

科学研究費助成事業 研究成果報告書

令和 6 年 6 月 6 日現在

機関番号：14401

研究種目：基盤研究(C)（一般）

研究期間：2021～2023

課題番号：21K08616

研究課題名（和文）ex vivo腫瘍モデルの構築と腫瘍間質を形成するメカニズムの解明

研究課題名（英文）Reconstruction and the analysis of tumor stroma using ex vivo tumor model

研究代表者

三吉 範克（Miyoshi, NorikatNorikatsu）

大阪大学・大学院医学系研究科・助教

研究者番号：20528624

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,000,000円

研究成果の概要（和文）：当グループが構築した初代培養細胞のex vivo培養モデルを用いて検討した。間質細胞の特長を解析するべく、蛍光ベクターを用いて標識したがん細胞を作製した。セルソーターを用いてがん細胞と腫瘍間質細胞を分離、シングルセル解析を行ったところ、特徴的ながん関連線維芽細胞の集団のクラスター群を同定した。がん細胞とがん関連線維芽細胞とのインタラクションについて解析するべく、リガンド-レセプターのシグナルに基づいて解析した。同定されたシグナルについて共培養系を用いて評価したところ、特定のリガンドについては腫瘍間質に作用することでがん細胞の増殖能、腫瘍形成能に寄与することが示された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

既存のがん細胞そのものをターゲットとした治療のみならず、がん周囲組織も含めた腫瘍全体を対象とする治療戦略が、臨床的な治療効果をもたらす可能性を示す研究成果と考える。遺伝子パネルなどがんそのものに対する個別化治療が進む中、がん細胞自体の解析結果によって選択される既存の治療では奏功しない悪性腫瘍に対して、個々の患者由来培養細胞を用いた解析モデルを用いることで、腫瘍とその周囲組織を支える細胞をターゲットとした新規の治療開発が可能になるのではないかと期待される。

研究成果の概要（英文）：In our study, we utilized the original ex vivo cultured cell model developed by our group. To analyze the characteristics of the stromal cells, we created fluorescently labeled cancer cells using a vector. Using a cell sorter, we separated the cancer cells from the tumor stromal cells and performed single-cell analysis. This analysis identified clusters of distinct cancer-associated fibroblasts. To further investigate the interactions between cancer cells and cancer-associated fibroblasts, we analyzed based on ligand-receptor signaling. Evaluating the identified signals through a co-culture system, we demonstrated that specific ligands acting on the tumor stroma contribute to the proliferative and tumorigenic capabilities of the cancer cells.

研究分野：腫瘍学

キーワード：がん 悪性腫瘍 培養細胞

様式 C - 19、F - 19 - 1 (共通)

1. 研究開始当初の背景

臨床的にがんの根治を目指す場合、個々の患者の「がん組織」に応じた治療法の選択が望まれる。外科切除や放射線治療などの局所治療が第一選択となることも多いが、がん治療の困難さは再発・遠隔転移の制御にあり、この場合全身化学療法のような治療薬の適切な選択が迫られる。われわれは、実際の個体内における患者がん組織の多様性を保持した *ex vivo* モデルを構築できないかと考えた。

初代培養の樹立は古くから取り組まれており、近年ではオルガノイドなど 3 次元培養法が報告されている。悪性腫瘍から細胞を採取して 3 次元培養法にて維持されている細胞集団はがん細胞のみの集団と考えられ、腫瘍間質を含む「本来の生体内のがん組織」ではないこと、シングルセル解析や薬剤感受性試験など解析の種類によっては従来の細胞株を操作するのとは異なり手技的に困難な点がある。マウスなどの動物モデルを用いてこれに腫瘍を移植する *patient-derived xenograft* (PDX) モデルでは、マウス個体の細胞の混在などの解析上の問題もあるが、腫瘍を構成するがん細胞以外に周囲を支持する組織および細胞を含めて対象とすることができ、臨床的な「がん」の状態に類似した状況を創出することが可能となる。腫瘍オルガノイドの特徴と PDX モデルを組み合わせることで、多様性を持つがん組織の不均一性を *ex vivo* で解析することが可能になるのではないかと考え、「操作性の高い初代培養がん細胞」と「がん間質」を融合させたモデルの構築を考えた。

われわれはこれまでに個体差のあるがんの治療上の課題を克服するべく、より再現性と効率の良い初代培養を確立することを目的として研究を行ってきた。現在までに構築してきた初代培養法を用いることで、臨床検体の組織像と非常に類似したがん細胞モデルを作製することが可能となった。このがんのアバターモデル (2D オルガノイド: 2DO) について、個々の症例の薬剤感受性試験の前向き観察研究も行っている。本手法では従来の細胞株とは異なり、臨床と非常に近い形態の生きたがん細胞を模倣していること、3 次元オルガノイド法と同様に個体を反映したモデルでありながら、細胞株のようにシングルセルレベルで解析できることや解析結果のばらつきが少なく (3 次元で構成される細胞塊を破砕する際のダメージが無く、評価が安定することなど) 操作性の高いことが利点として挙げられる。

