

The advantages of the patient-derived orthotopic xenograft (PDOX) mouse models of cancer

Robert M. Hoffman, Ph.D.

Department of Surgery, UCSD
AntiCancer Inc.

A great breakthrough in cancer research was made when Rygaard and Povlsen subcutaneously implanted the first human patient tumor in nude mice in 1969 and passaged it in nude mice 77 times. For the first time, human tumors could be consistently grown in a mouse model. To this day, researchers are doing similar subcutaneous implantation of tumors in immunodeficient mice. However, subcutaneously-implanted tumors almost never metastasize. Thirteen years later in 1982, Sordat made the first orthotopic nude-mouse model of cancer using colon cancer cells. Sordat observed cancer cell invasion, not observed with subcutaneous implantation. In 1991, our laboratory published the first patient-derived orthotopic xenograft (PDOX) model using surgical orthotopic implantation (SOI) in nude mice which enabled for the first time a patient tumor mouse model to mimic the patient. PDOX models have been established with all major cancer types enabling the discovery and evaluation of novel therapeutics, including anti-metastatic and anti-stromal agents, as well as individualized therapy of cancer patients.

Major publications

1. Fu, X., Besterman, J.M., Monosov, A., and Hoffman, R.M. Models of human metastatic colon cancer in nude mice orthotopically constructed by using histologically intact patient specimens. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 88, 9345-9349, 1991.
2. Fu, X., Guadagni, F., and Hoffman, R.M. A metastatic nude-mouse model of human pancreatic cancer constructed orthotopically from histologically intact patient specimens. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 89, 5645-5649, 1992.
3. Yang, M., Baranov, E., Jiang, P., Sun, F-X., Li, X-M., Li, L., Hasegawa, S., Bouvet, M., Al-Tuwaijri, M., Chishima, T., Shimada, H., Moossa, A.R., Penman, S., Hoffman, R.M. Whole-body optical imaging of green fluorescent protein-expressing tumors and metastases. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 97, 1206-1211, 2000.
4. Hoffman, R.M. The multiple uses of fluorescent proteins to visualize cancer in vivo. *Nature Reviews Cancer* 5, 796-806, 2005.
5. Hoffman, R.M. Patient-derived orthotopic xenografts: better mimic of metastasis than subcutaneous xenografts. *Nature Reviews Cancer* 15, 451-452, 2015.
6. Hoffman, R.M., ed. Patient-Derived Mouse Models of Cancer. *Molecular and Translational Medicine*. Coleman, W.B., Tsongalis, G.J., Series eds. Springer Intl. Publishing AG, 2017. ISSN:2197-7852.
7. Hoffman, R.M. Orthotopic metastatic mouse models for anticancer drug discovery and evaluation: a bridge to the clinic. *Investigational New Drugs* 17, 343-359, 1999.



Robert M. Hoffman, Ph.D.

Department of Surgery, UCSD AntiCancer Inc.

EDUCATION:

1965 State University of New York (Buffalo, New York), B.A. (Biology)
1971 Harvard University (Cambridge, Massachusetts), Ph.D. (Biology) 1971

POSTDOCTORAL TRAINING:

1971-1973 Department of Biology, Harvard University.
1973-1975 Massachusetts General Hospital, Harvard Medical School.
1976-1977 The Shemyakin Institute of Bioorganic Chemistry, Academy of Sciences, Moscow, USSR
1978 Weizmann Institute of Science Rehovot, Israel

PREVIOUS ACADEMIC POSITIONS:

1975-1979 Instructor of Pediatrics, Harvard Medical School Massachusetts General Hospital
1979-1983 Assistant Professor, Department of Pediatrics University of California, San Diego School of Medicine
1983-1990 Associate Professor, Department of Pediatrics University of California, San Diego School of Medicine
1990-1995 Professor, Department of Pediatrics University of California, San Diego School of Medicine

PRESENT POSITIONS:

1984-present President, Chairman of Board and CEO, AntiCancer, Inc., San Diego, California
1995-present Professor, Department of Surgery, University of California San Diego
2012-present CEO, Robert M. Hoffman Foundation for Cancer Research

患者由来がん培養細胞を用いた 抗がん剤の評価

高木 基樹

福島県立医科大学 医療-産業トランスレーショナルリサーチセンター

医療-産業トランスレーショナルリサーチセンターで行われている福島医薬品関連産業支援拠点化事業(福島事業)は、生体試料を収集・保存し、それらをそのまま研究機関等に提供する、いわゆる「バイオバンク事業」とは異なり、希少かつ微量な生体試料を、1) 情報に変換する、2) 加工して増やす(がん組織由来培養細胞や担がんマウスなど)、3) 極微量試料の解析技術を開発する(DNA マイクロアレイやタンパク質マイクロアレイなど)、ことにより最大限に活用することを目指している。さらに、これらの情報、生体由来加工試料、解析技術等を利用し、化合物の薬効・毒性評価システム開発や疾患マーカー探索にも取り組んでいる。

