

令和 2 年 6 月 8 日現在

機関番号：17401

研究種目：若手研究

研究期間：2018～2019

課題番号：18K15216

研究課題名(和文)患者腫瘍組織移植モデルの効率的作製法の検討

研究課題名(英文)Optimization for establishment of Patient derived xenograft model

研究代表者

刈谷 龍昇(Kariya, Ryusho)

熊本大学・ヒトレトロウイルス学共同研究センター・特任助教

研究者番号：40757663

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)：本研究は患者腫瘍組織移植(PDX)モデルの効率的な樹立方法の確立に供するものである。平成30年度では腫瘍組織の移植前処理が移植効率に影響するかを検討した。固形腫瘍の場合、腫瘍組織中に含まれる細胞外基質が腫瘍細胞への血管新生を阻害してしまう可能性がある。しかし移植片中の細胞外基質の物理的な破壊を行っても移植成功率に有意な差は見られなかった。令和元年度は、免疫不全度が極めて高いNOJマウスと、免疫不全度はNOJマウスに比べて劣るが、様々なストレスに耐性であるBRJマウスでPDX樹立効率を比較したが、有意な差は見られなかった。また、抗がん剤のスクリーニング用のPDX由来細胞株の樹立も行った。

研究成果の学術的意義や社会的意義

抗がん剤の適切な評価を行うためにはヒト患者の病態を忠実に再現したPDXモデルのラインアップであるPDXモデルバンクを樹立する事が極めて重要である。しかしPDXモデルの樹立は未だ高度な技術を有し、樹立効率は決して高くない。本研究はPDXモデルの樹立に影響する要因を検討したという点で非常に学術的、社会的意義を有している。また、本研究で樹立したPDXモデルおよびPDXモデル由来腫瘍細胞株は今後、学会発表や学術論文として世界に発信し、今後の抗がん剤の薬効試験に用いることができるようにする予定である。したがって本研究の結果は新規の抗がん剤の開発に寄与する事となる。

研究成果の概要(英文)：Aim of this study is optimization for establishment of PDX model. Firstly we investigated whether pretreatment of tumor tissue before xenograft influence to efficacy of establishment of PDX model or not. There is the possibility that extra cellular matrix (ECM) of tumor tissue inhibit the vascular formation and decrease the efficacy of PDX model establishment. However, physical destruction of ECM by forceps did not influence for efficacy of PDX model establishment. Moreover, we compared the attachment efficacy of patient tumor tissue between NOJ mouse and BRJ mouse. NOJ mouse is more serious immune-deficiency, but BRJ mouse is more resistant for several stress including irradiation and anti-tumor drugs. Interestingly, NOJ mouse and BRJ mouse have no different against efficiency of patient tumor tissue attachment. We also established several PDX derived tumor cell line. These cell line can use for screening of anti-tumor drugs.

研究分野：腫瘍免疫学

キーワード：患者腫瘍組織移植モデル 薬効試験 動物モデル 免疫不全マウス

1. 研究開始当初の背景

薬の開発において、患者を対象とした臨床試験を行う前に、マウスなどのモデル動物を用いた前臨床試験が必要不可欠である。今問題となっている事として、**実験動物を用いた前臨床試験で得られた結果と、患者を対象とした第二相臨床試験で得られた結果の違いにより、開発候補薬が新薬として承認される確率が極めて低い**ことが挙げられる(約10%、米国食品医薬品局：FDAの報告書より)。現在の前臨床試験で用いられているがんのマウスモデルは、ヒトがん細胞株をマウスに移植したヒトがん細胞株移植モデルである。しかし、このヒトがん細胞株は、実際の患者のがん細胞と性質がかけ離れていることが知られており、必ずしもヒト臨床像に近いモデルではない。そのため、本来患者で効果を示す可能性のある薬剤が、現在のマウスモデルを用いると前臨床試験を突破できない。また、患者では効果を示さない薬が前臨床試験を突破し、臨床試験が行われ、効果を発揮せず、多額の臨床試験開発費と時間を無駄にしまう可能性がある。

近年、がん患者の腫瘍組織を直接マウスに移植する PDX モデルがヒト臨床像を忠実に再現したモデルとして注目されており、個別化医療を実現するための重要な研究手法となっている。PDX モデルの作製は常に成功するわけではなく、成功率は腫瘍によって異なり、研究開始当初**どのような移植法が PDX モデルの作製に適しているか、詳細な解析を行った研究はほとんどなかった。**

2. 研究の目的

精度の高い個別化医療を実現するためには、どれだけ多くの種類の PDX モデルを樹立できるかが鍵となる。つまり PDX モデルバンクが必要となってくる。すでに欧米では PDX モデルバンクの作製が進んでいるが、日本をはじめアジアの国々では PDX モデルバンクの作製が遅れているというのが現状である。また、多くの PDX モデルを樹立するためには、効率的な PDX モデル作製法の確立が必要不可欠となる。そこで、**本研究の目的は、効率的な PDX モデル作製法の確立を行うことで、PDX モデルバンク作製を加速することである。**

3. 研究の方法

・移植片処理法の検討

- ・ 外科手術で摘出された腫瘍組織を手術当日、もしくは翌日に直径 5mm 画に切り分けたものを移植片として用いた。
- ・ 5mm 画に切り分けたサンプルをピンセットでつぶし、細胞外器質を物理的に壊した腫瘍組織と未処理の腫瘍組織をそれぞれ NOJ マウスの背面皮下に3匹ずつ両側に移植し腫瘍生着度を比較検討した。
- ・ 移植はイソフルラン吸入麻酔下でマウスの皮膚を切開し、上記の腫瘍組織をピンセットにて皮下に留置した後、縫合することで行った。
- ・ 移植後6か月以上腫瘍を形成しないものは生着しなかったものとした。

