDP+PEM (2)DTX (3)Erlotinib	Died after 12 months
5	82	M	Brain metastasis	LC, LCNEC	Best supportive care	Died after 1 month
6	60	M	Brain metastasis	Ad, mod	CBDCA+Pem, whole-brain radiation	Died after 9 months
7	78	M	Brain metastasis	Ad, por	unknown	unknown
8	71	M	Malignant pleural effusion	Ad, mod	(1)CBDCA+PEM (2)DOC+BEV	Censored after 5 months
9	66	F	Brain metastasis	Ad, mod	unknown	unknown
10	72	M	Malignant pleural effusion	Ad, mod	(1)CBDCA+PEM (2)DOC+BEV (3)GEM+VNR	Censored after 1 month

図 5 肺癌 PDX における EGF-EGFR, VEGF-KDR 相互作用と臨床情報の対比

また、同一患者より複数回樹立できた PDX/NOG モデルにおいてインタラクトーム解析結果を比較し、EGF-EGFR, VEGF-KDR 相互作

用の依存性に変化が生じていることを確認した(図 6)。治療の経過に応じて有効な抗癌剤を選択することが可能となる。

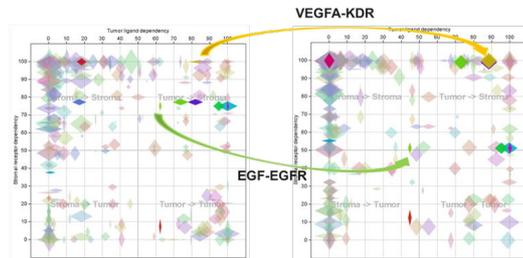


図 6 同一患者由来大腸癌 PDX における EGF-EGFR, VEGF-KDR 相互作用と経時的変化

以上の様に PDX/NOG に対するインタラクトーム解析にて最適な抗癌剤選択を可能とする個別化医療の実現の可能性が示唆された。また、新規抗癌剤開発や抗癌剤耐性獲得機序につながる基礎的研究への応用も期待される。

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

〔雑誌論文〕(計 3 件)

Furukawa D, Chijiwa T, Matsuyama M, Mukai M, Matsuo EI, Nishimura O, Kawai K, Suemizu H, Hiraoka N, Nakagohri T, Yasuda S, Nakamura M. Zinc finger protein 185 is a liver metastasis-associated factor in colon cancer patients. *Mol Clin Oncol.* 2:709-713. 2014

Chijiwa T, Kawai K, Noguchi A, Sato H, Hayashi A, Cho H, Shiozawa M, Kishida T, Morinaga S, Yokose T, Katayama M, Takenaka N, Suemizu H, Yamada R, Nakamura Y, Ohtsu T, Takano Y, Imai K, Miyagi Y, Nakamura M. Establishment of patient-derived cancer xenografts in immunodeficient NOG mice. *Int J Oncol.* 47:61-70. 2015. doi: 10.3892/ijo.2015.2997

Hashimoto H, Mizushima T, Ogura T, Kagawa T, Tomiyama K, Takahashi R, Yagoto M, Kawai K, Chijiwa T, Nakamura M, Suemizu H. Study on AAV-mediated gene therapy for diabetes in humanized liver mouse to predict efficacy in humans. *Biochem Biophys Res Commun.* 2016 Sep 23;478(3):1254-60

〔学会発表〕(計 6 件)

Furukawa D, Chijiwa T, Matsuyama M, Mukai M, Matsuo EI, Nishimura O, Kawai K, Suemizu H, Hiraoka N, Nakagohri T, Yasuda S, Nakamura M. Zinc finger protein 185 is a key molecule of liver metastasis in colon cancer. AACR Annual Meeting. 2014 サイエ

ゴ

Chijiwa T, Kawai K, Noguchi A, Sato H, Hayashi A, Cho H, Shiozawa M, Kishida T, Morinaga S, Yokose T, Katayama M, Takenaka N, Suemizu H, Yamada R, Nakamura Y, Ohtsu T, Takano Y, Imai K, Miyagi Y, Nakamura M. The valuable experimental model system "Cancer Xenopatient" established in NOG mice. AACR Annual Meeting. 2015 フィラデルフィア

Chijiwa T, Isagawa T, Noguchi A, Sato H, Hayashi A, Cho H, Shiozawa M, Kishida T, Morinaga S, Yokose T, Katayama M, Takenaka N, Haraguchi M, Miyao N, Tateishi Y, Kawai K, Suemizu H, Yamada R, Nakamura Y, Imai K, Komura D, Ishikawa S, Nakamura M, Miyagi Y. Clinical applications of PDX/NOG models for personalized chemotherapy - possible use in chemo-sensitivity testing and clinical sequencing. AACR special conference on Patient-Derived Cancer Models. 2016 ニューオーリンズ

Furukawa D, Chijiwa T, Matsuyama M, Mukai M, Matsuo E, Nishimura O, Kawai K, Suemizu H, Nakagohri T, Yasuda S, Shimada K, Hiraoka N, Nakamura M. Clinical significance of ZNF185 intracellular localization in pancreatic ductal carcinoma. AACR Annual Meeting 2016 ニューオーリンズ

Chijiwa T, Haraguchi M, Isagawa T, Noguchi A, Katayama M, Miyao N, Yoshioka M, Matsui N, Tateishi Y, Suemizu H, Yamada R, Nakamura Y, Imai K, Komura D, Katoh H, Ishikawa S, Nakamura M, Miyagi Y. Establishment of patient-derived xenografts from malignant pleural effusion using NOG mice. ESMO Asia 2016 シンガポール

Chijiwa T, Haraguchi M, Komura D, Noguchi A, Shiozawa M, Katayama M, Miyao N, Matsui N, Tateishi Y, Suemizu H, Nakamura Y, Isagawa T, Katoh H, Ishikawa S, Nakamura M, Miyagi Y. Comprehensive and serial analyses of tumor-stroma interactions in individual PDX/NOG models contribute to personalized chemotherapy. AACR International Conference on New Frontiers in Cancer Research 2017. ケープタウン

〔図書〕(計 件)

〔産業財産権〕

出願状況(計 件)

名称：
発明者：
権利者：

種類：
番号：
出願年月日：
国内外の別：

取得状況(計 件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
取得年月日：
国内外の別：

〔その他〕
ホームページ等

6. 研究組織

(1) 研究代表者

千々和 剛 (CHIJIWA Tsuyoshi)
自治医科大学医学部講師
研究者番号：70642180

(2) 研究分担者

宮城 洋平 (MIYAGI Yohei)
神奈川県立がんセンター臨床研究所部長
研究者番号：254194

(3) 研究分担者

砂河 孝行 (ISAGAWA Takayuki)
東京医科歯科大学難治疾患研究所助教
研究者番号：40418637

(4) 研究分担者

加藤 洋人 (KATOH Hiroto)
東京医科歯科大学難治疾患研究所助教
研究者番号：60446549