

# 日本患者由来がんモデル学会 ポスターセッション抄録集

## ポスターセッション

新規デスモイド腫瘍株(NCC-DSM1-C1)の樹立

国立がん研究センター研究所希少がん研究分野/千葉大学整形外科

秋山 太郎

肝細胞癌の新規治療薬開発：Fatty Acid-Binding Protein-5 (FABP-5) 阻害薬

～患者由来がんモデルの作成に向けて～

国立がん研究センター研究所希少がん研究分野/  
旭川医科大学外科学講座肝胆膵・移植外科学分野

安達 雄輝

患者由来がん細胞を用いた長鎖非コードRNA *TMPO-AS1*のトリプルネガティブ

乳がんにおける機能解析

埼玉医科大学 医学部 ゲノム応用医学

池田 和博

Luminal型乳がん由来オルガノイドの培養によるER発現低下メカニズムの解明

京都大学大学院医学研究科

クリニカルバイオリソース研究開発講座

上松弘幸

患者由来がんモデルを用いたCIC-rearranged sarcomaの新規治療法の開発

国立がん研究センター研究所

希少がん研究分野

大崎 珠理亜

生体内微小環境の模倣に向けた患者由来がんスフェロイドモデルの灌流培養システムの構築と評価

国立がん研究センター研究所希少がん研究分野/長崎大学大学院医歯薬学総合研究科

小野拓也

眼窩悪性黒色腫肝転移による同所性肝移植PDXマウスモデルの確立

大阪公立大学医学部 放射線診断学・IVR学

影山健

鶏卵モデルの希少がん研究への有用性と個別医療化への可能性

京都大学iCeMS玉野井グループ

小松葵

犬悪性中皮腫オルガノイドと二次元培養細胞の比較解析

東京農工大学 農学府 共同獣医学専攻 獣医薬理学研究室

佐藤 よもぎ

患者由来トリプルネガティブ乳がん細胞においてEfpは細胞周期関連因子を標的として細胞増殖をもたらす

埼玉医科大学・医学部・ゲノム応用医学

佐藤 航

臨床腫瘍のがん関連タンパク質発現プロファイルを維持したスフェロイドの開発

国立がん研究センター研究所 希少がん研究分野

申育實

新たに樹立した消化管神経内分泌がん細胞の形態機能解析

日本医科大学 消化器外科

進士誠一

ヒト免疫鶏卵による免疫チェックポイント阻害剤新規スクリーニングモデルの確立

徳島大学大学院創成科学研究科 生物資源学専攻

杉本 大知

患者由来異種移植ゼノグラフトを用いた前立腺癌オルガノイドの樹立と応用

京都大学大学院医学研究科 泌尿器科学教室

砂田 拓郎

口腔がん患者腫瘍移植モデルの樹立

熊本大学大学院 ヒトレトロウイルス学共同研究センター 造血腫瘍制御学分野

関 祐紀

Patient-Derived Xenograft modelを用いた転移モデルの確立

徳島大学大学院医歯薬学研究部 泌尿器科学分野

大豆本 圭

HuGEMMTM Modelling Toxicology of Species-Specific Immune Checkpoint Inhibitors

Crown Bioscience Inc.

Tina Zhang

マイクロキャビティ容器を用いた細胞凝集体の大量生産とハイスループット

スクリーニング用 Corning®マイクロプレートへの分注について

コーニングインターナショナル株式会社

田口 亜紀子

超希少がん、腹膜偽粘液腫の治療開発：患者由来細胞株の樹立と抗がん剤の同定

国立がん研究センター研究所 希少がん研究分野

野口玲

患者由来組織同所移植モデルを用いた骨肉腫に対する有効なマルチキナーゼ阻害薬の検索

金沢赤十字病院

樋口 貴史

骨肉腫におけるHAT-HIFメカニズムの解明と新規治療薬の開発

千葉県がんセンター研究所 発がん制御研究部

増田達哉

患者由来がん細胞培養、マウス移植に利用する、コラーゲン、ラミニン、ヒアルロン酸を用いた新規3次元細胞培養基材

(株) ニッピ バイオマトリックス研究所  
村澤 裕介

猫乳腺腫瘍組織由来オルガノイドを用いた新規治療法・診断マーカーの探索

東京農工大学 農学府 共同獣医学専攻 獣医薬理学研究室  
山本 晴

J-PDXライブラリーにおけるShort Tandem Repeat解析による品質管理の有用性検討

国立がん研究センター研究所 基盤的臨床開発研究コアセンター 薬効試験部門  
吉野 友美

トリプルネガティブ乳がん幹細胞の起源ルミナル前駆細胞は、Na<sup>+</sup>ポンプFXVD3を利用し抗がん剤耐性を獲得する

金沢大学がん進展制御研究所  
李 夢嬌

Establishment and Characterization of a Panel of Advanced Breast Cancer Patient-Derived Xenograft (PDX) Models for Cancer Therapeutic Evaluation

Crown Bioscience Inc.  
Leilei Chen

## 新規デスモイド腫瘍株(NCC-DSM1-C1)の樹立

秋山太郎

国立がん研究センター研究所希少がん研究分野/千葉大学整形外科

【背景】デスモイド腫瘍は線維芽細胞由来細胞の非常に稀な腫瘍性病変であり、CTNNB1 遺伝子の変異により特徴づけられる。遠隔転移は来さないが、強い局所浸潤性発育を示し、広範切除後に高率に局所再発する。また、広範切除困難例の治療は経過観察、放射線治療、全身化学療法などによる局所病変の制御のみであり、根治的治療は確立されていない。患者由来がん細胞株は、前臨床研究に必要不可欠であるが、現在セルバンクから入手可能なデスモイド細胞株は存在しない。我々は患者由来デスモイド細胞株を樹立したので報告する。

【方法】症例は、左大腿から左臀部に及ぶ巨大なデスモイド腫瘍に罹患した 27 歳男性である。前医で広範切除後に再発した。当初再発に対して methotrexate が使用されたが効果に乏しく、pazopanib の内服治療で 8 年間経過を観察されていた。しかし、腫瘍が徐々に増大したため、腫瘍減量手術を実施された。腫瘍組織は、組織学的にデスモイド型線維症を認めた。患者由来細胞株の樹立は、同手術検体を用いて行なった。3 ヶ月以上かけて 20 継代以上培養できた細胞に対して、適切な個人認証を行なった上で、細胞株を NCC-DSM1-C1 として樹立した。NCC-DSM1-C1 の細胞形態を元腫瘍と比較し、CTNNB1 遺伝子の変異を調査した。また、214 剤抗がん剤薬効スクリーニングから、NCC-DSM1-C1 に対して高い抗腫瘍効果を示すと思われた薬剤 18 剤と、デスモイド腫瘍に対して承認されている薬剤 6 剤の合計 24 剤について詳細な薬効試験を行い、それぞれの薬剤の抗腫瘍効果を 50% Inhibitory Concentration (IC<sub>50</sub>)( $\mu$ M)で評価し、比較した。

【結果】NCC-DSM1-C1 は、組織学的に元腫瘍と同様のデスモイド線維種症を示した。また CTNNB1 遺伝子に T41A 変異を示した。薬効試験では、romidepsin の IC<sub>50</sub> が最小で 0.13  $\mu$ M であった。一方で、ドナー患者に対して使用されていた methotrexate と pazopanib の IC<sub>50</sub> はともに 100  $\mu$ M 以上であった。

【考察】NCC-DSM1-C1 は形態学的にも、遺伝学的にもデスモイド腫瘍の特徴を有した。薬効試験では、ドナー患者に使用歴のある methotrexate と pazopanib の IC<sub>50</sub> は高値であり、同薬剤に対する耐性を反映している可能性がある。一方で、romidepsin は、デスモイド腫瘍に標準的に使用されるどの薬剤よりも、低い IC<sub>50</sub> を示し、デスモイド腫瘍の治療に有用である可能性が示唆された。本実験結果が示すように、患者由来細胞株を使用した薬効試験は新規治療薬候補の探索に有用である。今後、デスモイド腫瘍において更なる患者由来細胞株が樹立され、その治療開発の解明が進むことが期待される。

