

日本医療研究開発機構 官民による若手研究者発掘支援事業  
事後評価報告書



## I 基本情報

補助事業課題名: (日本語) 臨床がん三次元ハイスループットスクリーニングシステムの創製  
(プログラム名) (英語) Development of 3D-high throughput screening system of patient cancer cells

実施期間: 令和2年9月1日～令和4年3月31日

補助事業担当者 氏名: (日本語) 松崎典弥  
(英語) MATSUSAKI Michiya

補助事業担当者 所属機関・部署・役職:  
(日本語) 大阪大学・大学院工学研究科・教授  
(英語) Osaka University・Graduate School of Engineering・Professor

## II 補助事業の概要

補助事業の成果およびその意義等

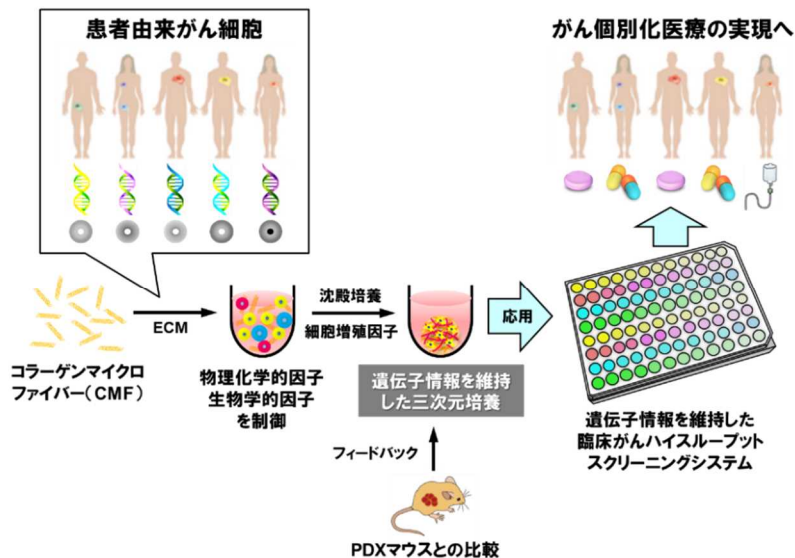
**和文：**

がんは、発症に関わる遺伝子変異が多数存在するため、個体間だけでなく腫瘍内のがん細胞間の性質も異なる。この「がんの不均質性」が、根治を困難にしている大きな理由である。がんの個別化医療を実現し、個々の患者に最適な治療法を見つけるためには、患者腫瘍の特徴を保持した状態で培養する必要がある。一般的な二次元（2D）培養法では、培養過程でがん細胞の遺伝子変異が起こるため、性質を維持した培養は困難である。現在、唯一可能な方法は、高度免疫不全マウスにがん細胞を移植するPDX マウス法である。しかし、PDX マウスは高額

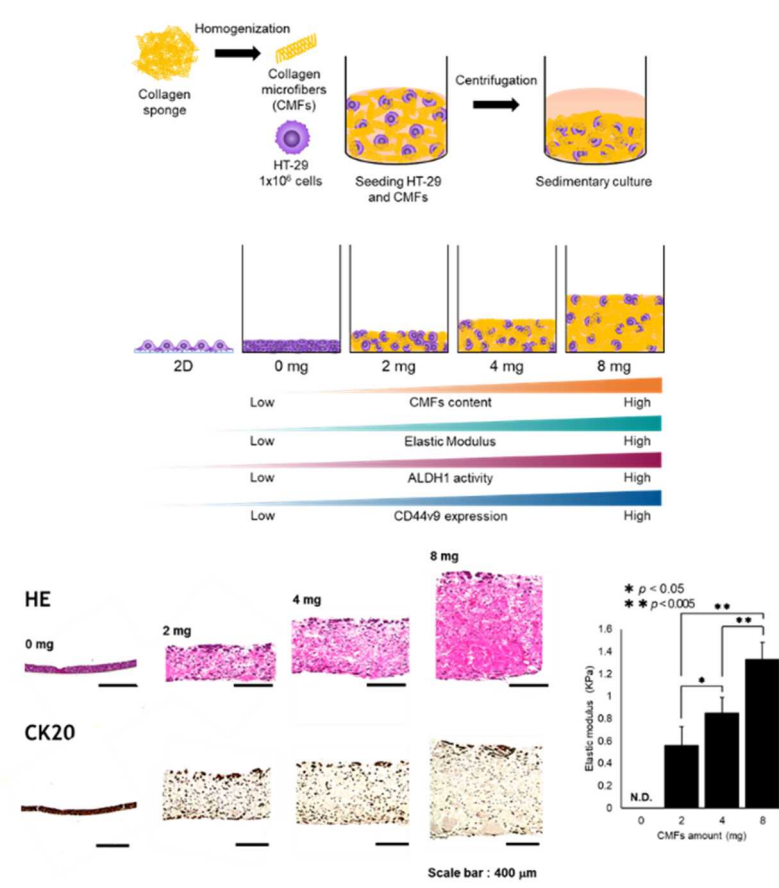
で死にやすく、1 個体で 1 条件しか見られないためスループット性が低いという課題を有する。そこで、患者腫瘍の特徴を保持した培養と抗がん剤のハイスループット薬効評価を可能とする新しい培養技術の確立が求められている。