これらの研究の一環として、患者のがん組織を活用し、がん組織の状態を反映した抗がん剤評価モデルの開発を行っており、patient-derived tumor xenograft (PDX) モデルの作製、さらには長期培養が可能ながん組織由来培養細胞塊(patient-derived tumor organoid, PDO)の作製を進めている。本事業における“樹立”とは、PDX では生着や維持、PDO では長期培養が可能であることに加えて、網羅的遺伝子発現解析により元のがん組織と、作製したモデルの遺伝子発現プロファイルの類似性の高さを指標に樹立の可否を判断している。現在までに、PDX モデルは100系統以上、PDO モデルは80系統以上の作製が完了している。本事業で樹立したPDXとPDOを、それぞれF-PDXとF-PDOと名付けた。

本講演では、F-PDO 樹立方法とそれらの特性解析、F-PDO を用いたハイスループットアッセイ系の構築について紹介する。我々は肺がん、卵巣がん、子宮体がん等の組織から6ヶ月以上培養可能なF-PDOを樹立した。ほとんどのF-PDOは浮遊培養で樹立・維持し、その構造は特徴的な構造を有している。また、F-PDOと元のがん組織の網羅的遺伝子発現解析と全エクソーム解析を行い、元のがん組織と比較したところ、長期培養後においてもF-PDOの遺伝子発現プロファイルは元のがん組織に類似していた。さらに、がん組織に特異的な変異がF-PDOでも維持されていた。これらのF-PDOを免疫不全マウスに移植し、造腫瘍性を確認しているが、おおよそ50%程度で生着が確認されている。

F-PDOを用いて、抗がん剤のハイスループットアッセイ系の構築を行った。PDOは、一般的に不均一な細胞塊を形成するため、96-wellや384-well plateへ正確かつ均等に播種することが難しく、ハイスループットアッセイに適していない。そこで、我々は樹立したそれぞれのF-PDOに適した細胞塊の小片化条件や高精度な播種方法を検討し、384-well plateでもアッセイ可能な系を構築した。このハイスループットアッセイ系を用いて、80種類程度の代表的な抗がん剤のF-PDOに対する増殖阻害活性を調べた。その結果、F-PDOと既存のがん細胞株との間で抗がん剤の増殖阻害活性のプロファイルに相違があり、F-PDOはがん患者での抗がん剤の薬効に類似した活性を示すことが明らかになった。今後は、さらに多種類のがん種からF-PDOの樹立とアッセイ系の構築を目指している。

【文献】

1. Tamura H, Higa A, Hoshi H, Hiyama G, Takahashi N, Ryufuku M, Morisawa G, Yanagisawa Y, Ito E, Imai JI, Dobashi Y, Katahira K, Soeda S, Watanabe T, Fujimori K, Watanabe S, and Takagi M. Evaluation of anticancer agents using patient-derived tumor organoids characteristically similar to source tissues. *Oncol Rep.*, in press.



高木 基樹

福島県立医科大学 医療-産業トランスレーショナルリサーチセンター

2001年 東京大学大学院 農学生命科学科 博士後期課程修了
 2001年 東京大学 分子細胞生物学研究所 博士研究員
 2002年 株式会社ジーンケア研究所 主任研究員
 2006年 バイオ産業情報化コンソーシアム 特別研究員
 2012年 福島県立医科大学 医療-産業トランスレーショナルリサーチセンター 准教授
 2014年-現在 福島県立医科大学 医療-産業トランスレーショナルリサーチセンター 教授

多層オミックス情報のある腹膜再発がん患者腹水から樹立された124種のPDC (Patient-derived cell line) とその高い有用性

佐々木 博己

国立がん研究センター・研究所 FIOC 創薬標的・シーズ探索部門
先端医療開発センター (EPOC) バイオマーカー探索 TR 分野

英国サンガーセンターでは、約 1000 種のがん細胞株について、主ながん関連遺伝子の変異情報を公開しているが、アジアに多いがん（食道扁平上皮がん、胃がん、肝・胆・膵がんなど）のラインアップは充分ではない。また、その多くは古くに樹立されたもので、病理組織型が不明なものも多い。例えば、胃がんは 28 株に過ぎない。胃がんは分化型と未分化型の 2 種に大別される。びまん性に増殖する未分化型は、ピロリ菌感染のない胃粘膜峡部から直接発生し、男女差、民族差は小さいとされている。その特徴的な再発形式は腹膜播種である。この未分化型胃がんに限ると 10 株程度である。