## 肝細胞癌の新規治療薬開発：Fatty Acid-Binding Protein-5 (FABP-5) 阻害薬 ～患者由来がんモデルの作成に向けて～

安達 雄輝

国立がん研究センター研究所希少がん研究分野/

旭川医科大学外科学講座肝胆膵・移植外科学分野

【序論】肝細胞癌に対する治療成績は、分子標的薬の登場や手術手技の成熟に伴い向上しつつある。しかし、肝細胞癌に対する現在の薬物療法の効果は限定的である。昨年改訂された肝癌診療ガイドライン第5版において第一選択レジメンとなっているアテゾリズマブ+ベバシズマブ併用療法を用いた場合であっても、その奏効率は3割程度に留まっている。そのため、切除不能肝細胞癌に対する新規治療法の開発が求められている。脂肪酸結合蛋白 (Fatty Acid Binding Protein: FABP)は、細胞内で脂肪酸やその他の疎水性リガンドを輸送する脂質シャペロンファミリーの一種である。FABPは類似した構造を持つ12のアイソフォームからなり、発見された臓器や組織を由来とする名称がつけられている。表皮型脂肪酸結合蛋白 (Epidermal FABP/FABP-5)は皮膚や眼球に多く存在し、肝細胞癌でも高発現となることが知られている。また、近年の研究により、肝細胞癌においてFABP-5は上皮間葉転換を介した悪性化をもたらし、独立した予後不良因子であることも明らかとなった。しかし、FABP-5の阻害が肝細胞癌の増殖や進行を妨げるのかという点については未だ解明されていない。本研究の目的は、FABP-5阻害薬が肝細胞癌に対して抗腫瘍効果を発揮し、肝細胞癌の新規治療薬となる可能性を検証することである。

【方法】ヒト肝細胞癌に由来する細胞株 (Li-7, HLE, HepG2, Hep3B) を対象として、FABP-5阻害剤 (SBFI26) に対する反応を、細胞増殖アッセイ (Cell Counting Kit-8)、細胞遊走・浸潤アッセイ (xCELLigence DP system)、脂肪酸取り込みアッセイ (Screen Quest) で評価した。

【結果】細胞株を用いた実験では、FABP-5阻害薬は肝細胞癌の悪性形質に対して、抑制的な効果を示した。現在、ヒト肝細胞癌株をマウスに移植した動物実験とFABP-5阻害薬が肝細胞癌の進行を妨げた分子生物学的なメカニズムの解析を実行中である。

【結論】FABP-5阻害薬は肝細胞癌に対して抗腫瘍効果を持ち、新規治療薬剤の候補である。今後、肝細胞癌の患者由来がんゼノグラフト (PDX) を作成し、生体内のがん微小環境により近い条件下でも、FABP-5阻害薬の投与で同様の効果が得られることを確認する予定である。

## 患者由来がん細胞を用いた長鎖非コード RNA *TMPO-AS1* のトリプルネガティブ乳がんにおける機能解析

池田 和博<sup>1</sup>、佐藤 航<sup>1</sup>、後藤 典子<sup>2</sup>  
堀江 公仁子<sup>1</sup>、井上 聡<sup>1,3</sup>

<sup>1</sup>埼玉医科大学 医学部 ゲノム応用医学

<sup>2</sup>金沢大学 がん進展制御研究所 分子病態研究分野

<sup>3</sup>東京都健康長寿医療センター研究所 システム加齢医学

トリプルネガティブ乳がん(TNBC)は、ルミナルタイプや HER2 タイプの乳がんと比較して悪性度の高いサブタイプであり、明確な治療標的が存在せず効果的な治療方法に乏しい現状である。最近、腫瘍促進作用のある長鎖非コード RNA (lncRNA)は、新しい治療標的の候補として着目されている。我々は、lncRNA である *thymopoietin antisense transcript 1 (TMPO-AS1)*が、エストロゲン受容体  $\alpha$  mRNA を安定化することにより、ホルモン依存性乳がんの進行に寄与することを示したが(*Mol Cell Biol* 39: e00261-19, 2019 and *Cover*)、TNBC における役割は明らかになっていない。本研究において、*TMPO-AS1* は TNBC の多くを占める basal-like サブタイプの乳がんで過剰発現してことを明らかにした。さらに、TNBC のがん組織検体を至適条件下で初代培養することによって樹立した患者由来細胞(TNBC-PDC, TNBC patient-derived cells)ならびに TNBC 培養細胞株である MDA-MB-231 細胞において、*TMPO-AS1* は高発現していることを示した。また、*TMPO-AS1* に対する siRNA を用いた機能解析によって、*TMPO-AS1* の発現低下は TNBC-PDC を含む TNBC 細胞の増殖と移動能を抑制することを明らかにした。さらに、発現マイクロアレイ解析によって、*TMPO-AS1* が転写因子 E2F や TGF- $\beta$  シグナル伝達経路に関連する遺伝子の発現を制御することを明らかにし、*TMPO-AS1* に対する siRNA で処理した TNBC-PDC において *MCM6*、*TGFBR1* などの遺伝子の発現が減少することを定量的 PCR 法により示した。*TMPO-AS1* siRNA の *in vivo* における腫瘍抑制効果を複数の薬物送達システム(DDS)を用いて免疫不全マウスの異種移植モデルにより明らかにした。これらのことより、*TMPO-AS1* が TNBC の病態に重要な役割を果たしており、治療標的としての可能性が示唆された。

## Luminal 型乳がん由来オルガノイドの培養による ER 発現低下メカニズムの解明

上松弘幸<sup>1,3</sup>, 小沼邦重<sup>1</sup>, 杉江知治<sup>2</sup>, 井上正宏<sup>1</sup>

<sup>1</sup>京都大学大学院医学研究科クリニカルバイオリソース研究開発講座

<sup>2</sup>関西医科大学附属病院乳腺外科

<sup>3</sup>株式会社 KBBM オルガノイド研究部門

乳がんの主要なサブタイプであるLuminal型乳がんは、ホルモン療法やCDK4/6阻害剤による治療が行われている。これらの治療法に対する耐性を克服するためには、がん細胞の本来の特性を忠実に再現したin vitro疾患モデルの開発が重要である。最近、乳がんのオルガノイド培養法が開発されたが、オルガノイドのエストロゲン受容体 (ER) の発現が低下することが報告されている。本研究では、CTOS 法でオルガノイドを調製し、既報の培養法により継代培養した際の、ER 発現や分化状態、分化状態を制御する分子機構を検討した。

36名のER陽性乳がん患者の試料からオルガノイドを調製し、33症例のER発現を解析した。その結果、ほとんどの症例においてPrimaryオルガノイドではERの発現が維持されていたが、継代培養すると発現が低下した。我々はERの発現パターンから以下の3グループに分類した。ER maintainer (9%) : 複数回継代してもERの高い発現を維持、ER loser (9%) : ERの発現を完全に消失、ER diminisher (82%) : 様々なパターンでERの発現が減少する。ER loserとER diminisherの一部では、継代後にERの発現が減少し、分化状態がLuminal型からBasal型に移行していた。また、遺伝子発現解析の結果から、Notchシグナルが継代培養後に活性化していることが示唆された。実際に継代時のNotchシグナルを解析すると、継代により一過性にNotchシグナルが活性化していた。さらに、継代時のNotchシグナルを阻害して継代培養したところ、ER発現および、Luminalマーカーの発現低下が抑制された。以上のことから、継代時のNotchシグナル阻害により、Luminal型乳がんオルガノイドの分化状態を維持させ、ERの発現低下を回避できる可能性がある。また、臨床においてERの陰性化は頻繁に観察されることから、乳がんオルガノイドは臨床におけるER陰性化のメカニズムを研究するのに有用であると考えられる。



## 患者由来がんモデルを用いた CIC-rearranged sarcomaの新規治療法の開発

大崎 珠理亜

国立がん研究センター 希少がん研究分野

希少がんにおける診断、治療法の開発には融合遺伝子に着目するというアプローチが有効である。何故ならば、融合遺伝子を有する悪性腫瘍はすべからず希少がんであり、融合遺伝子の疾患特異性は極めて高いためである。

CIC-rearranged sarcomaは、*CIC*遺伝子と関連遺伝子の融合により発生する悪性度の高い超希少な肉腫である。*CIC-DUX4*融合遺伝子が95%の症例で認められ、多くの遺伝子の発現異常をもたらし、発がんに寄与していると考えられている。CIC-rearranged sarcomaは既存の放射線化学療法に強い抵抗性を示し、高頻度に遠隔転移をきたす。5年生存率は17-43%と極めて予後不良であり、新規治療法の開発が求められている。本研究では*CIC-DUX4*融合遺伝子産物が形成するタンパク質複合体の中から治療標的を同定することを目的にした。慢性骨髄性白血病や一部の肺がんでは、その発生原因となる融合遺伝子産物を治療標的とした抗がん剤が開発され臨床的に使用されている。肉腫では融合遺伝子産物そのものが治療標的となった例はないが、Ewing肉腫では融合遺伝子産物の形成する複合体中のRNA helicase Aを抑制する化合物が臨床試験で評価されている。そこで、CIC-rearranged sarcomaにおいても融合遺伝子産物が形成する複合体の構成成分を治療標的とすることで、新規治療法の開発が可能なのではないかと考えた。