本研究では、「臨床がんの遺伝子情報を維持したハイスループット三次元培養法」の確立を目標とした（**図 1**）。具体的には、がん周辺に存在する間質組織の細胞外マトリックスに着目し、その「硬さ」、「密度」、「組成」の 3 つの物理化学的因子と、「血管網」、「線維芽細胞」、「増殖因子」の 3 つの生物学的因子を組み合わせることで、遺伝子情報の維持に必要な要因の解明を目指した。がん間質組織は細胞外マトリックス（ECM）であるコラーゲンの密度が高く、高い弾性率を有していることが報告されている。そこで、がん間質に近いコラーゲン密度を実現するために新たに考案した手法が「沈殿培養法」である。本手法は、長さ約 100 μm のコラーゲンマイクロファイバー（CMF）の分散体と細胞を沈殿して組織化することでコラーゲンの高密度化が可能な手法である。得られた三次元組織は、I 型コラーゲンのみで構成されているにもかかわらず、腫瘍間質と同程度の高い弾性率を示した。架橋剤を用いずコラーゲンのみでこれほど高い弾性率を達成した報告例は無く、世界で初めての報告であり、独創性に優れた手法である。

まず、血管網の制御に関する条件を明らかにするため、CMF 量や正常ヒト皮膚線維芽細胞数（NHDF）、ヒト臍帯静脈内皮細胞



**図 1.** 本研究の概略図。



**図 2.** 本実験のイメージ（上）と CMF を用いて HT29 を三次元培養した時の組織標本写真と弾性率（下）。

(HUVEC) の数の最適化に取り組んだ。その結果、CMF を用いてがん細胞を培養すると細胞数が増加し、その後維持されることがわかった (図 3)。一方、CMF を用いずがん細胞を組織化してスフェロイドを形成させると、細胞数は減少し、内部細胞が壊死する結果となった。これは、CMF が細胞接着足場として機能するだけでなく、酸素や栄養の透過する空間を与えたためと考えられる。CMF を用いてがん細胞を組織化した場合のがん関連遺伝子の発現を解析した結果、二次元の平面培養と比較してがん関連遺伝子の発現が増加することを見出した。さらに、NHDF と HUVEC の割合を最適化することで、1ヶ月間の培養実験後も毛細血管網やがん関連遺伝子の発現が維持されることが明らかとなった。

次に、血管新生に関係する細胞増殖因子として血管内皮細胞増殖因子 (VEGF-A)、線維芽細胞増殖因子 (FGF-2)、肝細胞増殖因子 (HGF) を選択し、血管網形成とがん細胞の維持に有効な各増殖因子濃度を評価することで、それぞれ最適な濃度範囲を見出すことができた。

本三次元培養法をハイスループットスクリーニングに応用するためには、96 ウェルで培養する必要がある。そこで、96 ウェルでがん組織を作製するために必要な CMF 量や NHDF、HUVEC の数と割合の最適化を図った (図 4)。その結果、ボール状のがん組織を作製することでハイスループット化できることを見出した。

得られた組織体を患者由来がん細胞 (PDC) の三次元培養に応用し、PDX マウス

法と薬剤感受性を比較した。二次元の平面培養では PDX との薬剤感受性の同等性は 66.7%であったが、本三次元培養では 85.2%と高い一致率を示した。また、患者治療成績との同等性を検討した結果、こちらも 80%と高い一致率を示すことを見出した。一般的に、PDX の患者治療成績との一致率が 80%と報告されているため、この結果は、本三次元培養法が PDX マウス法の代替になり得る可能性を強く示していた。

本三次元培養法で PDC を培養することで遺伝子発現がどのように変化するか調べるため、RNA シーケンスを行い、2D や PDX、患者摘出検体と比較した。GO 解析の結果、平面培養と比較して ECM や血管新生、低酸素関連の遺伝子

