

令和元年6月27日現在

機関番号：14401

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2017～2018

課題番号：17K16542

研究課題名（和文）新規消化器癌初代培養法樹立と臨床応用を目指した研究

研究課題名（英文）Establishment of primary culture of gastrointestinal tumor for clinical application

研究代表者

藤野 志季 (Fujino, Shiki)

大阪大学・医学系研究科・特任助教（常勤）

研究者番号：10768956

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,100,000円

研究成果の概要（和文）：我々は、簡便で再現性のある手技で、患者のミニジューアモデルとしての初代培養を確立することを目的として研究をおこない、大腸癌においては樹立効率が8割程度と非常に成績が良い手法を確立した。また、この方法を他癌腫へも応用拡大させることに成功した。我々の樹立した初代培養細胞（isolated tumor-derived Cancer Cells, iCC）は基本的な培養方法を2次元培養としており（two-dimensional (2D) cultured organoid, 2D0）、非常に汎用性がある手法で、薬剤感受性試験を含む様々な研究手法において簡便に用いることを可能とした。

研究成果の学術的意義や社会的意義

我々の樹立した初代培養細胞は基本的な培養方法を2次元培養としており（two-dimensional (2D) cultured organoid, 2D0）、非常に汎用性がある手法で、薬剤感受性試験を含む様々な研究手法において簡便に用いることができるマテリアルである。2D0を用いることで、より臨床の腫瘍に近い細胞挙動の解析が行え、多くのがん研究や個別化医療における有用なソースとなり得る。

研究成果の概要（英文）：Tumors and primary cultured cells show phenotypic heterogeneity, and two-dimensional (2D) cultured cells are useful for various assays used to study these cells. In this study, we developed a primary cultured organoid in 2D culture (2D organoid; 2D0) that maintained the clinical phenotypic heterogeneity of tumor samples. The parental tumor differentiation was preserved in our system, with gene expression similar to that in the parental tumor. In vitro drug sensitivity analysis can be conducted using the 2D0 to reflect individual clinical courses. The 2D0 developed in this study is an in vitro personal cancer model. This approach may be useful for producing clinical chemotherapy agents as personalized medicines.

研究分野：消化器癌

キーワード：初代培養 癌 大腸癌 個別化医療 薬剤感受性

## 様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19、CK - 19 (共通)

### 1. 研究開始当初の背景

多くの基礎研究で用いられているのは細胞株と呼ばれる増殖能を獲得した比較的均一な癌細胞の集団であり、実際の個体内での多様性を持つ癌組織とは異なる。実際の個体内での癌は多様性に富むことはよく知られており、癌のミニチュアモデルとなりえるものが、臨床の癌に近い形質を保っている可能性のある初代培養細胞であると考えられる。初代培養細胞を用いて、より生体内の癌に近い、癌組織を研究することは、癌の増殖や転移に関わる新しいメカニズムの解明や新規治療薬の開発につながる非常に新規性の高い研究が行える可能性がある。

しかしながら、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、未だに確立された方法がないのが現状であった。大腸癌の初代培養の成功率は1割～3割程度と報告 (CancerRes 1976, BrJCancer 1986, CancerRes 1987) され、3次元培養での初期培養成功率が6割という報告 (Cell 2015) が出ているものの、その手技は煩雑で再現が難しく、また解析などが可能な程度まで細胞を増殖させることができたのは5割程度であった。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、解析や研究に用いるマテリアルとして利用することが難しく、臨床応用には至っていない。

### 2. 研究の目的

現在消化器癌において確立された初代培養細胞樹立の手法はないため、本研究では、簡便で汎用性の高い初代培養法を確立し、臨床応用へつながるプラットフォームを構築することを目的とする。

### 3. 研究の方法

先行研究により、2次元培養での初代培養を模索し、大腸癌においては樹立効率が8割程度と非常に成績が良い手法を確立することが可能となってきた。この手法では従来の細胞株とは異なり、臨床と非常に近い病理像を示す癌組織を得ることが可能である。この培養細胞の解析を行い、生体における癌の多様性の模倣に必要な培養環境の探索、また臨床応用を目指した培養細胞の利用について研究を進めていく。また、他の癌腫への拡大を図る。

・他癌腫における培養効率の検討

・臨床癌と培養細胞の相同性の解析 (遺伝子変異解析、遺伝子発現解析)

・個々の患者モデルとしての検討 (培養細胞の薬剤感受性試験結果と臨床での抗がん剤の治療効果判定)

### 4. 研究成果

我々の樹立した初代培養細胞 (isolated tumorderived Cancer Cells, iCC) は基本的な培養方法を2次元培養としており (two-dimensional (2D) cultured organoid, 2D0) 非常に汎用性がある手法で、薬剤感受性試験を含む様々な研究手法において簡便に用いることが可能となった。

大腸癌にて確立してきた初代培養方法の他癌腫へ拡大すべく、検討を行い、現在、胃癌、膵臓癌、胆管癌、乳癌、肺癌、小児神経系腫瘍、などに関して同手法を用いての *in vitro* での培養が可能であることを確認した。個々のがん腫により培養細胞を維持する環境に必要な因子は異なっており、個々の癌腫に応じた、がん微小環境を構築することが重要であると考えられた。また、臨床癌と培養細胞の相同性の解析においては、癌の遺伝子変異解析にて元の臨床検体との相違の検討を行った。大腸癌検体において、KRAS、NRAS、BRAF の遺伝子変異について解析を行ったところ、KRAS は85%、NRAS、BRAF は100%一致していた。希少変異の解析を行なった結果、遺伝子変異細胞が培養により検出感度以上になる可能性が考えられた。