患者由来がんモデルは、発がんやがんの進展機序の解明、新しい治療法の開発に必要不可欠である。研究に必要な患者由来がんモデルを入手出来ないことがCIC-rearranged sarcomaの治療法の開発を滞らせていた。我々は、*CIC-DUX4*融合遺伝子を有するCIC-rearranged sarcomaの腫瘍組織を用いて、患者由来細胞株、オルガノイド、ゼノグラフトの樹立に世界で初めて成功した。

我々は複数症例に由来する患者由来がんモデルを用いて、①既存抗がん剤をスクリーニングする、②融合遺伝子産物の形成するタンパク質複合体の構成成分から治療標的を同定する、という2つのアプローチで治療法の開発を進めている。本研究のアプローチは汎用性が高く、融合遺伝子を有するその他の希少がんにも応用することで有効な治療法の開発につなげていきたい。

## 生体内微小環境の模倣に向けた患者由来がんスフェロイドモデルの灌流培養システムの構築と評価

小野拓也

国立がん研究センター研究所希少がん研究分野/長崎大学大学院医歯薬学総合研究科

栄養成分・酸素の供給および老廃物の排出が腫瘍内血管により行われる。一方で、細胞培養では培地交換までの間に栄養成分は枯渇し、老廃物は蓄積するため、細胞は傷害を受ける。したがって、生体に近い条件で抗がん剤の感受性試験をするためには、培養細胞への絶え間ない培地の供給および老廃物の排出が望ましい。

腫瘍組織における血管の役割のモデル化を目指し、本研究では灌流培養法を用いた抗がん剤の感受性試験の構築を図った。灌流培養とは培地を絶え間なく供給する培養手法である。本研究では灌流培養と同時に古い培地を排出できるよう、超低流速ポンプを用いた培養システムを設計した。患者由来の未分化多型肉腫細胞株 NCC-UPS4-C1 から作製したスフェロイドを用いて、従来の静置培養との比較によりこの実験系を評価した。HE 染色により、静置培養と比較して本システムで培養したスフェロイド内部の壊死が抑制された様子を観察できた。栄養成分および酸素がスフェロイド内部まで供給された可能性がある。また、質量分析により静置培養と比較して本システムで培養後に発現が増減したタンパク質が約 250 種類同定された。発現増加したものの中にはがん細胞の増殖、浸潤、遊走を促進するタンパク質が含まれていた。腫瘍組織における血管の役割を本システムで模倣したことで、細胞の表現型が変化したことが示唆された。絶え間ない栄養供給および老廃物の排出により、腫瘍内血管の役割を再現できたため、本システムは薬剤感受性の評価に適していると考えられる。

## 眼窩悪性黒色腫肝転移による 同所性肝移植 PDX マウスモデルの確立

影山健<sup>1</sup> 木村健二郎<sup>2</sup> 山本晃<sup>1</sup> 寺井瑞江<sup>3</sup> 佐藤隆美<sup>3</sup>

大阪公立大学医学部 放射線診断学・IVR学<sup>1</sup>、肝胆膵外科学<sup>2</sup>

Thomas Jefferson University, Department of Clinical Oncology<sup>3</sup>

【背景】眼窩悪性黒色腫は致死率の高い疾患である。眼窩悪性黒色腫の50%は転移を引き起こし、その転移の90%は肝臓となる。肝転移を起こした患者の90%は2年以内に死亡する。現在、眼窩悪性黒色腫の肝転移に有効な治療法はない。眼窩悪性黒色腫肝転移に対する治療法の開発には、細胞株の作成が非常に困難であることや適切な動物モデルがないことが大きな障害となっている。皮下に眼窩悪性黒色腫肝転移を移植した患者由来異種移植腫瘍（PDX）モデルは既に開発されている。しかし、この異所移植 PDX モデルは、生着率が低い、腫瘍増殖が遅いと言った理由でトランスレーショナルリサーチの障害となっている。患者由来眼窩悪性黒色腫の肝転移組織による同所性肝移植 PDX モデルの開発が望まれている。我々は患者腫瘍標本を免疫不全マウスの肝臓に直接外科的移植する方法を開発した。この外科的同所性肝移植術を Liver pocket method と称する。

【目的】本研究では、外科的同所性移植術 Liver pocket method を用いて、重症免疫不全マウス (NOD.Cg-Prkdcscid Il2rgtm1Wjl/SzJ (NSG)マウス)に、患者由来眼窩悪性黒色腫の肝転移組織の同所性肝移植の生着の評価を行った。移植生着後の腫瘍の継代移植生着の評価も行った。移植生着後の腫瘍を一旦凍結保存し、解凍後に生着可能かも評価した。また、患者腫瘍と移植後腫瘍の病理学的均一性について評価した。

【結果】患者から採取した12例（針生検10例、手術標本2例）の肝転移標本のうち10例でNSGマウスに移植することに成功した（成功率83.3%）。うち8例は針生検標本（80%）であった。移植6ヶ月後、肝腫瘍の存在は造影CTおよび屠殺後病理学的にも同定された。NSGマウスでPDX腫瘍を維持するために、第1世代のマウスから得られた腫瘍を次の第2・第3世代マウスに連続移植した。10例の第1世代PDX腫瘍はすべて第2世代のマウスでの生着に成功した。10例の第2世代PDX腫瘍のうち6例を継代し、第3世代マウスでの生着に全て成功した。さらに、凍結保存したPDX腫瘍4例を新しいマウスに再移植したところ、4例すべてでPDX腫瘍の再生着が確認された。連続継代したPDX腫瘍と凍結保存後の再移植PDX腫瘍は、組織学的、ゲノム学的、プロテオミクス学的に患者腫瘍と類似していた。

【結論】患者眼窩悪性黒色腫の肝転移を外科的に同所性肝移植は可能であり、同所性肝移植PDXモデルの確立に有効であった。

### 【文献】

Kageyama K, et al. J Transl Med. 15:1;145, 2017.

Kageyama K, et al. J Vis Exp. 153, 2019.

# Summary

M Terai, K Kageyama, et al. Curr Protoc. 4:e110, 2021.

## 鶏卵モデルの希少がん研究への有用性と個別医療化への可能性

小松葵

京都大学 iCeMS 玉野井グループ

希少がんは年に人口 10 万人あたり 6 例未満の非常にまれな、数少ないがんである。そのため、専門の医師や医療機関も少なく、希少がん研究を進めるための動物モデルを樹立することが困難なことから有効な診断・治療法を確立するのが難しい。また、希少がんは 1 つのがん種としては頻度が低いものの、その種類は 200 種近くもあり、すべてを合わせると全体のがんの内 15-22% を占めるといわれている。そのため、個々の希少がんの特徴を模倣した移植モデルが必要である。今回我々は希少がん移植鶏卵モデルを提唱したい。鶏卵モデルは安価なうえ、がん細胞をニワトリ漿尿膜 (CAM) に移植した後約 3 日で腫瘍形成が見られる。ニワトリが孵化するまでの 20 日以内に実験を終えるので、短期間で検証ができるという利点もある。希少がん研究のモデルとして鶏卵モデルが活用できるかを検証するために、まずは *CIC-DUX4* 肉腫 (CDS) という希少がんに着目した。CDS は、小児に好発する極めて難治な肉腫であり、治療法は確立されていない。*CIC* 遺伝子と *DUX4* 遺伝子の相互転座により融合遺伝子 *CIC-DUX4* が発現し、がん化に関与している。

国立がん研究センターにより樹立された CDS 細胞株を、孵卵 8 日目のニワトリ漿尿膜に移植し、形成された CAM 腫瘍を 4 つの手法で解析した。1 つ目は、ヘマトキシリン・エオジン (H&E) 染色法による腫瘍内組織像における類似性の確認。2 つ目は、CDS に顕著に高発現している Cyclin D2、ETV4、WT1 といった分子マーカーの発現確認。3 つ目は、種類の異なるがん細胞株で形成された CAM 腫瘍のうち、ETV4 が CDS 細胞株由来の CAM 腫瘍でのみ特異的に発現するかの確認。4 つ目は、RT-PCR の後、サンガーシーケンス解析による *CIC-DUX4* 融合遺伝子の保持の確認。

