

創薬基盤推進研究事業 研究開発課題 事後評価報告書

研究開発課題名	ヒトへの外挿性を向上させた培養細胞資源開発と供給体制整備
代表機関名	国立研究開発法人医薬基盤・健康・栄養研究所
職名	研究リーダー
研究開発代表者名	小原 有弘
全研究開発期間	平成 28 年度～令和 2 年度

1. 研究開発成果

創薬・疾患研究において細胞等の生物資源は欠くことのできない研究ツールとなっている。しかし、創薬・治療法開発は急速に変化しており、研究に必要な多様性のある疾患の特徴をよく表現した資源ラインナップの確保は十分とは言えず、患者における効果・毒性を十分に評価できる資源の開発・拡充は喫緊の課題である。

本研究では実施施設の特徴(世界に誇る高品質細胞の供給, 保有資源数 3900 種以上、年間供給数 4200 本)を活かし、PDX (Patient-Derived Xenograft) 技術と CTOS (Cancer Tissue-Originated Spheroid) 技術を融合し、これまで開発が困難であった前立腺がん、膵臓がん、乳がん等のヒトへの外挿性を向上させた高品質な生物資源の開発・供給体制整備を目指して以下の課題に取り組んだ。

1. 創薬・疾患研究に必要な資源の確保と維持・増殖

これまで膵臓癌 20 例、前立腺癌 6 例 (15 組織)、乳癌 24 例、また、希少癌についても消化管間質腫瘍 (GIST) 4 例 (9 組織) と卵巣癌 5 例、下部胆管癌 1 例、肝細胞癌 4 例、腎癌 3 例等をマウスに移植することにより、維持・増殖させるとともに、増殖した資源の凍結保存を行った。前立腺癌は腹腔内移植 腹水がん樹立を Super-SCID で実施することができた。乳癌に関しては令和元年度開発した新移植法を用いて重点的に実施した結果、多くの PDX 樹立および凍結保存に成功し、組織培養化の可能性が見出せた。希少がん、特に GIST 資源については公的バンクに登録されている培養資源が無く、これら資源の確保は大きな成果である。さらに樹立できた膵癌細胞株 2 株、乳癌細胞株 1 株について Super-SCID マウスに戻し移植したところ、患者及び PDX 組織像を完璧に反映した細胞株であることが確認できた。

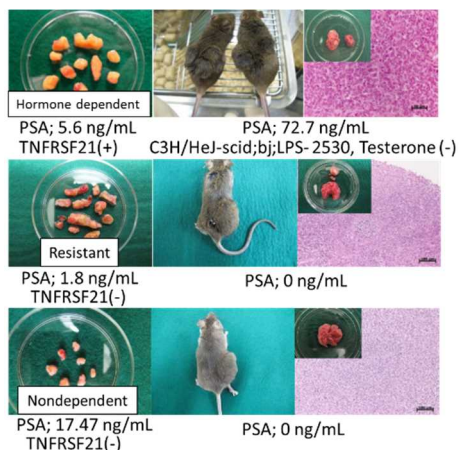


図1 前立腺がん試料の特徴ホルモン依存性、抵抗性、非依存性の資源を確保



図2 消化管間質腫瘍(GIST)試料 CD34 陽性、c-kit 陽性

2. ヒトへの外挿性を向上させた細胞資源開発

これまで膵臓癌 7 組織、乳癌 16 組織、前立腺癌 15 組織、卵巣癌 5 組織、GIST9 組織、胆管癌 2 組織、腎癌 2 組織、肝内胆管癌 1 組織について、CTOS を調製・培養し保存することができた。特筆すべき成果は I) CTOS 調製と培養が良好であった PSA 発現陽性前立腺癌 CTOS を用いて、前立腺癌の診断に有用と考えられるマーカーを上清中のレクチン画分に見出した (Ideo 2020 SciRep)。II) CTOS 調製が困難であった膵がん、GIST、乳がんの PDX からの調製・培養条件の最適化に成功したことである (投稿準備中)。このことにより乳癌 PDX5 例 (ER 陽性 4 例、HER2 陽性 1 例) の CTOS 化を行った。全例で CTOS 化に成功し、感受性試験 (Paclitaxel, Palbociclib) を行い CTOS 間の多様性を示すことができた。これらの成果は細胞資源が乏しい GIST や、すべてのサブタイプを網羅している乳がんなどの PDX は貴重な生物資源であり、これらが ex vivo で利用可能になった価値は、本研究の目的である、「CTOS 法のヒトへの外挿性」に照らして大きいと考えられる。

