

令和 6 年 6 月 25 日現在

機関番号：82713

研究種目：基盤研究(C)（一般）

研究期間：2021～2023

課題番号：21K07209

研究課題名（和文）腫瘍内不均一性を反映したシングルセルオルガノイド培養系の構築と薬剤耐性機構の解明

研究課題名（英文）Establishment of single-cell organoid culture system and elucidation of drug resistance mechanisms.

研究代表者

星野 大輔（Hoshino, Daisuke）

地方独立行政法人神奈川県立病院機構神奈川県立がんセンター（臨床研究所）・その他部局等・部門長

研究者番号：30571434

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,300,000円

研究成果の概要（和文）：がん治療を困難にしている原因として腫瘍内不均一性があげられる。これまでに、臨床検体を用いた病理学的解析と遺伝学的解析により腫瘍内不均一性の理解が深まってきたが、その生物学的特性にまで踏み込んだ研究は多くない。この原因として、腫瘍組織と同程度の腫瘍内不均一性を保持した培養細胞株の欠如があげられる。そこで本研究では、最初に、申請者が樹立した難治がん患者由来オルガノイド培養株を基軸として、シングルセルオルガノイド培養株を樹立した。次に、樹立したオルガノイド培養株の抗がん剤投与前後と元の保存組織を用いて遺伝学的解析、病理学的解析と網羅的シグナル伝達変動解析を行った。

研究成果の学術的意義や社会的意義

これまでに、切除検体と同程度に腫瘍内不均一性を維持できている培養細胞株はない。本研究では、これまでに申請者が樹立した難治がん患者由来PDOから、シングルセルPDOを樹立し、それらを用いて腫瘍内不均一性に基づいた薬剤耐性機構の解明を目的とした。これまでにシングルセル PDO 樹立の報告はなく、独自性の高い研究であるといえ、そこから得られた研究結果は学術的意義が高く、将来的に臨床応用できれば社会的意義も高いと思われる。

研究成果の概要（英文）：Intratumor heterogeneity (ITH) is one of the factors that make cancer treatment difficult. Although pathological and genetic analyses using clinical specimens have deepened our understanding of ITH, few studies have explored its biological characteristics. One of the reasons for this is the lack of cultured cell lines that retain the same level of ITH as tumor tissue. In this study, we first established single-cell organoid culture lines based on organoid culture lines derived from patients with intractable cancer that we established. Next, we performed genetic and pathological analyses and comprehensive signal transduction variation analyses using the established organoid culture lines and the originally preserved tissues before and after anticancer drug administration.

研究分野：がん生物

キーワード：オルガノイド 薬剤耐性

1. 研究開始当初の背景

がん治療を困難にしている原因として腫瘍内不均一性があげられる。これまでに、臨床検体を用いた病理学的解析と遺伝学的解析により腫瘍内不均一性の理解が深まってきたが、その生物学的特性にまで踏み込んだ研究は多くない。この原因として、腫瘍組織と同程度の腫瘍内不均一性を保持した培養細胞株の欠如があげられる。そこで本研究では、最初に、申請者が樹立した難治がん患者由来オルガノイド培養株を基軸として、シングルセルオルガノイド培養株を樹立する。次に得られた条件を基に、難治がん手術検体から完全型シングルセルオルガノイド培養株を樹立することで、増殖の遅いがん細胞も含めたシングルセルオルガノイド培養株の樹立を試みる。最後に、樹立したオルガノイド培養株の抗がん剤投与前後と元の保存組織を用いて遺伝学的解析、病理学的解析と網羅的シグナル伝達変動解析を行い、難治がんの腫瘍内不均一性に基づいた抗がん剤耐性機構の解明を目指す。本研究で樹立するオルガノイド培養株によって、これまでに解析が困難であった腫瘍内不均一性の生物学的理解が深まり、腫瘍内不均一性を考慮した新規治療法開発が加速されるものと期待される。