H&E 染色では、患者腫瘍の組織像と比較し、同様の小円形のがん細胞が多数みられた。組織像だけでは、同じく小円形細胞のユーイング肉腫との判別は難しいため、CDS に特異的に発現する Cyclin D2、ETV4 の 2 つの分子マーカーでの免疫染色を行ったところ陽性であった。ETV4 に関して、卵巣がんやグリア芽腫といった別のがん細胞から形成した CAM 腫瘍を用いてウェスタンブロット法で解析し比較したところ、CDS 由来の CAM 腫瘍のみで高発現していることがわかった。サンガーシーケンス解析では、患者の腫瘍組織、患者由来の細胞株と同様の *CIC-DUX4* 融合遺伝子が、CAM 腫瘍より抽出した RNA から確認できた。以上のことから、CDS の CAM 腫瘍は患者由来のがんの特徴を多く保持していることが分かった。今後、CAM モデルを使用し希少がんの治療法確立への一歩として、薬剤感受性試験などを行っていく予定である。

## 犬悪性中皮腫オルガノイドと二次元培養細胞の比較解析

佐藤 よもぎ

東京農工大学 農学府 共同獣医学専攻 獣医薬理学研究室

悪性中皮腫は漿膜腔を覆う中皮に発生する悪性腫瘍であり、人をはじめ犬や猫、産業動物やげっ歯類といった多種の動物に認められている。人では胸膜中皮腫とアスベストの曝露との関連が示唆されているが詳細な発症機序は分かっておらず、薬剤抵抗性のために予後不良の難治性腫瘍として知られている。同様に犬の悪性中皮腫も発症機序は解明されておらず、多くの場合は薬剤抵抗性のため予後不良とされている。これまで人においてはいくつかの悪性中皮腫二次元細胞株が樹立されており、薬剤スクリーニングや *in vitro* 研究に利用されている。一方犬では症例数が少ないことや胸水・腹水貯留を認めた後の進行が比較的早いことなどから樹立された細胞株はほとんどなく、初代培養による二次元細胞や症例報告がほとんどである。これらの背景から犬の悪性中皮腫に対する新規治療薬や腫瘍動態に関する研究のための新たな実験モデルの確立が必要であると考えた。

当研究室ではこれまでに泌尿器がんに罹患した犬の尿サンプルを用いたオルガノイド培養法を確立しており、泌尿器がんオルガノイドが元の腫瘍特性を模していることを報告してきた。そこで今回、心膜中皮腫と診断された犬の胸水サンプルを用いて悪性中皮腫オルガノイドの培養を試みた。3頭の犬から時期をずらして採取された胸水サンプルをもとに合計6検体の悪性中皮腫オルガノイドと二次元培養細胞を作製した。いずれの検体も培養初期では球状で内腔を有するオルガノイドが形成され、電子顕微鏡像において悪性中皮腫の特徴を維持していることが示された。免疫染色では二次元細胞とオルガノイド間で中皮腫マーカーの発現率に違いが認められ、RNAシーケンス解析や RT-PCR により細胞接着因子の発現に差が見られることが示された。特にオルガノイドでは上皮系マーカーの E-cadherin 発現が顕著に増加していることから、胸水サンプル中の悪性中皮腫細胞には上皮系と間葉系の分化の方向性に多様性があり、培養方法によって維持しやすい特性が異なる可能性が示唆された。

現在のところ悪性中皮腫オルガノイドの長期継代・維持に課題が残るものの、オルガノイドと二次元培養の特性の違いを考慮した実験モデルとして利用可能であると考えられる。

## 患者由来トリプルネガティブ乳がん細胞においてEfpは細胞周期関連因子を標的として細胞増殖をもたらす

佐藤 航<sup>1</sup>、池田 和博<sup>1</sup>、後藤 典子<sup>2</sup>、井上 聡<sup>1,3</sup>

堀江 公仁子<sup>1</sup>

<sup>1</sup>埼玉医科大学・医学部・ゲノム応用医学

<sup>2</sup>金沢大学・がん進展制御研究所・分子病態研究分野

<sup>3</sup>東京都健康長寿医療センター研究所・システム加齢医学

トリプルネガティブ乳がん(TNBC: triple-negative breast cancer)は、エストロゲン受容体(ER)、プロゲステロン受容体(PR)、ヒト上皮成長因子受容体(HER2)の発現が欠如し、高浸潤性と転移能を呈して予後不良の乳がんである。ERやHER2を標的とした治療が可能な乳がんと比較してTNBCの治療法は限られており、新しい治療法の確立が急務となっている。我々は、以前、エストロゲン応答遺伝子として、RING、B-box、Coiled-coilの3つのドメインからなるTRIM蛋白質Efp(estrogen responsive finger protein)を同定し、細胞周期の進行を抑制する14-3-3 $\sigma$ の分解を促進することにより、ER陽性乳がんの増殖に重要な役割を担うことを明らかにした[Nature 417, 871, 2002]。最近、乳がんの原発巣と転移巣の遺伝子発現解析により、Efpが乳がんの転移に関わるマスター制御因子として働く可能性が示唆されている。このような背景に基づき、本研究は、TNBCにおいてEfpがどのような役割を担うかを明らかにする目的で行った。倫理基準を満たす患者由来TNBC組織から樹立したTNBC-PDC(patient-derived cancer cells)細胞とTNBC細胞株MDA-MB-231におけるEfpの発現を検討したところ、両がんモデルにおいてEfpはmRNAと蛋白質レベルで共に強発現しており、Efpを標的とするsiRNAの導入により、TNBC両モデル細胞の増殖、移動能、細胞周期の増殖期の割合は有意に減少することが認められた。反対に、Efpの過剰発現では増殖、移動能、細胞周期の増殖期の割合が増加した。さらにTNBC両モデル細胞でのEfp発現抑制によるマイクロアレイ遺伝子発現解析により、細胞周期進行に関連し相互作用し合うCDCA7とHELLSがEfp標的遺伝子候補として同定された。これらの遺伝子を標的としたsiRNAにより各遺伝子の発現抑制を行ったところ、細胞増殖は有意に抑制された。以上より、Efpはトリプルネガティブ乳がんにおいて細胞増殖に促進的に作用し、進行した乳がんにおける有望な治療標的として臨床応用される可能性が期待される。

## 臨床腫瘍のがん関連タンパク質 発現プロファイルを維持したスフェロイドの開発

申育實

国立がん研究センター研究所 希少がん研究分野

新しい薬剤を効率的に開発することは、疾患研究における長年の課題である。2次元（2D）培養細胞や3次元（3D）培養細胞といった *in vitro* モデル、具体的には患者由来がん細胞株、スフェロイド、オルガノイド等は前臨床研究に役立ってきた。しかし、いずれの *in vitro* モデルも臨床腫瘍を完全に再現することはできない。In vivo モデル、具体的にはマウス等の実験動物やゼノグラフトも、前臨床試験に適しているとは言い難い。動物実験に基づく医薬品開発の高い失敗率は繰り返し指摘されている。そのため、臨床腫瘍の薬効を模倣した前臨床がんモデルの開発は急務である。

自発的に凝集した細胞集団のことをスフェロイドという。スフェロイドは増殖細胞による外層、休眠細胞による中央層、壊死細胞による中心層の三つの層から成る三次元構造を形成する。この層構造は、栄養・成長因子の拡散や酸素の輸送が制限されることにより形成される。スフェロイドはこのように部分的に組織を模した構造が簡便に作製可能である。スフェロイドを構成する休眠細胞が薬剤抵抗性を反映する可能性等、スフェロイドの有用性が期待される。薬効に関わるスフェロイドの性質を明確にすることにより、工業的に利用しやすい新規の前臨床モデルの開発が見込まれる。

本研究では、スフェロイドが臨床腫瘍のがん関連タンパク質プロファイルを維持できる培養器材と培地組成の組み合わせを検討した。解析手法としては、逆相タンパク質アレイ（Reverse-Phase Protein Array; RPPA）を用いた。RPPA の利点として、少量のサンプルで実施可能であること、ハイスループットであること、がん関連タンパク質に絞った解析が可能であることが挙げられる。臨床腫瘍と、種々の培養条件で作製したスフェロイドおよび 2D 培養細胞のがん関連タンパク質に対する 94 種類の抗体を用いて RPPA を実施した。その結果、創薬ターゲットとなり得るがん関連タンパク質の発現プロファイルが臨床腫瘍と近似したスフェロイドの作製条件を同定することに成功した。本手法で作製したスフェロイドは、創薬によって極めて有用であると考えられる。