これら開発資源を用いた既存薬剤評価系との比較による有用性の比較検討においても、大腸がんと卵巣がん、乳がんについては培養可能なすべての例で CTOS による薬剤感受性試験が実現可能であった。大腸がんは 30 例の CTOS パネルで薬剤感受性を評価し、それをレファレンスとして、新規検体の感受性をランキングする方法を開発し、本プロジェクトの個別 PDX にも応用可能であることを示した。

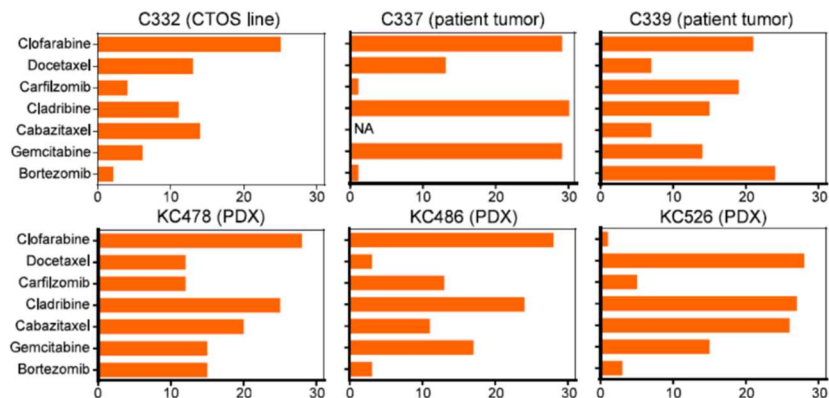


図3 CTOSによる薬剤感受性試験結果 (Kondo 2019 Cancer Sci)

3. 細胞品質管理・特性解析と供給体制整備

樹立できた細胞を中心にがん関連遺伝子のプロファイル情報を取得するため、簡易型次世代シーケンサー (Ion Torrent) を用いたリシーケンスを行って情報充実に図った。まず、PDX 由来試料においてはマウス間質等の混入によるマウス由来配列の混入が認められたため、これを排除できるような独自プライマー設計を行い、リシーケンスの精度向上を確立した。本プロトコールにより、資源のがん関連遺伝子を網羅性をもってプロファイルすることができた。現在最終のがん関連遺伝子解析中であり細胞情報とともに集積した。

表1 膵臓がん細胞における k-ras と p53 遺伝子変異のプロファイル(例)

Cell Line	k-ras		p53	
1	codon12	GGT(Gly) → GTT(Val)	codon175	CGC(Arg) → CAC(His)
2	codon12	GGT(Gly) → GAT(Asp)	codon248	CGG(Arg) → CAG(Gln)
3	codon12	GGT(Gly) → GAT(Asp)	codon248	CGG(Arg) → TGG(Trp)
4	codon12	GGT(Gly) → GAT(Asp)	codon133	ATG(Met) → AAG(Lys)
5	codon12	GGT(Gly) → GAT(Asp)	codon245	GGC(Gly) → AGC(Ser)
6	codon12	GGT(Gly) → GTT(Val)	codon175	CGC(Arg) → CAC(His)
7	codon12	GGT(Gly) → GAT(Asp)	codon253	ACC(Thr) → CCC(Pro)
8	Wt		Wt	
9	Wt		codon135	TGC(Cys) → TAC(Tyr)
10	codon12	GGT(Gly) → CGT(Arg)	Wt	-

資源情報に関するデータベースを準備するとともに資源プロファイル情報をデータベース化した。PDX 資源のリストについては本研究期間中に開発した資源を含む 246 種の PDX 資源リストを公開し、PDX 提供事業の事業規程を整備し提供可能とした。

(プレスリリース <https://www.nibiohn.go.jp/information/nibio/2020/10/006626.html>)



図 4
PDX 資源リストのデータベース公開
(https://ahmhccdd.nibiohn.go.jp/cgi-bin/pdx_list.cgi)