本研究課題ではこの培養法をさらに拡張させオルガノイドと PDX を融合させた *ex vivo* モデルを構築して解析することで、治療の困難な病態の本態となる「腫瘍不均一性」と難治の要因の一つと考えられる「がん間質形成のメカニズム」を探求する。

2. 研究の目的

本研究では *ex vivo* 腫瘍モデルを作製し「がん細胞」と腫瘍周囲の「正常間質」が悪性転化や維持に関わる「がん間質」へ変化するメカニズムを明らかにすることを目指す。

3. 研究の方法

臨床検体として、がん患者の腫瘍組織を手術もしくは検査の際に採取し、当グループで行ってきた初代培養方法によって *in vitro* で培養を行う。その後、安定的に培養された初代培養がん細胞 (腫瘍オルガノイド) について、免疫不全マウス (NOD/SCID マウス: 日本クレア株式会社) に移植し、腫瘍形成を観察した後、短径 10mm を超えたところで腫瘍を切除して解析を行う。

腫瘍オルガノイドについて、次世代シーケンサー（NextSeq, HiSeq：イルミナ株式会社）を用いて遺伝子変異解析・発現解析を行なった。

個別の遺伝子についてはPCR及び免疫染色等を用いて元の臨床検体やin vitroで培養した細胞株とも比較検討を行なった。

培養細胞については表面マーカー解析と分離（Sony SH800：ソニー株式会社）を行い、シングルセル解析を進めた（10xGenomics社）。

培養細胞を用いて臨床的效果を認める薬剤について感受性試験を行い評価した。

培養細胞に蛍光ベクターをトランスフェクションさせたものを用意して、PDXを作製後に腫瘍を採取、がん細胞とがん間質の分離を行なった。

分離されたがん間質を用いてがん細胞との間接/直接共培養を行い、がん間質細胞の存在下でのがん細胞の悪制度の評価を行なった。

4．研究成果

患者検体からオルガノイドを樹立し、次世代シーケンサーを用いて解析したところ、遺伝子変異解析については手術及び検査検体の解析結果と同様の結果であったが、遺伝子発現解析の結果からはがん幹細胞に特徴的なクラスターの存在が確認された。

オルガノイドを免疫不全マウスに移植後、形成された腫瘍の病理組織像を観察したところ、臨床検体に類似した「がん間質」が再構築されていた。この間質細胞の特長を解析するべく、蛍光ベクターを用いて標識したがん細胞を作製し、免疫不全マウスにがん細胞を移植後、形成された腫瘍を採取、分離した。腫瘍を粉碎し、当グループで構築した初代培養細胞樹立のプロトコルに従って各細胞を分離後、セルソーターを用いてがん細胞と腫瘍以外の細胞（間質細胞等）に分離した。

この分離された腫瘍以外の細胞について、シングルセル解析を行なった。シングルセル解析によってこれらの細胞集団はいくつかのクラスターに分類されることが示され、公的データベースに報告されている臨床検体の間質細胞に対するシングルセル解析の結果と比較したところ、がん関連線維芽細胞として特徴的な2つのクラスターを確認することができた。

このクラスターについて腫瘍細胞と間質細胞のインタラクションを解析した結果、がん細胞とがん関連線維芽細胞に関連性を認めるいくつかの増殖因子の存在が明らかとなった。これらの遺伝子について大腸癌切除検体の臨床標本を用いて免疫染色を行い、臨床での治療効果との比較検討を行なった。

がん細胞とがん関連線維芽細胞において双方に関連する遺伝子群を抽出することができ、このパスウェイを阻害するような薬剤をin vitro/ex vivoで投与することで増殖抑制効果を認めたことから、従来の殺細胞性抗がん剤や分子標的治療薬と同様に、抗腫瘍効果を期待できることが示唆された。がん細胞以外のターゲットとしてがん関連線維芽細胞を治療標的とした薬剤の組み合わせが臨床的に有用な可能性が期待される。

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	水島 恒和 (Mizushima Tsunekazu) (00527707)	大阪大学・大学院医学系研究科・招へい教授 (14401)	
研究分担者	土岐 祐一郎 (Doki Yuichiro) (20291445)	大阪大学・大学院医学系研究科・教授 (14401)	
研究分担者	江口 英利 (Eguchi Hidetoshi) (90542118)	大阪大学・大学院医学系研究科・教授 (14401)	

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