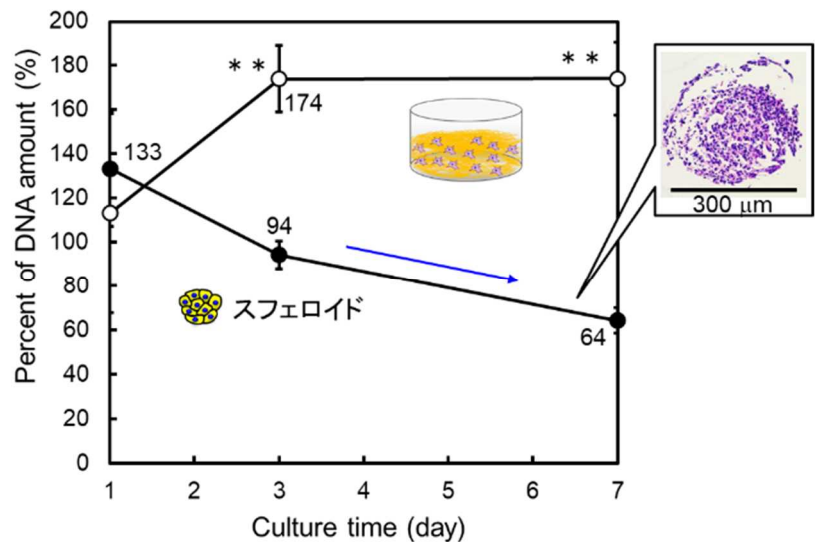


図 3. HT29 を 8 mg の CMF を用いて三次元培養した時の DNA 量の変化。

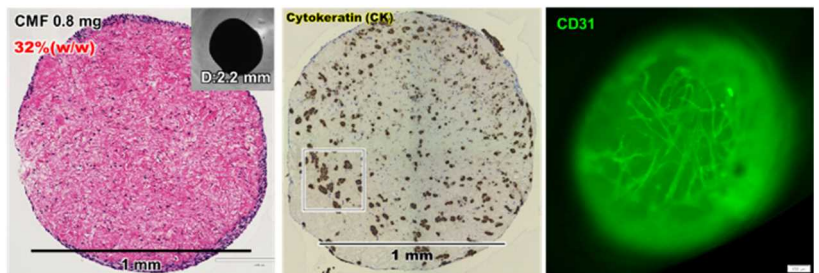
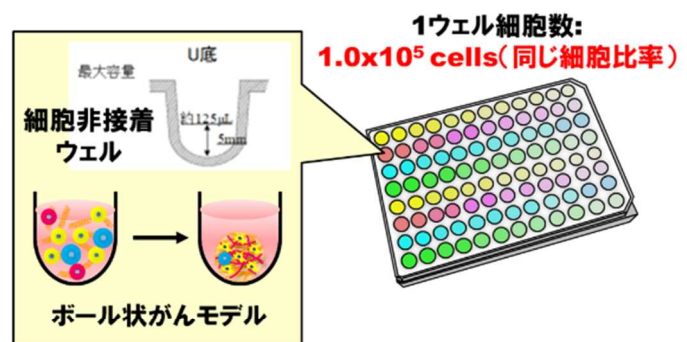


図 4. 96 ウェル内部に作製したボール状がんモデルのイメージ (上) とヘマトキシリン-エオシン染色、CK20 免疫染色、CD31 免疫染色写真 (下)。

発現が有意に増加していることが確認された。また、主成分分析の結果、三次元培養は平面培養よりも PDX や患者検体に近いことが明らかになった。

本三次元培養法が達成され、がん個別化医療を実現できれば、これまで遺伝子パネル検査では適した薬が見つからない患者に最適な薬を提供できる可能性がある。現在の遺伝子パネル検査では、治験に参加できる患者の割合が低く、最新のデータでも 8%にとどまっている。この原因の一つは、遺伝子変異から治療効果が予測される抗がん剤は、当該がん種に対して適応外である場合が多いためである。そこで、適応外の抗がん剤を本研究で開発したスクリーニングシステムで検査することができれば、がん個別改良を実現できるだけでなく、抗がん剤のドラッグリポジショニングにも有効である。これは、医療費の削減につながるだけでなく、日本発の新産業の創出やがん治療促進という社会貢献も期待される。

#### **英文：**

Because of the large number of genetic mutations involved in the pathogenesis of cancer, the properties of cancer vary not only among individuals but also among cancer cells within a tumor. This "heterogeneity of cancer" is a major reason why radical cure is difficult. To realize personalized medicine for cancer and find the best treatment for each individual patient, it is necessary to culture the patient tumor while maintaining its characteristics.

In the general two-dimensional (2D) culture method, it is difficult to culture cancer cells with their properties maintained because genetic mutation of cancer cells occurs during the culture process. Currently, the only possible method is the PDX mouse method, in which cancer cells are transplanted into highly immunodeficient mice. However, PDX mice are expensive, prone to death, and have low throughput because only one condition can be seen in one individual. Therefore, establishment of a new culture technology to retain the characteristics of the patient tumor and high-throughput drug efficacy assay is strongly desired.

This study aimed to establish a high-throughput three-dimensional culture method that maintains the genetic information of clinical cancer. Specifically, we focused on the extracellular matrix of the stromal tissue surrounding cancer and aimed to elucidate the factors necessary for the maintenance of genetic information by constructing an in vitro three-dimensional culture method that combines and controls three physicochemical factors, "stiffness," "density," and "composition," with three biological factors, "vascular network," "fibroblasts," and "growth factors."

It has been reported that cancer stromal tissue has a high density of collagen, an extracellular matrix (ECM), and a high elastic modulus. Therefore, we have devised a new method to achieve a collagen density like that of cancer stroma: the precipitation culture method by collagen microfibers (CMF). This method could achieve high collagen density and blood capillary networks by precipitating and organizing cancer cells, endothelial cells, and CMF. The resulting three-dimensional cancer tissues exhibited high expression of cancer related genes. Moreover, the drug responsive assay of the 3D culture showed 85.2% similarity with the same assay by PDX, but 66.7% similarity of 2D culture. The obtained data strongly suggested that the 3D culture discovered in this research has high potential for anticancer drug screening assay instead of PDX.