

令和 5 年 6 月 14 日現在

機関番号：17501

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2020～2022

課題番号：20K09014

研究課題名(和文) 抗炎症光線を用いた癌微小環境制御に基づく新しい大腸癌治療法の開発

研究課題名(英文) Development of new treatment method for colorectal cancer based on cancer microenvironment control using anti-inflammatory light

研究代表者

平塚 孝宏 (Hiratsuka, Takahiro)

大分大学・医学部・客員研究員

研究者番号：20600886

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,300,000円

研究成果の概要(和文)：本研究は、腹膜播種細胞に対するレーザー光線照射の効果を評価し、微小環境作成のため大腸癌細胞のオルガネラのマウスへ移植した。5-ALA添加培地内のMKN45のコロニーに赤色のパルスレーザーの照射で殺細胞効果が得られた。ガルバノミラーを用いた照射範囲の拡大は殺細胞効果を減弱した。また、ヒト大腸粘液癌細胞のオルガノイド作成に成功し、マウスへ背部、腹腔内へ移植したが生着を認めなかった。本研究ではヒト大腸粘液癌細胞のオルガネラを用いた微小環境作成はマウスへの生着条件の探索が必要であること、そして広範なレーザー照射方法と殺細胞効果を発現する安全なレーザー出力条件探索が課題であることがわかった。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究の学術的意義は、腹膜播種を引き起こす大腸癌細胞のオルガネラ構築に成功し、生体内での癌細胞の治療抵抗性をもたらす微小環境の構築に向けた重要な一歩を踏み出したことにある。また、腹膜播種を引き起こす癌細胞に対する5-ALAとパルスレーザーによる治療の可能性、そして安全な出力と照射範囲の拡大が求められることが示された。

社会的な意義としては、現在の再発抑制方法として放射線化学療法が主流であるが、本研究により光線療法による新たな癌治療方法の可能性が示され、治療抵抗性を改善するためのモデルの基礎が提供された。これにより、将来的にはより効果的で安全な癌治療法の開発につながることを期待される。

研究成果の概要(英文)：This study aimed to evaluate the efficacy of laser irradiation on peritoneal dissemination cells and transplant organoids of colorectal cancer cells into mice to create a microenvironment. The results showed that red pulsed laser irradiation on MKN45 colonies in 5-ALA supplemented medium had a cytotoxic effect. However, expanding the irradiation range using a galvanometer mirror reduced the cytotoxicity. Additionally, successful creation of organoids using human colorectal mucinous carcinoma cells was achieved, but engraftment was not observed when transplanted into the mice's dorsal and abdominal cavities. This study highlights the need to explore the engraftment conditions for human colorectal mucinous carcinoma organoids in mice and the challenges in finding optimal laser irradiation methods and safe output conditions to induce cytotoxic effects.

研究分野：外科腫瘍学

キーワード：癌微小環境 光線療法 オルガノイド 腹膜播種 大腸癌 胃癌

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

本邦の癌罹患数第1位、癌死亡数第2位である大腸癌は、大腸癌患者全体で約20%の再発率を有するも、術前化学放射線療法による生存率向上は示されず、術後補助化学療法を行ってもその再発抑制効果は10%未満である。したがって再発抑制のための新しい治療法の開発が急務でありながら、癌細胞は生体内ではnicheなどの癌治療に対する逃避システムを有することから放射線や化学療法を超える再発抑制治療は未だない。

近年、複数種の細胞を同時に培養して構築するオルガノイドは癌細胞周囲細胞からの癌増殖や抑制に関わるシグナルを刺激するリガンドや癌細胞攻撃因子の防御に関わるタンパク産生など、通常の細胞培養環境より生体に近い環境が再現できるとされており、オルガノイドを用いた治療効果判定はより臨床実験に近い結果が得られることが期待されるため、オルガノイドにおける癌の殺細胞効果が得られれば微小環境での光線照射による癌抑制効果の証明が期待できる。今回我々は再発大腸癌を減らすための光線療法を用いた新しい初回手術時の術中照射システムおよびデバイスを開発したい。

2. 研究の目的

癌微小環境モデルを用いて大腸癌の光線を用いた新しい治療方法を開発すること。

3. 研究の方法

(1) 光線照射装置を用いた癌細胞の殺細胞効果の評価

In vitro での癌細胞に対する5-ALA (5-アミノレブリン酸)を加えた培地での抗炎症光線照射にて殺細胞効果と最適条件を調べるために、胃癌腹膜播種細胞株を3cmのdishに24時間培養し、接着しコロニーが確認できたのちに1mmol/Lの5-ALAを加え4時間培養したのちにパルスレーザーを照射し、殺細胞効果を確認する。

(2) 癌細胞を用いたオルガノイドの作成とそれに対する光線照射によるオルガノイドに及ぼす効果の評価

①大腸癌オルガノイドの樹立

外科的に切除された大腸癌組織をメスで細切し、コラゲナーゼおよびディスパーゼにより組織を分散。組織片をマトリゲルで懸濁し、12wellプレートへ撒きマトリゲルに懸濁後、12wellプレートの1wellへ20 μ lのドロップとして、6つ撒く。マトリゲルが固まるまで37 $^{\circ}$ Cで30分インキュベートし、オルガノイド培地を1ml加え、オルガノイド培地にはWnt、R-spondin、Nogginのコンディション培地、B27などの抗酸化剤、EGF、TGF β 阻害剤などを含めた。ROCK inhibitorを加え3日間培養した。