## 新たに樹立した消化管神経内分泌がん細胞の形態機能解析

進士誠一<sup>1,2</sup>、石渡俊行<sup>2</sup>、五味不二也<sup>2</sup>、志智優樹<sup>2</sup>、吉田寛<sup>1</sup>

日本医科大学 消化器外科<sup>1</sup>、東京都健康長寿医療センター研究所 老年病理学研究チーム<sup>2</sup>

【背景】神経内分泌癌（Neuroendocrine carcinoma：NEC）は、神経内分泌腫瘍（Neuroendocrine neoplasm：NEN）の中で最も悪性度が高く、有効な治療法は確立していない。結腸直腸由来の NEC は稀で、培養細胞株はほとんど報告されていない。【方法】上行結腸腫瘍の手術摘出標本から NEC 細胞株（SS-2 細胞）を樹立した（Cancer Sci, 2019）。①超低接着プレートを用いた 3 次元培養で形成された SS-2 細胞の sphere と、2 次元培養の SS-2 細胞（adherent）における癌幹細胞マーカー（CD133, CD166, CD24, CD44）の mRNA 発現を解析した。②大腸癌に対して一般的に使用される抗がん剤を用いて、SS-2 細胞の薬剤感受性を評価した。③TGF- $\beta$  が SS-2 細胞の上皮間葉転換（EMT）を誘導するかを検討した。【結果】SS-2 の sphere では adherent と比較し CD133 mRNA 発現が著明に亢進していたが、通常型大腸癌培養細胞株（HT-29, Caco-2）では差は見られなかった。SS-2 細胞は Caco-2 細胞よりも Oxaliplatin と 5-FU に強い耐性を示した。SS-2 細胞には TGF $\beta$  R-I と TGF $\beta$  R-II が発現しており、TGF- $\beta$  1 を添加するとリン酸化 SMAD2 と SMAD3 が増加した。TGF- $\beta$  1 は E-cadherin mRNA 発現を減少させ、N-cadherin mRNA、Slug mRNA、vimentin mRNA 発現を増加させた。TGF- $\beta$  1 を添加すると  $\beta$  1-integrin と  $\alpha$  2-integrin mRNA が有意に増加し、浸潤能が亢進した。【結語】SS-2 細胞の sphere では CD133 が高発現しており、CD133 が大腸 NEC のがん幹細胞マーカーであることが示唆された。さらに、TGF- $\beta$  1 による  $\alpha$  2-integrin の増加を伴う EMT 誘導は、高い浸潤能を持つ消化管 NEC の性質を裏付けるものと考えられた。通常薬物療法に加え、がん幹細胞と  $\alpha$  2-integrin を標的とした併用療法は消化管 NEC に対する新規治療法となる可能性がある。

## ヒト免疫鶏卵による免疫チェックポイント阻害剤 新規スクリーニングモデルの確立

杉本 大知

徳島大学大学院創成科学研究科 生物資源学専攻

### 【目的】

日本は高齢化社会を迎えがん患者数は増加し、様々な薬物治療が開発されている。臨床現場では転移・進行性のがん治療で行う薬物治療において患者ごとの個別化医療を行うために、有用な薬剤スクリーニング法を開発することが求められており、特に治療法の主軸となっている免疫チェックポイント阻害薬を用いた薬剤スクリーニング法の確立が求められている。ヒト免疫を有するマウスで免疫チェックポイント阻害薬を評価することも可能であるが、コストが非常に高く、実臨床での応用は予算上困難である。そこで低コストである鶏卵モデルを用いた「新規ヒト免疫鶏卵モデルの開発」を行い次世代個別化医療の体制の構築も目指している。

### 【方法】

転卵開始11日目の褐色鶏卵（有精卵）の漿尿膜上にヒト膀胱癌由来細胞株UM-UC-3を移植した。転卵開始15日目の鶏卵にCell Tracker Green CMFDA Dyeで蛍光標識したヒト末梢血単核細胞(hPBMC)を $2 \times 10^5$ cells/eggで血管内投与し、転卵開始16日目に抗PD-1抗体Nivolumabを2.0mg/kgの条件で血管内の血管内に投与した。転卵開始18日目に形成された腫瘍組織を摘出し、腫瘍重量及び蛍光観察、CD3免疫染色法により抗腫瘍効果評価した。

### 【結果】

転卵開始15日目の鶏卵へのhPBMC( $2 \times 10^5$ cells/egg)移植により鶏卵腫瘍へのhPBMCの到達が見られた。また、hPBMC移植鶏卵へのNivolumab投与でhPBMCの腫瘍内浸潤が見られ、未処理群と比較し腫瘍重量が36.5%低下した。

### 【結論】

hPBMC移植鶏卵モデルでの抗腫瘍効果の評価に成功した。さらに、手術検体や種々の細胞を移植したヒト免疫鶏卵での抗腫瘍効果の評価を行い、評価モデル確立を目指す。

## 患者由来異種移植ゼノグラフトを用いた前立腺癌オルガノイドの樹立と応用

砂田 拓郎

京都大学大学院医学研究科 泌尿器科学教室

### 目的

癌オルガノイドは、腫瘍内の不均一性や疾患の表現型の多様性を生体外で再現する研究モデルとして期待されている。しかし、前立腺癌オルガノイドは、臨床検体からの樹立率が15%程度と低く、課題となっている。また、前臨床モデルとして患者由来異種移植モデル (Patient-Derived Xenograft:PDX) が広く用いられているが、遺伝子編集には不向きである。そこで今回我々は、PDXから前立腺癌オルガノイドの作成を行い、遺伝子編集が可能か検討を行った。

### 材料と方法

去勢抵抗性前立腺癌腫瘍組織を用いて樹立したPDXシリーズ(KUCaP PDX) 8系統を用いてオルガノイドの樹立を試み、最低3回以上継代可能な場合に樹立と判定した。オルガノイドを免疫不全マウスに再移植し、Organoid-Derived Xenograft(ODX)を作成したし、各モデルの病理組織を比較した。そしてオルガノイドの遺伝子編集を目的として、ルシフェラーゼの導入を試みた。

### 結果

PDX 8 系統すべてでオルガノイドの樹立が可能であった。また、一部の系統では10回を超える継代が可能で、長期培養が可能であった。病理学的特徴は、同一患者から採取した各モデル間で類似していた。また、ルシフェラーゼ導入を試みたオルガノイド7系統すべてで成功し、マウスに再度移植したところ生着し、生体内イメージングで同定かつ定量化が可能であった。

### 考察

今回PDXを用いて前立腺癌オルガノイドを高率に樹立することが可能であった。また、遺伝子編集により、これまで困難であった体内の腫瘍の定量化も可能であった。PDXを用いた前立腺癌オルガノイドは、今後の前立腺癌研究を推進する強力な研究モデルとして期待できる。

## 口腔がん患者腫瘍移植モデルの樹立

関 祐紀<sup>2</sup>・刈谷 龍昇<sup>1</sup>・Gunya Sittithumcharee<sup>1</sup>  
・吉田 遼司<sup>2</sup>・岡田 誠治<sup>1</sup>

<sup>1</sup>熊本大学大学院 ヒトレトロウイルス学共同研究センター 造血腫瘍制御学分野

<sup>2</sup>熊本大学大学院生命科学研究部 総合医薬科学部門 感覚・運動医学分野 歯

科口腔外科学講座

近年、外科手術で摘出したがん患者の腫瘍組織を、高度免疫不全マウスに移植して作成される

PDX (Patient-Derived Xenograft) モデルが、がん患者の病態を忠実に再現したモデルとして注目されている。この PDX モデルは、がん患者の腫瘍の性質や抗がん剤に対する反応性を保持しているため、新規がん治療薬開発への活用が進められている。