創薬・疾患研究に重要な研究ツールである生物資源を有効に活用するため微生物汚染の有無や程度を迅速・網羅的に評価する手法の開発を実施した。まず、検査対象微生物をリストアップし、多種類微生物を網羅的・迅速・高感度に検査可能な検査できる体制を整備した。使用した検査系は、ウイルス(HIV・HTLV・HHV1 - 8・JCV・BKV・HBV・HCV・B19・ADV・WNV を検出可能)・マイコプラズマ(細胞資源から頻度高く検出されるマイコプラズマを含め 142 種類を検出可能)・インシリコ)・細菌(ヒトに感染する細菌や研究環境に存在する細菌を網羅的に検出可能)・真菌(ヒトに感染する真菌や研究環境に存在する真菌を網羅的に検出可能)の 4 つの独立した検査系である。細菌・真菌の集菌効率を上げるためマイコプラズマ用に市販されている集菌材を用いて効率よく集菌できる(遠心操作のみではほとんど回収できない菌種の回収も集菌材 + 遠心で集菌可能)ことが確認され、細菌・真菌検査の高感度化と信頼性向上に繋がる成果が得られた。上記 4 つの検査系について、様々な細胞株(ヒト・マウス・ラット・ハムスター・サル由来)の微生物検査への適用に関する研究を行った。検査対象の細胞核酸との交差反応性はなく 1 時間程度で 10 コピー / 反応の感度で各微生物由来核酸を検出できることが確認できた。今後免疫不全動物へヒト組織・細胞を生着させたヒト化動物の創薬研究への応用が加速すると考えられるが、本成果はそのような研究自体の品質・信頼性確保に資する成果である。

本研究の発展として細胞株等の生物資源における細菌とマイコプラズマの同時検出が可能な網羅的細菌検査系の構築を実施している。これまでの結果においてはマイコプラズマの単独検査系と比較して一部のマイコプラズマの検出感度が劣ることが判明した。現在、細菌検査系にマイコプラズマ特異的プライマー・プローブを追加してマイコプラズマの検出感度を上げることを検討している。また、リアルタイム PCR による微生物検出・定量の信頼性向上を目指し、PCR の増幅領域を酵母に組み込み、酵母の個数を光学的に計測することにより正確な濃度の陽性コントロールを作成する手法(リコー社の開発技術)の有用性を検討した。マイコプラズマの検出領域を組み込んだ酵母(リコー社に依頼して作成)を使用した実験により、従来手法による定量(手作業で 10 倍階段希釈した陽性コントロールを使用)よりも正確な定量結果が得られ、定量の信頼性向上に繋がることが確認された。本手法は機器の性能を担保するための検証系としても利用できるため、全般的なリアルタイム PCR による検査結果の向上への寄与が期待できる。

本研究では遺伝子導入によるルシフェラーゼ(Luc)発現細胞を充実化することにより既存細胞資

源を高度化する狙いがある。近年の細胞培養技術の高度化にともない各種遺伝子導入技術を比較検討しながら Luc 発現細胞資源を作製してきた。Luc 発現細胞の充実化において、研究開発代表者と連携しながら 16 種類の細胞が作製され、JCRB 細胞バンクへの寄託を通じて着実な成果が得られた。これらの資源は動物モデルを用いた前臨床試験的研究(例えば、光線力学的治療法、抗体医薬の薬効薬物動態、核医学的がん検出方法等)や新規病態モデルの開発に応用され、社会的ニーズに寄り添いながら医療分野の進展に貢献することができた。

近年ではシングル細胞単位での解析系の進歩が著しいため、細胞動態が *in vitro*・*in vivo* の双方向性で解析できることが理想的である。今やヒト細胞資源を重症免疫不全マウスに移植する xenograft モデルは、医科学の新技术創出に欠かせないツールといえる。これまでの科学的検証の観点から、汎用性の高い細胞資源は、Luc 発光に加え、フローサイトメーターやライブ単細胞イメージング解析に有効な蛍光タンパク質を共発現する細胞資源の開発が有用になると考えられる。このような細胞資源の高度化は創薬基盤としての汎用性に加え、今後も継続して開発していく価値があると考えられる。

