

令和 5 年 6 月 22 日現在

機関番号：82606

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2018～2022

課題番号：18K07342

研究課題名(和文) 乳癌の体腔液中/循環血液中癌細胞と脂肪幹細胞との3D共培養及び薬効試験技術の開発

研究課題名(英文) 3D co-culture of breast cancer in malignant effusion and CTC with adipose stem cells

研究代表者

向原 徹 (Mukohara, Toru)

国立研究開発法人国立がん研究センター・東病院・科長

研究者番号：80435718

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)：本研究では抗悪性腫瘍薬の評価を行うモデルとして、従来の2D培養ではなく3D培養の系を確立することを目的とした。より具体的には、我々の先行研究の結果を基に脂肪幹細胞との3D共培養の確立を目指したが、研究者の異動やCOVID-19パンデミックの影響もあり当初の目標は達成できなかった。一方で、3D培養系を用いた分子標的薬の耐性やその克服法に関する研究成果は論文報告ができた。また、循環血液中癌細胞(CTC)の培養には至らなかったが、CTCをイメージングフローサイトメトリーを用いて評価する系の検討を行い、成果を論文報告した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

2D培養は腫瘍の生体内での環境を正確に再現しておらず、そのことが薬効試験の大きな壁とされてきた。近年、様々な3D培養技術が提唱されているが、薬効試験のプラットフォームとしてゴールドスタンダードとなったものはない。今回、体腔液中癌細胞やCTCといった非侵襲的に患者から採取可能な癌細胞から効率的に3D培養を行うべく脂肪幹細胞との共培養を試みた。残念ながら当初予定通りの成果は挙げられなかったが、3D培養を用いた薬効試験や、CTCを確保しキャラクタライズする研究においては一定の成果を出せた。今後、さらに研究体制を見直し、3D初代培養系の確立を目指したい。

研究成果の概要(英文)：The objective of this study was to establish a 3D culture system instead of the conventional 2D culture as a model for evaluating anti-cancer agents. More specifically, we aimed to establish a 3D co-culture system with adipose stem cells based on the results of our previous study, but we could not achieve our initial goal due to the change of researchers and the COVID-19 pandemic. On the other hand, we were able to report in a paper the results of our research on resistance to molecular-targeted drugs and methods to overcome such resistance using a 3D culture system. In addition, although we were not able to culture circulating blood cancer cells (CTCs), we studied a system to evaluate CTCs using imaging flow cytometry and reported the results in a paper.

研究分野：実験治療学

キーワード：3D培養

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

乳癌の治療において、患者個々の情報を基に正確な治療薬の選択し提供する医療 (precision medicine) の実現が急務である。近年、次世代シーケンサーを用いた腫瘍のゲノム解析のみでは、その達成度は限定的であることが明らかにありつつあり、経時的に腫瘍を採取し、ex-vivo で細胞レベルの薬効試験や耐性機序解析のできる基盤開発が望まれる。そのためには、非侵襲的な方法で採取した癌細胞を培養、特に *in vivo* 環境に近い3次元(3D)培養する技術の開発が必須である。その観点から、悪性体腔液中癌細胞や循環血液中腫瘍細胞 (circulating tumor cell [CTC]) を3D培養し個別化治療や耐性研究のための基盤として構築することは、臨床的意義が深い。

2. 研究の目的

本研究の当初の目的は、体腔液中癌細胞または CTC と脂肪幹細胞との3D共培養技術を開発し、個別化治療や耐性研究のための基盤を構築することであった。

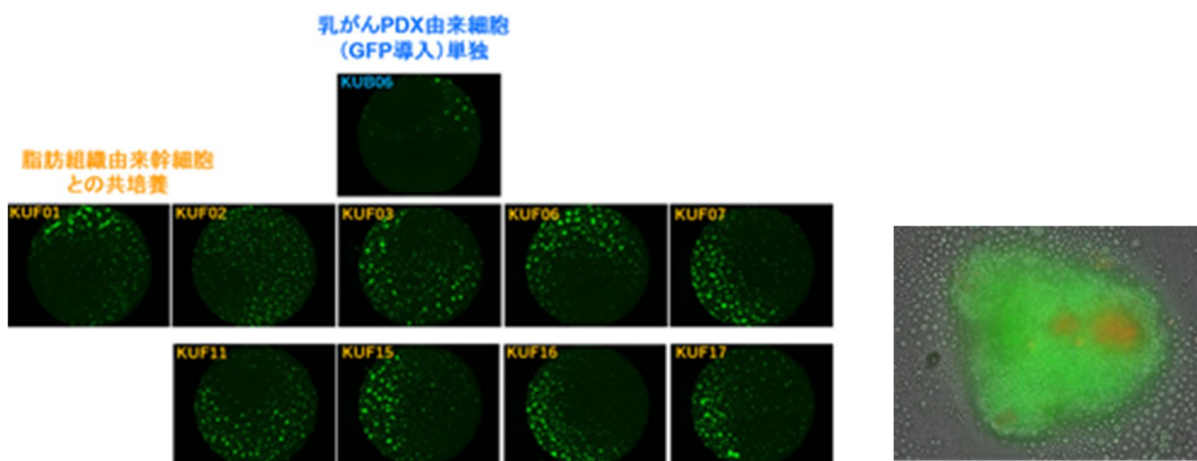
3. 研究の方法

(1) 予備研究として、乳癌患者由来腫瘍ゼノグラフト (PDX) 化した腫瘍細胞の3D脂肪幹細胞との3D共培養を試みた。3D培養用の培養プレートとして NanoCulture Plate® (MBL) を用いた。