我々は PDX モデルマウス樹立に適した高度免疫不全マウス BALB/c Rag-2/Jak3 KO (BRJ) マウスに 70 症例以上の口腔がん手術検体を移植し、40 症例を超える PDX モデルの樹立に成功している。また、PDX モデルマウスから摘出した腫瘍組織を *in vitro* で長期培養することで、PDX 由来口腔がん細胞株の樹立を進めている。これら口腔がん PDX モデルマウスの腫瘍組織や、PDX 由来口腔がん細胞株を皮下に移植したモデルマウスの組織は、口腔がん患者の腫瘍組織の組織像をきわめて忠実に再現していた。本学会では、樹立した口腔がんの PDX モデル及び PDX 由来口腔がん細胞株モデルについて紹介する。

## Patient-Derived Xenograft model を用いた転移モデルの確立

大豆本 圭

徳島大学大学院医歯薬学研究部 泌尿器科学分野

**【目的】** PDX (Patient Derived Xenograft)モデルは患者由来のがん組織を免疫不全マウス皮下へ移植する研究手法である。PDX 皮下移植モデルでの検討はされているが、転移モデルの確率や画像検査での応用を検討した報告は少ない。今回、治療標的探索や転移病態研究を行うための転移を有する PDX モデルを樹立することが目的である。

**【方法】** 倫理委員会承認のもと、PDX モデルを作製し 3 回以上安定的に継代を行なえるモデルを作製した。転移巣の評価方法は陽電子断層撮像装置 (Positron Emission Tomography/Computed Tomography (PET/CT)) を用いた in vivo イメージングと解剖後の HE 染色での病理学的評価で行った。

**【結果】** 尿路上皮癌 (浸潤性尿路上皮癌、squamous differentiation、Micropapillary urothelial carcinoma)、前立腺癌 (Neuroendocrine differentiation)、前立腺導管癌、陰茎癌から安定的に継代できる PDX モデルを作製した。PET/CT では、主に腋窩リンパ節転移を疑わせる集積を同定できた。傍大動脈周囲や肺転移については描出が困難であった。Micropapillary urothelial carcinoma モデルでは皮下移植での組織では glandular differentiation と Micropapillary pattern が混在していたが、リンパ節転移巣では Micropapillary pattern が主であった。前立腺導管癌モデルでは傍大動脈リンパ節転移により水腎症をみとめたマウスが見られた。

**【結論】** 転移を有する PDX モデルを樹立した。実臨床でのフェノタイプに類似したモデルを作製できた。今後、治療標的探索、転移病態研究を行うモデルとして検討を進めていく。

## HuGEMM™ Modelling Toxicology of Species-Specific Immune Checkpoint Inhibitors

Tina Zhang<sup>1</sup>, Daniel X. He<sup>1</sup>, Cunxiang Ju<sup>2</sup>, Mingkun Zhang<sup>2</sup>, Jessie JJ. Wang<sup>1</sup>, Likun Zhang<sup>1</sup>, Annie An<sup>1</sup>, Henry Q.X. Li<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Crown Bioscience Inc., 16550 West Bernardo Drive, Building 5, Suite 525, San Diego, CA 92127;

<sup>2</sup>GemPharmatech Inc., 12 Xuefu Road, Nanjing, 210089 China

Immune checkpoint inhibitors, including anti-PD-1 and anti-CTLA-4 monoclonal antibodies, have led to impressive clinical outcomes in treating certain cancers. However, the overall success rate of immunotherapeutic drugs remains low, due to poor efficacy (cancer immunotherapeutic effect [CITE]) or unexpected safety risks such as immune-related adverse events (irAEs), underlining the importance of predictive preclinical animal models. Notably, most immunotherapies cannot be modeled in xenograft tumor models, due to their immunodeficient phenotype, or syngeneic models, as most biologics are usually species-specific. Given these limitations, genetically engineered humanized mouse models (HuGEMM™) and syngeneic cell lines (HuCell™), where human drug target gene(s) replace the original mouse ortholog(s), have been broadly used to assess species-restricted biologics for CITE. Since most irAEs in biologics are on-target toxicities, it is potentially possible to model the irAEs of biologics using non-tumor bearing HuGEMM. In this study, the PD-1/CTLA-4 double knock-in (dKI) HuGEMM is used as an example to provide more insights into irAE evaluation in preclinical models.

## マイクロキャビティ容器を用いた細胞凝集体の大量生産とハイスループットスクリーニング用 Corning® マイクロプレートへの分注について

田口 亜紀子

コーニングインターナショナル株式会社

従来の二次元 (2D) 細胞培養に比べて、より生理学的な 3D モデルの利点が増えるにつれて、医薬品及びバイオテクノロジー研究では、三次元(3D) 細胞培養の普及が増えています。コーニングマイクロキャビティ容器のプラットフォームは、3D 細胞凝集モデルを利用している方が簡単にスケールアップをすることができます。マイクロキャビティの主な目的はバルクスフェロイド生産が目的で、細胞治療用途または、パーソナルライズされた治療スクリーニングのための患者特異的腫瘍のスケールアップのためとなります。大量生産されたスフェロイドを分類する能力は、パーソナルライズ化された薬剤のスクリーニングに有用です。患者の腫瘍サンプルをスケールアップした後に、スフェロイドを選別し、スクリーニングのためにマイクロプレートに分注することができます。Union Biometrica BioSorter® Large Particle Flow Cytometer は蛍光によって分類することもできるので、関心のある特定の表現型について スフェロイドを選別することができます。マイクロキャビティ容器の基盤は、1cm<sup>2</sup>あたり約 157個のガス透過性のミクロンサイズのウェル (“マイクロキャビティ”と呼ばれます) を有するように形成されたポリスチレンフィルムで、マイクロキャビティは約 500µm(直径)と 600µm(深さ)で、超低接着表面(ULA)を有します。超低接着表面の丸底ウェルボトムの形状は、重力などで凝集体としての細胞の成長を促進します。マイクロキャビティ容器単体としての性質は、細胞凝集体をバルクで増殖させることができ、重要なことは全て同一条件で培養することにあります。Union Biometrica 社は、大きさや脆弱性のために現在の自動化された方法では処理できないオブジェクトのソーティングと分注のために、専用の自動フローサイトメトリー機器を開発しました。この度、来年 1 月末に国内で販売予定のマイクロキャビティ容器を用いて大量に生産された 3D 細胞凝集体のサイズおよび蛍光に基づくソーティングのための BioSorter® Large Particle フローサイトメーターの社内評価のために実施された Union Biometrica 社と弊社のコラボレーションについて述べます。

## 超希少がん、腹膜偽粘液腫の治療開発：患者由来細胞株の樹立と抗がん剤の同定

野口玲<sup>1</sup>、吉松有紀<sup>1</sup>、申育實<sup>1</sup>、大崎珠理亜<sup>1</sup>、秋山太郎<sup>1</sup>、小野拓也<sup>1</sup>、安達雄輝<sup>1</sup>、町田香織<sup>1</sup>、柳原五吉<sup>1</sup>、吉田裕<sup>2</sup>、清野透<sup>3</sup>、米村豊<sup>4</sup>、近藤格<sup>1</sup>

国立がん研究センター希少がん研究分野<sup>1</sup>

国立がん研究センター中央病院病理診断科<sup>2</sup>

国立がん研究センター先端医療開発センター<sup>3</sup>

岸和田徳洲会病院腹膜播種センター<sup>4</sup>

【背景と目的】腹膜偽粘液腫は、腫瘍細胞が腹腔内に播種し、粘液を産生することによりさまざまな症状を起こす疾患群である。腫瘍細胞は自身が産生する粘液に包まれ、腫瘍細胞が包まれ、放射線および抗がん剤に抵抗性を示す。そのため、腹腔内より腫瘍および粘液を完全に除去する完全減量切除術と切除後に温めた抗がん剤を腹腔内に直接投与する腹腔内温熱化学療法を行う複合治療が開発され、予後が著しく改善された。一方で、この複合治療は侵襲度が非常に高く、合併症が多い。また、治療を施行できる施設も日本で数か所と限られている。腹膜偽粘液腫の新しい治療開発が必要である。しかし、腹膜偽粘液腫の発生頻度は100万人に1人で、希少性のため治療開発は遅れている。また、治療開発のために必要な疾患モデルも無い。本研究では、①腹膜偽粘液腫の患者由来細胞株を樹立すること、②抗腫瘍効果のある抗がん剤を同定することを目的とした。

【方法】虫垂原発の高悪性度腹膜偽粘液腫の大腿転移症例の腫瘍組織を用いて、患者由来腹膜偽粘液腫細胞株を樹立した。樹立細胞株の腫瘍性を確認するためにシーケンスを施行し、遺伝子変異を調べた。悪性腫瘍治療薬214剤を用いて薬剤感受性試験を行い、抗腫瘍効果のある抗がん剤を同定した。ヌードマウスに樹立細胞を腹腔内に移植し、腫瘍形成能を調べた。

