

# 日本医療研究開発機構 創薬基盤推進研究事業 事後評価報告書

## I 基本情報

研究開発課題名：次世代型 3D 共培養システムを用いた *in vitro* 薬剤評価  
Evaluation of drugs *in vitro* by using next generation type 3D co-culture system

研究開発実施期間：令和 2 年 12 月 1 日～令和 5 年 3 月 31 日

研究開発代表者 氏名：成瀬 美衣  
Mie Naruse

研究開発代表者 所属機関・部署・役職：  
国立研究開発法人国立がん研究センター・研究所 動物実験施設・研究員  
National Cancer Center Research Institute・Central Animal Division・Staff Scientist

## II 研究開発の概要

### (1) 研究開発の目的

本研究では、がん細胞のみでなく、がん微小環境の 1 つとしてがん関連線維芽細胞（CAF）の症例毎の特徴を取り入れた次世代型 3D 共培養システムを用い、症例毎の薬効、薬剤耐性細胞の取得を行う。この評価系の予測確率を上げる戦略として、オルガノイドが生体内に近い *in vitro* モデルであり、さらに CAF との共培養により CAF との相互作用まで生体内を再現することが挙げられる。また、症例間の CAF の特徴をとらえるために、ゲノムワイドなメチル化情報を中心としたオミックス情報の取得を行う。臨床情報や病理情報を統合し新たな層別化マーカーや薬剤耐性に関連するメチル化変異を同定可能であることも臨床予測性の向上につながる。

これらを進める過程で、①CAF の生理的意義の解明、②抗がん剤耐性獲得に寄与するメチル化異常を明らかにし、原因遺伝子の同定による新たな抗がん剤開発への発展、③新たな抗がん剤のスクリーニングや薬効評価系としての利用といったことへつなげる成果を得ることを目標とする。

### (2) 研究開発の成果

#### がん部、非がん部由来のオルガノイド及び線維芽細胞の樹立

大腸がん手術余剰検体を用い、がん部及び非がん部からオルガノイド及び線維芽細胞の樹立を行った。期間内に新規に 17 症例、既存の症例と合わせて 53 症例の病理解析及び臨床情報の付随した検体の提供を受けた。大腸がんオルガノイドに関しては 3 種類のニッチ因子の組み合わせを変えた培地を用いており、30.7%の樹立率、非がん部オルガノイドはニッチ因子全てを含む 1 種類の培地で 63.9%、線維芽細胞については 10% FBS を含ん

だ RPMI 培地で培養を行い、がん部 77.8%, 非がん部 72.2%の樹立率であった。そのうち、非がん部とがん部の線維芽細胞の症例毎のセットで 20 症例+がん部のみ 4 症例分、がん部オルガノイドと線維芽細胞のセット 7 症例分を以下の解析に用いた。これらの症例については腫瘍の NCC oncopanel 検査により遺伝子変異を行い、The Cancer Genome Atlas (2012)で報告されているように、APC, TP53, KRAS の変異が高頻度で見られ、偏りのない大腸がん症例をもサンプルを用いたことを確認した。また、腫瘍で見られた DNA 変異が CAF では見られないことを、TP53, KRAS 変異についてサンガーシーケンスにより確認し、CAF をエピゲノムで分類することの重要性の根拠とした。

#### 共培養系を用いた薬効評価

大腸癌手術余剰検体より培養した同症例由来のオルガノイドと CAF を用いた次世代型 3D 共培養システムを用い、薬剤試験後の生細胞活性の測定による薬効試験を行った。その結果、7 症例のがん部オルガノイドと CAF のセットで完全にシスプラチン、5-FU に耐性があるものはなかったが、IC50 の値で 2 群に分けると 5-FU とシスプラチンに対して症例によって効果の違いが観察された。シスプラチンは IC50 が単独培養<共培養、5-FU では単独培養>共培養と異なった結果が得られた。シスプラチンは 5-FU より線維芽細胞への殺細胞効果が少なく、間質への抗がん剤の影響が異なることが明らかになった。

#### 共培養系を用いた薬剤耐性株の取得

単独培養オルガノイド、CAF との共培養オルガノイドを用いて、継代毎に抗がん剤の添加を繰り返し、3 ヶ月程度の培養後に薬剤試験により薬剤奏功性を確認し、薬剤耐性オルガノイドの取得を行った。5-FU については奏功性の変化は見られず、耐性を獲得したオルガノイドは得られなかった。シスプラチンに関しては 7 症例中 2 症例で耐性株を得た。#28 については単独培養でのみ実験を行った結果別々の実験でそれぞれ耐性株を得ており、#47 に関しては単独培養では耐性株が得られず共培養でのみ耐性株を得た。また、シスプラチン耐性オルガノイドに対して、5-FU、イリノテカン、オキサリプラチンを用いた薬剤試験を行った結果、いずれも耐性は生じておらず、シスプラチン特異的な耐性獲得が生じたことがわかった。