2D0の解析において、2D0は遺伝子発現や病理組織像においても臨床の腫瘍をよく反映していた。血清を含む従来の細胞株の培養環境では細胞が比較的単一の集団になることと比較し、basic fibroblast growth factor や transforming growth factor- $\beta$  を含む我々の iCC 培養液においては、幹細胞を維持培養され、多様なキャラクターを含む細胞集団の維持が可能になっていることが重要であると考えられた。

個々の患者モデルとしての検討に関して、培養細胞の薬剤感受性試験結果と臨床での抗がん剤の治療効果判定について解析を行うため、*in vitro* の薬剤感受性試験で用いることのできる、臨床での抗がん剤パネルと、パネルを用いた感受性試験のプラットフォームを作成した。2D0を利用した薬剤感受性予測は、臨床における抗がん剤の治療効果を反映していた。

本研究においては、より臨床の腫瘍に近い細胞挙動の解析が可能になる初代培養細胞 (2D0) を確立し、その解析をおこなった。また生体における癌のミニチュアモデルとしての応用の可能性を示した。

## 5 . 主な発表論文等

### 〔雑誌論文〕(計4件)

1. Fujino, S., Ito, A., Ohue, M., Yasui, M., Mizushima, T., Doki, Y., Mori, M., Miyoshi, N. Phenotypic heterogeneity of 2D organoid reflects clinical tumor characteristics. BBRC. 2019 May 28;513(2):332-339. doi: 10.1016/j.bbrc.2019.03.173. Epub 2019 Apr 5
2. Fujino, S., Miyoshi, N. Oct4 gene expression in primary colorectal cancer promotes liver metastasis. Stem Cells Int. 2019. Article ID 7896524. doi: 10.1155/2019/7896524. (Epub)
3. Fujino, S., Miyoshi, N., Ohue, M., Takahashi, Y., Yasui, M., Hata, T., Matsuda, C., Mizushima, T., Doki, Y., Mori, M. Platelet-derived growth factor receptor-β gene expression relates to recurrence in colorectal cancer. Oncology Reports. 2018 May;39(5):2178-2184
4. Miyoshi, N., Fujino, S.\*., Ohue, M., Takahashi, Y., Yasui, M., Sugimura, K., Akita, H., Takahashi, H., Kobayashi, S., Yano, M. The POU5F1 gene expression in colorectal cancer: A novel prognostic marker. Surgery Today. 2018 Jul;48(7):709-715. doi: 10.1007/s00595-018-1644-9. Epub 2018 Feb 27. \* Equal first author

### 〔学会発表〕(計5件)

1. Fujino S., Miyoshi N., Saso K., Sasaki M., Yasui M., Ohue M., Takahashi H., Haraguchi N., Hata T., Matsuda C., Mizushima T., Mori M., Doki Y. 2D organoid (2DO) as human tumor model for predicting therapeutic effect of anti-cancer drugs. AACR Annual Meeting 2019.
2. Fujino S., Miyoshi N., Ohue M., Takahashi Y., Yasui M., Nishimura J., Saso K., Takahashi H., Haraguchi N., Hata T., Mizushima T., Doki Y., Mori M. Anti-cancer drug sensitivity assay using in vitro primary culture cells. AACR Annual Meeting 2018 年.
3. 藤野志季, 三吉範克, 大植雅之, 笹生和宏, 安井昌義, 畑泰司, 松田宙、水島恒, 土岐祐一郎, 森正樹. Precision medicine を目指した新規薬剤感受性評価モデルの構築. 第 73 回日本消化器外科学会総会、2018 年
4. 藤野志季, 三吉範克, 笹生和宏, 高橋佑典, 水島恒和, 森正樹. 大腸癌初代培養細胞における癌幹細胞. 第 17 回日本再生医療学会総会、2018
5. 藤野志季, 三吉範克, 佐々木優, 笹生和宏, 高橋佑典, 高橋秀和, 原口直紹, 畑泰司, 松田宙、水島恒和, 土岐祐一郎, 森正樹. ヒト腫瘍モデルを用いた抗がん剤感受性の予測. 第 77 回日本癌学会学術総会、2018 年

### 〔図書〕(計0件)

### 〔産業財産権〕

出願状況 (計0件)

名称：  
発明者：  
権利者：  
種類：  
番号：  
出願年：  
国内外の別：

取得状況 (計0件)

名称：  
発明者：  
権利者：  
種類：

番号：  
取得年：  
国内外の別：

〔その他〕  
ホームページ等

<http://www.mc.pref.osaka.jp/laboratory/department/ganiryososei/>

## 6. 研究組織

### (1) 研究分担者

研究分担者氏名：

ローマ字氏名：

所属研究機関名：

部局名：

職名：

研究者番号（8桁）：

### (2) 研究協力者

研究協力者氏名：三吉 範克

ローマ字氏名：Norikatsu Miyoshi

研究協力者氏名：伊藤 彩

ローマ字氏名：Aya Ito

研究協力者氏名：笹生 和宏

ローマ字氏名：Kazuhiro Saso

研究協力者氏名：佐々木 優

ローマ字氏名：Masaru Sasaki

研究協力者氏名：松浦 成昭

ローマ字氏名：Nariaki Matsuura

研究協力者氏名：大植 雅之

ローマ字氏名：Masayuki Ohue

研究協力者氏名：安井 昌義

ローマ字氏名：Masayoshi Yasui

研究協力者氏名：森 正樹

ローマ字氏名：Masaki Mori

研究協力者氏名：土岐 祐一郎

ローマ字氏名：Yuichiro Doki

， ，

科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属されます。