【結果】高悪性度の腹膜偽粘液腫の転移巣から患者由来細胞株、NCC-PMP1-C1を樹立した。腹膜偽粘液腫に特徴的なKRAS遺伝子変異c.35G>Tを同定した。薬剤感受性試験においては、homoharringtonineとdaunorubicinで抗腫瘍効果を認めた。同所移植を行ったヌードマウスは腹部膨隆を呈し、腹腔内に結節の形成および粘液の貯留を認めた。結節の病理所見として、HE染色では粘液中に核異型を有する腫瘍細胞を認めた。免疫染色ではCK20、CDX2、SATB2の発現を認め、腫瘍細胞が消化管上皮細胞由来であることが示唆された。ゼノグラフトの腫瘍組織、元腫瘍組織、樹立細胞について、HE染色および免疫染色の病理学的所見は同様であった。以上、高度悪性度の腹膜偽粘液腫の患者由来細胞株の樹立に成功した。また樹立細胞株を用いて、抗腫瘍効果を有する抗がん剤を同定した。疾患モデルが存在しない腹膜偽粘液腫において我々の細胞株は腹膜偽粘液腫の治療戦略の開発に有用であると考えられる。



## 患者由来組織同所移植モデルを用いた骨肉腫に対する有効なマルチキナーゼ阻害薬の検索

樋口 貴史

金沢赤十字病院

【目的】骨肉腫のように薬剤開発が進まない稀少がんでは、別の疾患の治療薬を転用する drug repurposing が注目されている。我々は患者腫瘍をマウスに同所性移植したモデル(患者由来組織同所移植モデル)を用いて、骨肉腫に有効な薬剤を見出す解析を行っている。マルチキナーゼ阻害薬は腫瘍の増殖に必要な受容体や因子を複合的に阻害する分子標的薬で、骨肉腫にも効果が期待されているが、骨肉腫では臨床応用に至っていない。本研究の目的は骨肉腫の患者由来組織同所移植モデルを用いて、骨肉腫に有効なマルチキナーゼ阻害薬を見出すことである。

【方法】骨肉腫患者 2 例の腫瘍組織を用いて、骨肉腫患者由来組織同所移植モデルを 2 系統樹立し、コントロール群、cisplatin (標準治療) 群と各種マルチキナーゼ阻害薬群 (pazopanib 群, crizotinib 群, sunitinib 群, sorafenib 群, regorafenib 群) にランダムに振り分け、2 週間の治療を行った。治療中は、腫瘍サイズとマウス体重を週 2 回測定した。治療後に腫瘍を切除し、治療効果を組織学的に評価した。

【結果】いずれのモデルでも、cisplatin 群, crizotinib 群, pazopanib 群では有意な増殖抑制効果を認めなかった。Sunitinib 群と sorafenib 群では、片方のモデルでのみ有意な増殖抑制効果を認めた。Regorafenib 群では両モデルで有意な増殖抑制効果を認め、切除腫瘍の広範な壊死と線維化を認めた。すべての群において、治療前後の有意な体重減少を認めなかった。

【考察】患者由来組織同所移植モデルは腫瘍組織や腫瘍周囲環境を再現できるため、薬剤の治療効果の予測能が高いと報告されている。Regorafenib は結腸癌、肝癌、GIST でのみ使用可能で、多様なキナーゼを阻害し抗腫瘍効果を発揮する。今回、骨肉腫患者由来組織同所移植モデルにおいて、regorafenib が他のマルチキナーゼ阻害薬と比較して、腫瘍増殖を有意に抑制することを見出し、regorafenib が骨肉腫治療に有効な可能性がある。

## 骨肉腫におけるHAT-HIFメカニズムの解明と新規治療薬の開発

増田達哉, 巽康年, 渡部隆義, 上久保靖彦

千葉県がんセンター研究所 発がん制御研究部

骨肉腫は小児および青年期の若年層に好発する原発性骨腫瘍である。5年生存率は約70%と比較的良好ではあるが、転移を起こしやすい特徴があり、転移および再発性の骨肉腫における5年生存率は30%未満であり、現在、骨肉腫の治療として外科的治療、化学療法が行われてはいるが、分子標的療法は未だ開発されておらず、全生存率は過去数十年改善が見られてはいない。本研究では、骨肉腫に対する新規治療標的の同定と、より効果的な治療戦略を開発するため、ヒストンアセチル基転移酵素(HAT)活性をもつ転写コアクチベーターである p300 に着目し研究を行った。p300 はヒストンをアセチル化することで、クロマチンリモデリングを介して遺伝子発現を調節する役割を持つ。また、転写因子や転写機構に結合することで、様々な遺伝子の転写をエピジェネティックに調節している。近年、複数の固形腫瘍において p300 の発現が予後不良と関連していることが報告されており、転移との関連も示唆されている。まず、p300 阻害剤により *in vitro* および *in vivo* において p300 を抑制すると、アポトーシスが誘導され、ヒト骨肉腫細胞株の増殖が効率的に抑制されることが明らかとなった。スクラッチアッセイ及び細胞遊走アッセイにおいて、p300 抑制により骨肉腫細胞の遊走能は低下し、転移抑制に繋がる可能性が示唆された。また、p300 の阻害により、主に固形腫瘍の低酸素メカニズムで中心的な役割を果たしている HIF が抑制され、下流のターゲットである VEGF と Glut1 が効果的に抑制された。さらに、RNAi による特異的な HIF 阻害はアポトーシスを誘導し、p300 ノックダウンに伴う増殖抑制は HIF の過剰発現によって有意にレスキューされた。これは p300-HIF が骨肉腫の増殖メカニズムに極めて重要な役割を果たしている可能性があることを示唆している。次に、スーパーコンピューターシミュレーションに基づく低分子ライブラリーのスクリーニングにより、新規 HAT 阻害剤として非構造展開 HIT 化合物を抽出した。HIT 化合物も、骨肉腫細胞において、HIF パスウェイを抑制し、遊走能の低下及び効果的な細胞増殖抑制効果を示した。本研究により、p300-HIF コンプレックスは、骨肉腫における新規の治療標的となり、我々が開発中である HIT 低分子が転移性の骨肉腫の新しい治療薬になる可能性があることが示唆された。

## 患者由来がん細胞培養、マウス移植に利用する、コラーゲン、ラミニン、ヒアルロン酸を用いた新規 3次元細胞培養基材

村澤 裕介

(株) ニッピ バイオマトリックス研究所

### 【背景、目的】

生体外臓器形成に汎用されるのが、細胞の三次元培養（3D 培養）であるが、生体内の細胞を生体外で培養育成し、生体内を模倣した組織を作り上げるのは至難である。そこで、我々は、生体内を模倣した組織形成誘導に適した、生体外培養基材構築を課題として、コラーゲンとラミニン 511E8 断片(iMatrix-511)、およびヒアルロン酸（HA）を成分とする新たな三次元培養基材、名称「MatriMix (511)」を開発した。現在世界標準として汎用され、幅広いシェアを持つ 3D 培養 ECM として、Matrigel (corning 社)がある。Matrigel は使い勝手の良い、汎用性のある優れた 3D 培養 ECM ではあるが、基底膜成分が主成分で線維性コラーゲン等の間質成分が少ない故に生体外臓器形成に不十分という欠点を持つ。患者由来大腸がん細胞の三次元培養、形成スフェロイドのマウス移植による癌形成で MatriMix (511) 3D 培養の有効性を検討した。

### 【方法】

患者由来大腸がん細胞を用い、MatriMix 基材中でオルガノイドを形成、マウス移植による癌形成 (PDSX: Patient-Derived Spheroid Xenograft) モデルを用いて評価した。

### 【結果と考察】

MatriMix (511)を用いた患者由来大腸がん細胞三次元培養において、転移能マーカーと E-cadherin 両陽性であるヘテロの細胞集団の形成誘導が確認された。また、がん細胞のマウス移植においては、Matrigel 同様の癌形成が確認された。また、ラミニン 511E8 を用いた MatriMix を使用した移植での形成癌組織では、転移能マーカーである ZEB-1 の高発現が確認された。ラミニン 111E8、ラミニン 332E8 の MatriMix を使用した移植で異なった癌組織形成が観察され、各 ECM を素材とした MatriMix 培養での特長的効果が確認された。MatriMix ゲル内部では、ヒアルロン酸の特徴である細胞周囲での凝集ニッチ形成に伴い、基底膜ニッチ優位な極性を持つ細胞集団と I 型コラーゲンに影響された間質系細胞集団が並行して作られる。MatriMix 内で多様な細胞の共存が観察されるのは、ヒアルロン酸によるコラーゲン間質との隔離とヘテロな ECM 傾斜構造形成にあると考察される。また、コラーゲン型組成やラミニンアイソフォーム組成等の組み合わせを変えた結果は、臓器組織に適した ECM 成分を含む MatriMix により、多様な細胞外環境を誘導可能であることを示唆している。