#### CAF 特異的な DMR の同定

CAF と非がん部の線維芽細胞 (20 症例のセットと CAF のみ 4 症例の合計 44 サンプル)の Reduced representation bisulfite sequencing: RRBS 解析の結果から、症例により染色体あたりのメチル化率が同症例の非がん部と同程度のものと、低メチル化を示す 2 群に別れることが新たにわかった。また、CAF と非がん部の線維芽細胞のメチル化解析から、メチル化変化領域 (Differentially Methylated Region: DMR) を 146 箇所同定した (Statistical test: Fisher, Q-value threshold 0.1, fold change threshold 0.25)。CAF のマーカーの決定は現在混沌としており、今回の課題の中でも一般的な CAF のマーカーである  $\alpha$ -smooth muscle actin : $\alpha$ -SMA の発現は免疫染色、発現解析により、同症例で非がん部線維芽細胞と比較して CAF の方が  $\alpha$ -SMA の陽性率が高く既報と一致した。一方症例毎に非がん部でも陽性率が異なり、同症例内での比較をしないと判別が難しかった。メチル化をマーカーとした場合はサンプル毎に各 CpG サイトのメチル化率が計算可能という点からマーカーとして有用と考えられる。特に CAF で顕著に遺伝子上流が高メチル化された転写因子 A は全ての大腸がんの CAF を分ける新規の CAF マーカーとなり得ると注目している。転写因子 A は進化的に保存された転写因子で、H3K9Ac で定義されたスーパーエンハンサー領域と一致しており、CAF における機能的意義を明らかにしたい。

また、同サンプルの RNAseq 解析からも CAF と非がん部の発現パターンが異なることがわかり、CAF で発

現上昇する遺伝子 242, 発現低下する遺伝子 470 を同定した ( $p < 0.05$ , fold change  $> 2$ )。GO 解析からは、代謝に関連する遺伝子や免疫系の細胞の刺激に関連する遺伝子などがエンリッチメントされていることがわかった。CAF のマーカーとしての報告がない遺伝子も含まれており、新規のマーカーとして報告できる可能性がある。

#### シスプラチン耐性関連 DMR の同定

オルガノイドが元の組織のメチル化を解析するのに適したモデルであるかを確認するため、非がん部オルガノイド 3 例、がん部オルガノイド 6 例に関して、父方と母方の染色体で厳密にメチル化が制御された DMR が既知であるインプリント遺伝子について解析を行った。その結果、非がん部では DMR が保たれているが、がん部ではインプリントが乱れており、腫瘍でインプリントが乱れている既報と同様のことがオルガノイドで見られた。オルガノイドはメチル化解析に適していると判断し、解析を進めた。

がん細胞オルガノイドにシスプラチン (100  $\mu\text{M}$ ) 添加を繰り返した後、シスプラチン耐性となったオルガノイドと、コントロールとしてシスプラチン (0  $\mu\text{M}$ ) 添加を同時に繰り返し、シスプラチン感受性を維持したオルガノイドについて RRBS 解析によるメチル化解析を行い、2 症例について DMR を抽出した。発現がリンクすることを複数の遺伝子で確認した。これらの遺伝子がシスプラチン耐性の原因遺伝子であると仮定し、遺伝子 B 阻害(遺伝子 B モノクローナル抗体)実験を行ったところ、シスプラチン耐性の解除が一部見られ、新規のシスプラチン耐性原因遺伝子が同定できた。

#### オミックス解析および予測システムの構築

症例毎の臨床情報、腫瘍の NCC oncopanel によるがん細胞の DNA 遺伝子変異や、共培養システムによる 5-FU、シスプラチンの薬剤試験の結果、非がん部線維芽細胞とがん部の CAF の RRBS 解析によるメチル化解析、RNA seq による遺伝子発現解析、シスプラチン耐性オルガノイドのメチル化解析と遺伝子発現解析の結果を統合し、層別化マーカーの同定を行った。CAF はがん細胞の遺伝子変異によって、発現、メチル化の異なる遺伝子を抽出しており、がん細胞の遺伝子変異との関連、遺伝子の機能を明らかにし、がん細胞と相互作用する CAF の意義を明らかにする必要がある。また、腫瘍の stage IV 特異的な CAF の DMR, 性別、年齢による CAF の遺伝子発現の違いも抽出した。また、CAF のメチル化のクラスタリングにより、CAF はメチル化により 3 つのグループに分かれることを示した。これらのグループ特異的な DMR, 遺伝子発現から、CAF の機能的な差を明らかにする必要がある。

