

日本医療研究開発機構 創薬基盤推進研究事業 事後報告書

I 基本情報

研究開発課題名：新規がん細胞培養技術の確立を目指した研究

A novel primary culture method for patient-derived cancer cells

研究開発実施期間：2017年5月1日～2020年3月31日

研究開発代表者 氏名：三吉 範克

Norikatsu Miyoshi

研究開発代表者 所属機関・部署・役職：

地方独立行政法人大阪府立病院機構大阪国際がんセンター がん医療創生部 プロジェクト
リーダー

Osaka International Cancer Institute, Department of Innovative Oncology research and
Regenerative Medicine, Project leader

II 研究開発の概要

(1) 研究開発の目的と内容

Precision medicine に代表されるように、個々の患者の「がん組織」に応じた治療薬の選択が望まれている。基礎研究から発信する translational research としてこれを実現する方法のひとつに、がん細胞の初代培養に焦点を当てた。本研究ではがんの性質を保持したがん細胞を臨床検体から *in vitro* で安定して樹立すること、培養細胞に見られる特徴的な character の解析、樹立したモデルを用いた薬剤感受性試験、新規バイオマーカーの探索を行った。本研究のがん細胞培養モデルは、実臨床における個別化治療の実現につながる結果をもたらすものとする。

(2) 研究結果

1) 臨床検体からのがん細胞の分離、初代培養の確立と安定化

・ *in vitro* がん細胞培養モデルを構築するための培養方法の確立と検証、適応可能ながん腫についての検討、このモデルを用いた治療薬の評価（実験系の方法と評価の確立）について研究をすすめた。当初、培養を開始した際には樹立効率が40%以下であったが、培養液の組成等を変更してより効果的な培養法の構築をすすめるべく検討を行い、85%以上の向上を図ることができた。現在はさらにながん腫に応じた培養組成について検討を進めている、具体的には個々の臓器に由来する niche について培養液の組成の検討を行っている。得られた培養細胞に関しては免疫不全マウスへの移植を行い、形態学的評価を合わせて行っている。

(図1は培養したがん細胞と元のがん組織との比較。文献1の Figure 1A より改変)

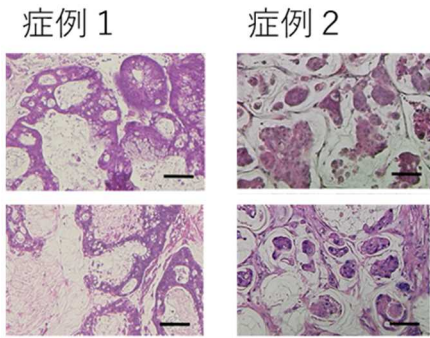


図1：大腸がん組織の培養結果
 (右列と左列は別のサンプル)
 (上段) 採取して培養した状態の培養皿内での観察
 (下段) 元の臨床検体のがんの組織像

また培養されたがん細胞は、一般的ながん細胞株と呼ばれる市販されているような不死化した細胞集団とはことなる発現パターンを示しており、本研究で構築した方法によればがんの多様性を失うことなく培養維持できるということが示された。(図2は同がん種での、培養した臨床検体由来がん細胞と一般的ながん細胞株との比較。文献の Figure 2 より改変)

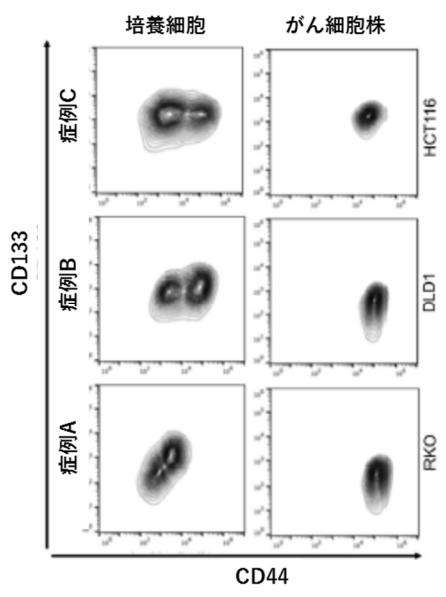


図2：培養したがん組織と一般的ながん細胞の表面マーカーの比較 (がんの種類は同じ)
 (右列) 本研究で構築した培養方法を用いて増殖させたがん細胞の表面マーカー解析結果。がん細胞の集団は多様性を持つ集団であることが伺える。
 (左列) 一般のがん細胞株ではがん細胞株では培養したがん細胞の組織像