## 猫乳腺腫瘍組織由来オルガノイドを用いた新規治療法・診断マーカーの探索

山本晴

東京農工大学 農学府 共同獣医学専攻 獣医薬理学研究室

猫の乳腺腫瘍(FMT)は猫の腫瘍の中でも 3 番目に多く、生存率の低さや転移率の高さなどから悪性度の高い疾患として獣医療では知られている。しかし現在確立された治療プロトコルはなく、獣医師の裁量によって薬剤の選択・治療が行われているのが現状である。一方、人の乳腺腫瘍は女性で最も一般的な自然発症腫瘍の 1 つであるが、猫と同様に罹患率や死亡率の高さから注目度の高い疾患である。HER2 や ER,PR をターゲットとした「トリプルネガティブ」乳腺腫瘍は人だけでなく猫においても認められ、遺伝学的、また臨床病理的に人・猫間で類似点があることから、人の自然発症乳腺腫瘍研究では、猫のモデルが使われるケースも見受けられる。

我々はこれまでの研究において、猫の乳腺腫瘍組織を用いてオルガノイドの作製を行ってきた。そして猫乳腺腫瘍オルガノイドの最適な培養条件の検討、摘出された組織ならびにオルガノイドの病理学的特徴やホルモンレセプター発現などの相関性、各症例ごとの抗がん剤感受性の違いについて明らかにしてきた。今回、FMT ならびに猫正常乳腺組織(FMN)由来オルガノイドを用いた遺伝子発現の比較により、新たな治療ターゲットの探索を行うことを目的とした。

FMT サンプル 6 症例、FMN サンプル 3 症例から作成されたオルガノイドから RNA を抽出し、次世代シーケンサーをも用いて RNA シークエンス解析を行った。この度の RNA シークエンスによって、遺伝子発現量の比較解析を行った結果、FMT では 81 個、FMN では 31 個、計 112 個の有意な発現量の差が認められた。中でも、乳腺腫瘍においてエストロゲンシグナルの制御を介してヒト乳がんの悪性化に関与するとされている X 遺伝子発現の有意な上昇が認められた。さらに GSEA 解析ではアポトーシス、上皮間葉転換、エストロゲンに関連する経路の活性が明らかになった。

今回の遺伝子解析を通して、猫正常乳腺・乳腺腫瘍由来のオルガノイドにおいて遺伝子発現プロファイルに明らかな差があることが示され、また乳腺腫瘍の進行とエストロゲン経路との関連性が認められた。今後、X 遺伝子と猫乳腺腫瘍との関連性について、さらに解析を行っていくとともに、乳腺腫瘍罹患猫由来血清を用いたメタボロミクス解析により、早期診断につながるバイオマーカーの探索を行っていく予定である。

## J-PDX ライブラリーにおける Short Tandem Repeat 解析による品質管理の有用性検討

吉野 友美

国立がん研究センター研究所 基盤的臨床開発研究コアセンター 薬効試験部門

がん患者由来腫瘍移植モデル (PDX モデル) は比較的新しいバイオリソースであり、近年抗がん剤における治療効果予測の能力が高いと報告され、注目されている。我々国立がん研究センターでは2018年より日本人がん患者由来 PDX ライブラリー(J-PDX ライブラリー)を構築してきた。PDX 作製では、患者腫瘍を免疫不全マウスへ移植をするが、長期間の飼育が必要となるため、作製過程における品質管理が重要である。同じバイオリソースである細胞株の品質管理としては、Short tandem repeat (STR) 解析が一般的であり、PDX でも STR を実施した報告がある。しかし、継代間の STR アレル変化の特徴や、細胞株のように認証方法としての推奨はまだ報告がされていない。また、Whole Exome Sequencing(WES)による網羅的 SNP 解析も細胞認証に有用であるが、品質管理という観点でのまとまった検討はされていない。今回我々は STR および WES による網羅的 SNP 解析を用いて、J-PDX ライブラリーにおける移植から継代過程での経時的なデータを取得し、品質管理としての有用性の検討をした。サンプルは J-PDX ライブラリーにて 2018 年 8 月 22 日から 2020 年 12 月 17 日に登録された樹立 369 株中 270 株を対象とした。STR 解析には AmpFLSTR™ Identifiler™ Plus PCR Amplification Kit を使用し、GeneMapper ID-X を用いて患者正常 DNA と PDX の一致スコア(GM score)を算出した。WES にて算出された SNP correlation coefficient (CC)を基準に、GM score のカットオフを決定した。設定したカットオフを基準にして得られた結果は、一致 244 株 (90.4%)、判定不能 20 株(2.2%)、不一致 6 株(7.4%)であった。一致群では、Loss of heterozygosity (LOH)が 90%以上起きており、判定不能群では 20 株中 18 株が Microsatellite Instability (MSI) score 3.5 以上であった。一致群と判定不能群では、それぞれ PDX の LOH 頻度と MSI score が患者腫瘍より高くなる傾向がみられた。不一致群では、作製過程における PDX の取り違えとコンタミネーションが起きていた。以上の結果より STR 解析は、解析フローが簡便かつ低コストであり、PDX の樹立工程における品質管理として有用であると考えられる。

トリプルネガティブ乳がん幹細胞の起源ルミナル前駆細胞は、Na<sup>+</sup>ポンプ FXYD3 を利用し抗がん剤耐性を獲得する

李 梦嬌

金沢大学がん進展制御研究所

Targeting cancer stem-like cells (CSCs) remains challenging due to heterogeneity in CSCs. It remains largely elusive if there exists the root of breast CSCs, the common ancestor. Here, undertaking of single cell transcriptomics of triple-negative patient-derived breast CSCs has led us to isolate the root of CSCs that possess mammary stem or luminal progenitor-like traits, quiescent, and persistent after chemotherapy treatment. They seem to evolve into proliferating CSCs that possess the pregnancy-induced alveolar progenitor-like traits, recapitulating the pregnant state. The plasma membrane FXYD3, a subunit of the Na<sup>+</sup> K<sup>+</sup> pump, has enabled to isolate the root of CSCs. They were found to be sensitive to the Na<sup>+</sup> K<sup>+</sup> pump inhibitor cardiac glycosides. After the neoadjuvant chemotherapy, substantially more FXYD3 positive-root CSCs were remained. Therefore, we uncover the targetable root of triple negative breast CSCs which drive tumor resilience through harnessing the Na<sup>+</sup> K<sup>+</sup> pump complex.

# **Establishment and Characterization of a Panel of Advanced Breast Cancer Patient-Derived Xenograft (PDX) Models for Cancer Therapeutic Evaluation**

**Leilei Chen, Xueying Yang, Likun Zhang, Xiaobo Chen, Henry Q.X. Li, Jessie J.J. Wang**

**Crown Bioscience Inc., 16550 West Bernardo Drive, Building 5, Suite 525, San Diego, CA 921**

Despite the progress and development of targeted agents and immunotherapeutics, breast cancer is still the leading cause of death among women worldwide. At present, targeted therapy for breast cancers include endocrine blockage therapy for estrogen receptor positive (ER<sup>+</sup>) tumors, trastuzumab or lapatinib for HER2 positive (HER2<sup>+</sup>) tumors, CDK inhibitors for HER negative (HER<sup>-</sup>) tumors, as well as PARP inhibitors for BRCA1/2 mutations. There is still a high unmet need for triple negative breast cancer (TNBC) and relapsed breast cancers with specific mutations. Breast cancer is a highly heterogeneous disease and reliable breast cancer models are needed to develop new clinical therapies and better reflect tumor biology. Patient-derived xenograft (PDX) models have been widely used for understanding tumor characteristics and represent human heterogeneity more faithfully and thus are suitable for mouse clinical studies for predicting drug efficacy in the clinic. Here we report the establishment and characterization of a panel of breast cancer (BR) PDX models for preclinical research.