2. 研究の目的

これまでに、切除検体と同程度に腫瘍内不均一性を維持できている培養細胞株はない。本研究では、これまでに申請者が樹立した難治がん患者由来 PDO から、シングルセル PDO を樹立し、それらを用いて腫瘍内不均一性に基づいた薬剤耐性機構の解明を目的とする。

腫瘍内不均一性と薬剤耐性機構の関係は複雑で、遺伝的か非遺伝的か、自然耐性が獲得耐性か、一過的耐性か安定的耐性かなど、多くの現象により成り立っている。本研究では、将来的にこれらの現象を包括的に解明するためのツールとしてシングルセルオルガノイド (PDO) 培養系の樹立とその抗がん剤感受性評価を行うことを目的とする。

3. 研究の方法

樹立済み PDO からシングルセル PDO の樹立

本研究では難治がんとして、甲状腺未分化癌 PDO とトリプルネガティブ乳がん PDO をそれぞれ 5 株ずつ使用して以下の研究を行った。甲状腺未分化癌 2 症例とトリプルネガティブ乳がんの 1 症例は抗がん剤感受性の臨床結果がでている。

限界希釈によるシングルセル化

樹立済み PDO を限界希釈して 96 ウェルでオルガノイド培養する。翌日、顕微鏡下でシングルセルとなっているウェルに印をつけ、今後は印のあるウェルの拡大培養を試みる。各株、30 クローンを取得を目指す。

樹立済み PDO とシングルセル PDO の病理学的解析と遺伝学的解析

甲状腺未分化癌は甲状腺分化癌から未分化転化すると考えられていることから、樹立済み PDO にも甲状腺分化癌が混在している可能性がある。そこで、甲状腺分化癌マーカーであるサイログロブリンと pax 8 および、多くの甲状腺未分化癌で亢進されていることが知られている ki67 と p53 の免疫染色を行う。一方、トリプルネガティブ乳がんでは hormone receptor である ER や PgR、さらに HER2 の免疫染色を行いサブタイプの解析を行う。

また、特徴的な遺伝子変異の有無を所属する施設が保有する遺伝子パネル (51 種類の癌遺伝子変異が解析できる) で評価する。

4. 研究成果

限界希釈によるシングルセル化として、樹立済み PDO を限界希釈して 96 ウェルでオルガノイド培養した。翌日、顕微鏡下でシングルセルとなっているウェルに印をつけ、今後は印のあるウェルの拡大培養を試みた。各株、100 クローン以上取得した。

樹立済み PDO とシングルセル PDO の病理学的解析と遺伝学的解析として、甲状腺分化癌マーカーであるサイログロブリンと pax 8 および、多くの甲状腺未分化癌で亢進されていることが知られている ki67 と p53 の免疫染色を行った。また、特徴的な遺伝子変異の有無を所属する施設が保有する遺伝子パネル (51 種類の癌遺伝子変異が解析できる) で評価した。

このようにして樹立したシングルセル PDO に対して、いくつかの抗がん剤を投与して、薬

剤応答性を調べたところ、クローン間で、応答性にバラツキが生じた。しかしながら、このような薬物応答性と遺伝子変異の有無が必ずしも一致しているわけではなかった。

最後に、生検検体からのシングルセル PDO を以下の手順で実施した。

検体の 1/3 を病理解析、1/3 を凍結保存し、残りをオルガノイド培養に使用した。これまでに申請者が確立した樹立方法を基にシングルセル PDO の樹立を行っ

た。具体的には、1 型と 4 型コラーゲン分解酵素処理とトリプシン処理を数日に分けて複数回行うことで、組織塊から細胞のシングル化を試みた。赤血球は溶血

バッファーを用いて除去するが、その他の正常細胞も含まれるため、多くのシングルセルカ

ルチャーを作成したところ、検体によっては線維芽細胞の増殖が多く

困難であったが、工夫をすることで改善された。

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

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