2) 樹立した培養細胞の遺伝子解析

遺伝子発現解析 (マイクロアレイ解析、PCR 解析、次世代シーケンサー解析)、遺伝子変異解析 (BNA-PCR 解析、次世代シーケンサー解析) を行い、元の検体を対象として培養細胞におけるそれぞれの変化について検討した。培養したがん細胞は元のがん組織検体のキャラクターを反映するモデルであることが示された。この培養がん細胞において中心的な役割を果たす細胞について解析した。特徴的ながん幹細胞を同定するべく表面マーカー解析を行ったが、結果は一般的な解析では特徴的な細胞集団を同定することはできなかった。次世代シーケンサー解析なども行い、様々な遺伝子発現を示す細胞集団を対象として解析をすすめた結果、現在、がん細胞培養の維持効率に関わる数種の特徴的な細胞集団を同定することができるようになってきた。現在、この特徴的ながん幹細胞集団について細胞集団を中心とした表面マーカー解析を行い細胞の分離の後、培養を継続することで、腫瘍の多様性が形成され、また治療抵抗性に深く関与している可能性も示唆されている。一方、解析の結果から、この培養するがん細胞集塊において間質細胞も 1%程度存在しており、腫瘍の多様性と治療抵抗性に深く関与している可能性が示唆された。現在これらの細胞をターゲットとした治療効果についても検討している。

3) 樹立した in vitro がん細胞を用いた薬剤感受性試験

in vitro で培養したがん細胞の増殖を、臨床的に用いることのできる薬剤を添加した状態で観察し、臨床での治

療効果と比較検討した。その結果、培養細胞を用いることで治療後 3-6 か月後の治療効果を予測できる可能性があることが示された。現在 80%程度の確立でこの治療効果が予測できることが示されているが、今後さらに症例検討を重ねていくことで予測精度の向上が期待できると考えている。

(3) 本研究の意義

本研究課題で樹立した培養モデルを用いて、抗がん剤を含む化学療法の治療効果予測を行うことができると考えている。また新規治療薬の開発についても本モデルを用いてその探索が *in vitro* で行えるものと期待される。さらに実臨床の現状を考えると、放射線な重要な治療アームの一つであり、放射線治療に難渋するがん細胞の分子メカニズム等も明らかにするべく、新たな研究計画を追加して検討したいと考えている。

参考文献)

1. Fujino S, Ito A, Ohue M, Yasui M, Mizusima T, Doki Y, Mori M, Miyoshi N (corresponding author). Phenotypic heterogeneity of 2D organoid reflects clinical tumor characteristics. **Biochem Biophys Res Commun**. 2019 May;513(2):332-339.

Unlike established cancer cell lines, tumors and primary cultured cells have phenotypic heterogeneity. These primary culture of cancer cells derived from each patient's tumor can provide important information of the individual clinical tumor. It is general and easy to use cell lines in basic research field. However, the characters of cell lines are quite different from clinical tumors and it is impossible to translate the individual clinical courses. We tried to optimize the primary culture method of clinical cancers in gastrointestinal field, leading to the tool for the assessment of the clinical treatment and the courses. We have developed a simple 2D/3D-culture method for primary cancer. Clinical samples were obtained from surgically resected specimen, as we started from colorectal cancer (CRC) specimens. They were mechanically and enzymatically digested and fibrotic tissue and bacteria were excluded using customized filter(s). And we cultured the obtained cells on a Matrigel-coated plate with chemically defined ES-culture medium reported in our previous reports and modified. We named these cultured cancer cells, "isolated-tumor derived Cancer Cells (iCCs)." All iCCs grew and about 85 % of iCCs were successfully passaged. Maintained iCCs were transplanted into the subcutaneous layer of nonobese diabetic/severe combined immunodeficiency (NOD-SCID) mice, and the tumor growth and histology of iCCs were examined. The morphology was similar to each parental clinical tumor. And microarray analysis (SurePrint G3 Human GE 8×60K Microarray v2, Agilent)) and next-generation sequencing (Next-Seq 550) showed that RNA expression of iCCs was similar to each parental tumor. Next, we examined the culture medium; our modified stem-cell culture medium (Stem-cultured iCCs) and 10% FBS medium (FBS-cultured iCCs). The expression of surface markers regarding cancer stem cells such as CD44 and CD133 were different. Several niche factors that were previously reported in establishing colon and colorectal cancer organoids, helped some iCCs but not all of them. Furthermore, multi-drug sensitivity assay by using bespoke plates including commonly used as anti-cancer drugs was performed. The results showed different sensitivity between iCCs and cell lines. And there is clear correlation between the results of cultured iCCs and clinical outcomes. We also examined our method in other cancers such as breast, lung, esophageal, gastric, pancreatic, ovarian tumors. They were able to be cultured, and the morphology was also similar to each parental clinical tumor. And iCCs were maintained in 2D/3D-culture method with sphere shape. However, the efficiency (successful passage, culture, and maintenance rates) varies in these tumor species. Our method seems to be simple and useful, and the cultured model is very similar to each parental tumor, leading to the personalized medicine and analyses of tumor characteristics, which is useful tool for the clinical examination for the treatments.