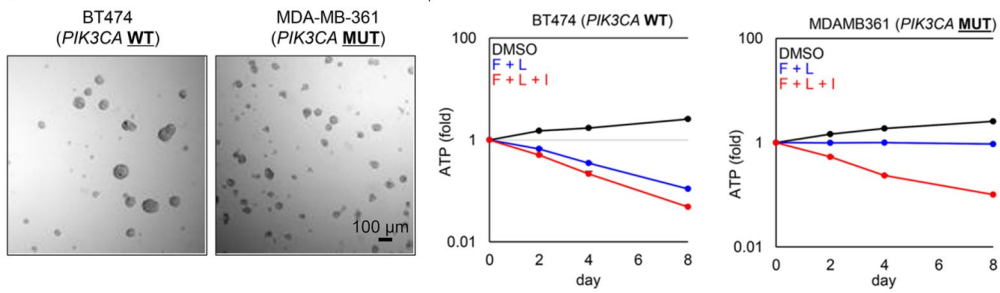
(2) 3D培養下の薬効試験の有用性を探索するために、*HER2* 増幅乳癌細胞株である BT474 および MDA-MB-361 細胞を NanoCulture 96-well Plate に7500細胞/ウェルおよび10000細胞/ウェルの密度で播種した。スフェロイドを顕微鏡で確認した後、標記濃度の薬剤で処理し、Cell Titer-Glo 2.0 発光細胞生存率測定法にて0日、2日、4日、8日目の腫瘍細胞量を定量した。相対的な ATP レベルは、DMSO 処理対照と比較した発光に基づいて計算した。

4. 研究成果

(1) PDX 化した乳癌細胞の増殖は脂肪幹細胞との共培養によって促進することが分かった (下図左)。また、脂肪幹細胞をあたかも「核」として腫瘍細胞が成長する様子が観察された (下図右)。



(2) BT474 (*PIK3CA* 野生型) 株、MDA-MB-361 (*PIK3CA* 変異型) 株とも NanoCulture Plate 上でスフェロイドを形成した (下図左)。BT474 では、lapatinib (*HER2* 阻害薬) 単独で十分な増殖抑制効果がえられた一方で、MDA-MB-361 では lapatinib に *AKT* 阻害薬である ipatasertib を併用した場合にのみ有意な増殖抑制効果がえられた (下図右)。



PIK3CA 変異は抗 HER2 療法の耐性機序として、臨床的に強固なデータが蓄積されており、3D 培養が生体内での腫瘍の薬剤への反応を近似している可能性が示唆された。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計4件（うち査読付論文 4件/うち国際共著 1件/うちオープンアクセス 2件）

1. 著者名 Fujimoto Yumi, Morita Tomoko Yamamori, Ohashi Akihiro, Haeno Hiroshi, Hakozaiki Yumi, Fujii Masanori, Kashima Yukie, Kobayashi Susumu S., Mukohara Toru	4. 巻 10
2. 論文標題 Combination treatment with a PI3K/Akt/mTOR pathway inhibitor overcomes resistance to anti-HER2 therapy in PIK3CA-mutant HER2-positive breast cancer cells	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Scientific Reports	6. 最初と最後の頁 21762
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1038/s41598-020-78646-y	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 -
1. 著者名 Shirai Kentaro, Guan Guofeng, Meihui Tan, Xiaoling Peng, Oka Yuma, Takahashi Yusuke, Bhagat Ali Asgar S., Yanagida Masatoshi, Iwanaga Shigeki, Matsubara Nobuaki, Mukohara Toru, Yoshida Tomokazu	4. 巻 22
2. 論文標題 Hybrid double-spiral microfluidic chip for RBC-lysis-free enrichment of rare cells from whole blood	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Lab on a Chip	6. 最初と最後の頁 4418 ~ 4429
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1039/d2lc00713d	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 該当する
1. 著者名 Nakajima Hiromichi, Harano Kenichi, Nakai Tokiko, Kusuhara Shota, Nakao Takehiro, Funasaka Chikako, Kondoh Chihiro, Matsubara Nobuaki, Naito Yoichi, Hosono Ako, Mitsunaga Shuichi, Ishii Genichiro, Mukohara Toru	4. 巻 61
2. 論文標題 Impacts of clinicopathological factors on efficacy of trastuzumab deruxtecan in patients with HER2-positive metastatic breast cancer	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 The Breast	6. 最初と最後の頁 136 ~ 144
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.breast.2022.01.002	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 -
1. 著者名 Mukohara Toru, Hosono Ako, Mimaki Sachiyo, Nakayama Akiko, Kusuhara Shota, Funasaka Chikako, Nakao Takehiro, Fukasawa Yoko, Kondoh Chihiro, Harano Kenichi, Naito Yoichi, Matsubara Nobuaki, Tsuchihara Katsuya, Kuwata Takeshi	4. 巻 26
2. 論文標題 Effects of Ado-Trastuzumab Emtrastuzumab and Fam-Trastuzumab Deruxtecan on Metastatic Breast Cancer Harboring <i>HER2</i> Amplification and the L755S Mutation	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 The Oncologist	6. 最初と最後の頁 635 ~ 639
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1002/onco.13715	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
---------	---------