4. 今後の課題と方向性

本研究の成果として新たな PDX 資源ならびに培養可能資源を研究社会に供給する体制が確立できた。特にこれまで培養が困難であった GIST、乳がんに関する PDX ならびに培養資源を確保するための技術は今後の資源開発に期待できる成果である。引き続き、がん由来資源については希少かつ特殊ながん資源の確保を進め、研究社会に提供を行うとともに、がん以外の疾患に関する PDX 資源による新たなモデル評価系の構築を進める予定である。また、本研究の成果を用いた研究において新たながんマーカーの探索、個別化医療に向けた薬剤スクリーニングにおいて今後さらなる検証を進めることで実用化が期待できる。ウイルス検査等の細胞微生物汚染検査法の開発・充実については、開発した検査系はすべてを研究者が入手可能としたが、その検査費用は高額(4-5 万円)でアカデミア研究者が日常の品質管理として使用するには現実的ではないため、頻繁に使用する可能性があるマイコプラズマと細菌検査系の統合および試薬の低価格化を目指しており、1検体1万円以下を目標に開発を継続する。

Summary of research and development

There is a current situation that cell resources necessary for drug discovery research on disease are not sufficiently secured. In particular, it is urgent to enrich the lineup of cell resources related to prostate cancer, breast cancer, and pancreatic cancer derived from humans. To develop these resources, we used Super-SCID mice to maintain and proliferate patient-derived tissue (Patient-Derived-Xenograft (PDX)) and cryopreservation. Human tissues provided by medical institutions could be transplanted into Super-SCID mice to maintain and proliferate tissues. By transplanting the pancreatic cancer tissue (20 cases), prostate cancer (6 cases, 15 tissues), breast cancer tissue (24 cases) provided by the medical institution into the Super-SCID mouse, the tissues could be maintained and expanded. Further, the proliferated tissue could be cryopreserved entirely. In addition, in order to develop monolayer culture resources, twenty-eight kinds of cell resources were converted from pancreas, mammary gland, prostate, lung, ovary tissue and the cultured cells were cryopreserved. We have released information on 246 PDX samples available to date (https://ahmhadd.nibiohn.go.jp/cgi-bin/pdx_list.cgi).

On the other hand, it is very important to develop cell resources that improve extrapolation to humans for use in drug discovery research. Therefore, we applied Cancer-Tissue Originated Spheroid (CTOS) technology to study cell resource development paired with human model animal (PDX). CTOS preparation was carried out using pancreatic cancer (7 cases), breast cancer (16 cases), prostate cancer (15 cases), ovarian cancer (5 cases), GIST (9 cases), bile duct cancer (2 cases), kidney cancer (2 cases), and intrahepatic cholangiocarcinoma (1 case), previously maintained and expanded by Super-SCID mice. Especially for breast cancer, we were able to establish a new culture method. By using this method, we were able to secure a culture sample with a high success rate. A drug susceptibility test was feasible using CTOS derived from colon cancer, ovarian cancer, and breast cancer that could be cultured. It has been clarified that this method is different from the conventional 2D cultured cell lines and is more similar to the behavior of cancer in vivo, which is useful information in drug development.

In order to improve the supply system of newly developed cell resources, we developed a quality control method and analyzed the characteristics of cells. Regarding the development of quality control methods, we have developed four independent detection systems for viruses, mycoplasmas, bacteria, and fungi. And it was possible to verify the detection sensitivity of 10 copies / reaction in about 1 hour. In the future, we plan to proceed with development aimed at popularizing this quality control method. For cell characteristic analysis, profiling of cancer-related genes was performed using a next-generation sequencer, and the results were compiled into a database. These analytical information are useful as information for selecting resources, and are considered to be indispensable information for future development of gene-targeted drugs.

As a result of this research, we were able to develop new resources, control quality, and build a provision system. We hope that the resources provided will advance new drug development and contribute to the development of drug development that is different from the past.

2. 総合評価

良い

【評価コメント】

ヒトへの外挿性を向上させた培養細胞資源開発を開発するとともに、開発した資源を含むPDX 資源リストを公開し、供給体制を整えた。さらに、様々な研究環境で生物資源が有効活用出来るよう、ウイルス検査等の細胞微生物汚染検査法を開発したことは評価できる。

今後、外部研究機関等への供給体制強化に向け、収集すべき培養細胞資源に優先度を設定するとともに、細胞やPDXの提供体制を強化していただきたい。この強化により、本研究成果が広く活用され、創薬研究の進展に貢献されていくことを期待する。

以上