### (3) 今後の課題と方向性

がんの微小環境の重要性が注目されているが、CAF のマーカーは混沌とした状態が続いている。その大きな一因は、CAF は多様性のある細胞集団であるからである。また、本課題でも見られたように、症例毎に発現量が異なり、陽性の判断が困難である。マーカーとして浸透している  $\alpha\text{-SMA}$  さえ例外が生じる例が報告され、絶対的なマーカーが求められている。そこで、本研究において、転写因子 A の DNA メチル化の亢進という新たなバイオマーカーを単離したことは重要である。また、メチル化、遺伝子発現の双方から見て、既存のマーカー以外にもマーカー候補をリスト化したため、転写因子 A のみでなく今後の検証により有用なマーカーを同定できると考えている。機能解析も同時に行い、CAF の生理的意義の解明と治療への利用を引き続き行いたい。また、がん細胞の変異型に注目した CAF の分類は、これまでのがん細胞の変異型による抗がん剤の選択の精度をさらに上げることにつながると考えており、今後も引き続き症例数を増やして得られた結果の検証の必要があると考えている。

また、シスプラチン耐性オルガノイドを樹立し、その DNA メチル化を解析することで、シスプラチン耐性獲得に寄与している可能性を明らかにした。オルガノイドの発現解析から、各症例の中で薬剤耐性の有無での差よりも、症例間の元々の違いの方が明らかに大きいことがわかった。従って、今回 *in vitro* で安定的に培養できるオルガノイドの利点を生かし、抗がん剤の添加の有無の条件で長期培養により薬剤耐性獲得の有無の差があるオルガノイドを比較できたことで、非常に効率よく薬剤耐性関連 DMR を同定できた。それに関連する耐性獲得メカニズムの解明の実験を行い、新しい抗がん剤開発につなげることが可能な成果が出せると考えている。特に注目している点は、オルガノイドと CAF の共培養を行うことで薬剤耐性を獲得したが、CAF なしでは薬剤耐性を獲得していないラインを樹立できた点である。3D 共培養システムの開発の狙いはまさにそこにあり、間質の薬剤耐性への関与がどのように起こるか明らかにできる良いツールであることを示した。現時点でその例が 1 症例であるため結論を出すことが難しいが、症例数を増やして間質を同時に評価しなくては解決できない抗がん剤の開発がどういったものであるのかを明らかにしていきたい。この戦略は、生体内で非常に近い環境下での解析となり、がんにおける薬剤耐性メカニズム解明に大きな役割を果たせると考えられる。最終的に薬剤耐性のメカニズムを解明し、その機序を利用した創薬につなげたい。また、今回は大腸がんで行ったが、他の臓器のがんについても応用可能な系であり、例えば肺がんなど他のがん種での展開も行いたい。

### (1) Research and Development Objectives

In this study, we aim to use a next-generation 3D co-culture system that incorporates characteristics of cancer-associated fibroblasts (CAFs) as one of the microenvironments in addition to cancer cells, to acquire drug efficacy and drug-resistant cells for each case. One strategy to increase the predictive probability of this evaluation system is to use organoids, which are in vitro models that are closer to the in vivo state, and to further replicate the interaction with CAFs by co-culturing with them. In addition, to capture the characteristics of CAFs between cases, we will obtain omics information, focusing on genome-wide methylation data. Identifying new stratification markers and methylation mutations associated with drug resistance through the integration of clinical and pathological information can also improve clinical predictability.

Through these efforts, our goals are to achieve (1) clarification of the physiological significance of CAFs, (2) clarification of methylation abnormalities contributing to the acquisition of anticancer drug resistance, leading to the identification of causative genes and development of new anticancer drugs, and (3) the development of new screening methods for anticancer drugs and their use in drug efficacy evaluation systems.

### (2) Research and Development Achievements

We established organoids and fibroblasts from both cancer and non-cancerous regions of colorectal cancer surgical specimens. We performed drug efficacy tests using co-culture systems with organoids and cancer-associated fibroblasts and acquired drug-resistant strains. Methylation rates and differentially methylated regions (DMRs) were identified between cancer-associated fibroblasts and non-cancerous fibroblasts. Gene expression patterns and gene ontology analysis were conducted, revealing markers for cancer-associated fibroblasts and identifying DMRs associated with cisplatin resistance. Clustering of cancer-associated fibroblast methylation patterns revealed three groups. Further analysis of group-specific DMRs and gene expression is necessary to elucidate functional differences.

### (3) The Future Tasks and Directions

This study focuses on identifying markers for cancer-associated fibroblasts (CAFs) through DNA methylation analysis, as well as investigating drug resistance in colorectal cancer using a 3D co-culture system. The study highlights the importance of understanding the tumor microenvironment and its impact on drug resistance. We identified a novel biomarker for CAFs and suggest that further analysis could identify more useful markers. We also established cisplatin-resistant organoids through co-culture with CAFs, providing a useful tool for studying drug resistance mechanisms. The study's ultimate goal is to develop new anticancer drugs based on their findings, which could be applicable to other types of cancer beyond colorectal cancer.