・NOJ マウスとBRJ マウスでの PDX 樹立効率の比較検討

- ・ 外科手術で摘出された腫瘍組織を手術当日、もしくは翌日に直径 5mm 画に切り分けたものを移植片として用いた。

- ・ 移植片は NOJ マウスおよび BRJ マウスの背面皮下に 3 匹ずつ両側に移植した。
- ・ 移植後 6 か月以上腫瘍を形成しないものは生着しなかったものとした。

・ PDX 由来腫瘍細胞株の樹立

- ・ BRJ-GFP マウスを用いて上記と同じ手法で樹立した PDX モデルマウスの腫瘍組織を摘出し、コラゲナーゼにて腫瘍組織内の結合組織を消化した後、RPMI 培地に懸濁し、in vitro で培養した。
- ・ BRJ-GFP マウスを用いて PDX モデルを樹立しているため、腫瘍組織内に存在するマウス由来細胞（主に線維芽細胞）は GFP の蛍光を持っている。そこで培養細胞内に含まれるマウス由来細胞は GFP 陽性細胞をセルソーターを用いて除去した。
- ・ マウス由来細胞を除去した培養細胞（PDX 由来細胞）は限界希釈法によりクローニングし、半年以上培養できたものを PDX 由来腫瘍細胞株とした。

4. 研究成果

平成 30 年度は、口腔がん 13 症例、GIST（消化管間質腫瘍）15 症例、胃がん 2 症例、食道がん 1 症例、すい臓がん 1 症例の PDX モデルの作製を行った。当初の計画では、外科手術で摘出された腫瘍組織をマウスに移植する際に、腫瘍組織の移植場所、腫瘍組織の移植前処理、の 2 つが PDX モデル樹立に影響を与えるか否かを検討する予定であった。しかし、外科手術で摘出された腫瘍組織が上記 2 つの可能性を検討するには小さ過ぎたため、平成 30 年度は移植場所の検討は行わず、腫瘍組織の移植前処理が移植効率に影響するか否かを検討した。具体的には移植片中の細胞外基質をピンセットにより物理的な破壊することで移植成功率が上昇するか否かを検討したが、有意な差は見られなかった。また、上記の PDX モデル樹立実験により口腔がん 7 症例、胃がん 1 症例、食道がん 1 症例、すい臓がん 1 症例の PDX モデルの樹立に成功している。しかし GIST に関しては 1 症例も樹立することが出来なかった。

令和元年度は、免疫不全度が極めて高い NOD/SCID Jak3 KO (NOJ) マウスと、免疫不全度は NOJ マウスに比べて劣るが、様々なストレスに耐性である Balb/c Rag2/Jak3 二重欠損マウス (BRJ マウス) で、PDX モデルの作製効率に差があるか比較した。研究開始前は免疫不全度が高い NOJ マウスの方が、BRJ マウスに比べ PDX モデルマウスの樹立効率が高いと予想していたが、生着まで時間のかからない腫瘍（3 か月以内に腫瘍が生着する腫瘍）に関しては、樹立効率に差はなかった。PDX モデル樹立には大量の免疫不全マウスが必要である。BRJ マウスは繁殖が容易なため PDX モデル樹立に必要な数のマウスの準備が容易である。また、BRJ マウスは放射線や抗がん剤など様々なストレスに耐性であり、放射線療法や抗がん剤の薬効評価に使用しやすいマウスである。本研究の結果より BRJ マウスを用いれば安価に PDX モデルが樹立可能であることが示唆された。また、抗がん剤のスクリーニングを、いきなり PDX モデルマウスから始めるのは非常にコストがかかる。したがって PDX モデルマウスから腫瘍細胞株を作製する事は非常に重要な事である。令和元年度末までに 37 症例の口腔がん患者腫瘍組織を BRJ-GFP マウスに移植し、24 症例の PDX モデルを樹立、4 症例の PDX 由来腫瘍細胞株の樹立を完了させた。本研究で樹立した PDX 由来腫瘍細胞株は抗がん剤の安価なスクリーニングに利用可能である。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計3件（うち査読付論文 2件/うち国際共著 3件/うちオープンアクセス 3件）

1. 著者名 Okada, Vaeteewoottacharn, Kariya	4. 巻 8
2. 論文標題 Application of Highly Immunocompromised Mice for the Establishment of Patient-Derived Xenograft (PDX) Models	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Cells	6. 最初と最後の頁 889 ~ 889
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3390/cells8080889	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 該当する

1. 著者名 Okada Seiji, Vaeteewoottacharn Kulthida, Kariya Ryusho	4. 巻 66
2. 論文標題 Establishment of a Patient-Derived Tumor Xenograft Model and Application for Precision Cancer Medicine	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Chemical and Pharmaceutical Bulletin	6. 最初と最後の頁 225 ~ 230
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1248/cpb.c17-00789	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 該当する

1. 著者名 Vaeteewoottacharn Kulthida, Pairojkul Chawalit, Kariya Ryusho, Muisuk Kanha, Imtawil Kanokwan, Chamgramol Yaovalux, Bhudhisawasdi Vajarabhongsa, Khuntikeo Narong, Pugkhem Ake, Saeseow O-Tur, Silsirivanit Atit, Wongkham Chaisiri, Wongkham Sopit, Okada Seiji	4. 巻 8
2. 論文標題 Establishment of Highly Transplantable Cholangiocarcinoma Cell Lines from a Patient-Derived Xenograft Mouse Model	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Cells	6. 最初と最後の頁 496 ~ 496
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3390/cells8050496	査読の有無 無
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 該当する

〔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
---------------------------	-----------------------	----