②大腸癌オルガノイドの継代

撒いて1週間後、オルガノイドをTrypLEで回収し、37 $^{\circ}$ C 5分間インキュベートして単細胞化し遠心チューブでWash後、遠心しマトリゲルで懸濁。それを上記と同様にプレートに撒いた。

③移植

通常の継代を行ったオルガノイドについて12wellプレートの3well分を1つのオルガノイドサンプルとし、TrypLEでマトリゲルを分散させたのち、10%マトリゲル入りの200 μ lオルガノイド培地で懸濁。塩酸メドミジン、ミダゾラム、酒石酸ブトルフェノールの3剤で麻酔したNSGマウスへ移植した。移植後、メドミジン拮抗薬で覚醒させ28日間飼育後、安楽死させたのち開腹しオルガノイドの生着を肉眼的、病理組織学的に評価する。

4. 研究成果

(1) 光線照射装置を用いた癌細胞の殺細胞効果の評価

生体環境での光線の透過性低下を補える殺細胞効果を得るため、5ALA に波長の異なるレーザー照射を用いて癌細胞の殺細胞効果の評価実験を行い、赤色波長のパルスレーザー（40MHz、100mW/cm²）において殺細胞効果が得られた。光線照射域が狭いためより広い範囲での殺細胞効果を得るために Raster scan 法で操作するガルバノミラー（400Hz）を用いた光線照射装置を準備し、光線照射域を 10mm×5mm に拡大して 5 分間照射しコロニーを 24 時間後に観察しその消失の有無を確認した。

わずかなコロニーの縮小を認めしたが、浮遊、消失の所見は認められず、殺細胞効果は限定的であると判断した。拡大照射および、培養液による光線吸収に伴う単位面積あたりのエネルギー量の低下が殺細胞効果を発現できなかった理由として考えられた。追加出力に必要な装置の構築が今後の課題として明らかとなった。

(2) 癌細胞を用いたオルガノイドの作成とそれに対する光線照射によるオルガノイドに及ぼす効果の評価

大腸癌患者から採取したヒト大腸粘液癌細胞（mucinous carcinoma, signet-ring cell carcinoma）および正常腸管上皮細胞を用いたオルガノイドの構築を行い、粘液癌のオルガノイド作成に成功した（図 1）。オルガノイドの増殖能にはバラツキが大きく、1-3 ヶ月間で一定の大きさに培養液内で成長することが判明した。さらに生体内で癌微小環境構築のため NSG-scid mouse の腹腔内に吸入麻酔下にオルガノイドを移植した。28 日間飼育後、安楽死させたのち開腹しオルガノイドの生着を肉眼的に評価した。解剖した全症例で腹膜播種所見や腫瘤形成所見など粘液癌の生着を示す腫瘤形成は腹腔内に認められなかった。粘液癌細胞は臨床検体が少なく、効率良いオルガノイドの作成が困難であることに加え、今回用いた粘液癌のオルガノイドのマウスへの生着は困難であったことから、今後は生着に必要な因子の解析を進めるとともに、すでに構築できている食道癌患者より採取した癌細胞で作成したオルガノイドを用いて、まずはオルガノイドを用いた癌微小環境構築マウスを作成することを目標として、方針を変更した。癌微小環境構築マウスの作成が完成したのちレーザーのエネルギー出力を増加させる装置とガルバノミラーを用いた光線照射装置を用いて生体微小環境における光線照射の癌抑制効果を調べる方針としている。

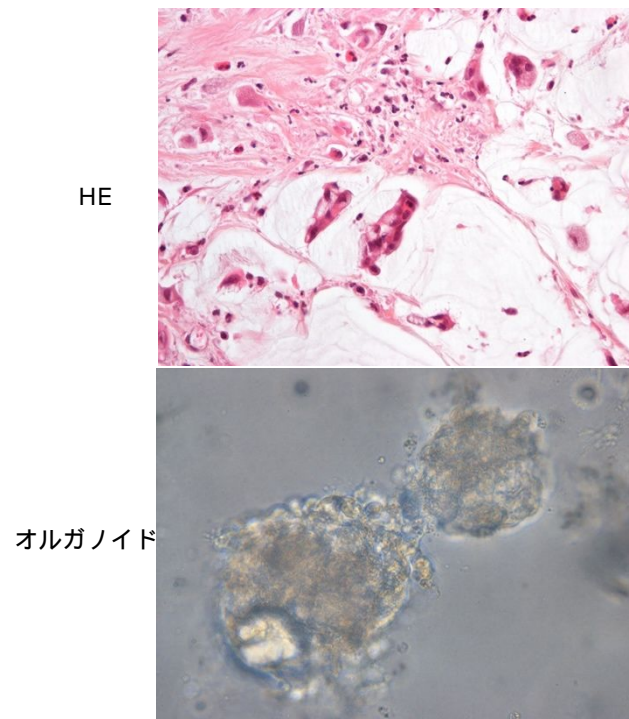


図 1 粘液癌 (mC9)の HE と
オルガノイド像

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔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
研究分担者	猪股 雅史 (Inomata Masafumi) (60315330)	大分大学・医学部・教授 (17501)	
研究分担者	衛藤 剛 (Etoh Tsuyoshi) (00404369)	大分大学・医学部・准教授 (17501)	
研究分担者	白下 英史 (Shiroshita Hidefumi) (50596955)	大分大学・医学部・講師 (17501)	
研究分担者	赤木 智徳 (Akagi Tomonori) (80572007)	大分大学・医学部・助教 (17501)	
研究分担者	大嶋 佑介 (Oshima Yusuke) (10586639)	富山大学・学術研究部工学系・准教授 (13201)	

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