この 5 年間に、次世代シーケンサー等によって、主要ながんの全エクソン解析や CNV 解析による遺伝子異常リストが公開されている。しかし、ドライバー候補遺伝子変異頻度は数 % 以下のものが多く、該当する遺伝子異常をもつ細胞株（内在性変異株）を既存のバンクから探そうとしても、見つからないことが多い。その際、同種のがん細胞株で遺伝子改変を行って機能を調べようとすると、その細胞に同一分子経路内の別の遺伝子に異常がもともとあれば、改変遺伝子の機能は打ち消される。また、仮に機能が出たとしても、強制的なものであり、もともと見つかった患者のがんでの機能を示していることにはならない。そもそも、患者の細胞株があれば、手間な遺伝子改変ではなく、siRNA 導入やゲノム編集のみでがん遺伝子として働きや依存性を簡単に知ることができる。当然、検体当たり 50-300 程度見つかる変異遺伝子の網羅的機能解析も可能である。このようにゲノム解析対象試料から直接樹立された細胞株（PDC, Patient-derived cell line）は極めて有用である。

当センターの FIOC では、上記の理由に加え、転移性のアジアがんオミックス解析を可能にするため、がん患者腹水から新たな細胞株の樹立を行ってきた。2010 年から開始し、未分化型胃がん患者 49 例から亜株を含め 86 細胞株（NCC Stomach Cancer: NSC シリーズ、17 例 21 既存株と合わせると 107 株を保有）の樹立に成功した。同様に、膵がん 23 例 30 株、卵巣がん 6 例 7 株、および胃-食道接合部がん、胆管がん、中皮腫、脂肪肉腫、各 1 例 1 株の樹立に成功している。また、日本では食道扁平上皮がん細胞株の樹立、バンクへの寄贈が進んでおり、KYSE シリーズ 39 株、TE シリーズ 9 株、その他 4 株の合計 52 株を入手することができる。そのうち 12 株は 10^7 細胞を免疫不全マウスに移植しても 2 ヶ月以内に腫瘍形成が認められない。6 ヶ月ほどで形成される小さな腫瘍を培養、移植を繰り返し、これまで、12 株中 8 株から高腫瘍形成能を獲得した亜株を樹立してきた。これで in vivo 非臨床試験が可能な食道扁平上皮がん細胞株は、52 株中 48 株となった。さらにこのがんで特徴的に遺伝子が増幅、高発現する受容体型チロシンキナーゼ EGFR の阻害剤に対して耐性な 12 株の分離に成功した。

これら自家樹立株の主なものには、in vitro/in vivo イメージングのためのルシフェラーゼや GFP 遺伝子の導入の他、Affymetrix Genechip U133 v2、SNP アレイ、NCC Oncopanel v4 の基本情報を付加している。また、免疫不全マウスの腹腔に接種し、形成された腫瘍について HE 染色、Ki-67 免疫染色、AZAN 染色（間質評価）、PAS 染色（粘液形質評価）を行い病理組織学的プロファイルの蓄積と同時に、腫瘍形成能、悪疫質の評価を進め、CDX (Cell-derived xenograft) モデルの構築も継続している。これらの情報を基に、病院での治験導出を推進するため、国内外の製薬会社との共同研究を遂行している。

【学会賞など】

1998年に日本癌学会奨励賞授賞、2000年日米医学協力研究会・研究員、2002-2004年日本生化学会誌編集参与、2005-2009年日本農芸化学会和文誌編集委員、2012-2014年次世代医療機器評価指標作成事業・テラーメイド医療用診断機器 (DNAチップ等) 審査WG委員。日本癌学会 (評議員)、日本胃癌学会、日本分子生物学会会員。主な著書として、「バイオ実験の進めかた」、「よくわかる分子生物学・細胞生物学実験」、「DNAチップ実験まるわかり」、「microRNA実験プロトコール」など10数冊があり、研究者の指導に役立っている。

【文献】

本内容は、学会以外では未発表。演者は 2018 年 5 月までに、英語原著論文として 149 編報告している (*Cancer Res* 16 報、*Clin Cancer Res* 2 報、*Cancer Sci* 11 報、*Oncogene* 8 報、*Int J Cancer* または *Br J Cancer* 10 報、*PLoS One*、*Scientific Rep*、*Oncotarget* 11 報、*Gastroenterology* 3 報、*PNAS* 3 報、*Nature* 2 報、*Nat. Genet.*、*Lancet*、*Lancet Oncol* 3 報、その他、*JBC*、*JCB*、*MCB* など)。



佐々木 博己

国立がん研究センター・研究所 FIOC 創薬標的・シーズ探索部門
先端医療開発センター (EPOC) バイオマーカー探索 TR 分野

1990 年東京大学大学院農学系研究科農芸化学専攻課程修了 (農学博士)、(財) がん研究振興財団、リサーチレジデントとして、国立がん研究センターで研究を開始し、1991 年に研究員、1994 年から室長、ユニット長、2013 年から FIOC 部門長、2016 から EPOC 分野長 (併任)。北里大学 (1995-1996)、鳥取大学 (2000-2002)、浜松医大 (2000-2001)、東北大学加齢医学研究所 (2003-2004)、滋賀医大 (2003-2008)・講師、東北大学学際科学研究センター・助教授 (2001-2002)、東邦大学・客員教授 (2004-2006)、京都大学・客員教授 (2012-2013) など。

免疫不全マウスによる患者由来異種移植片 (PDX) の作製と研究利用

宮城 洋平

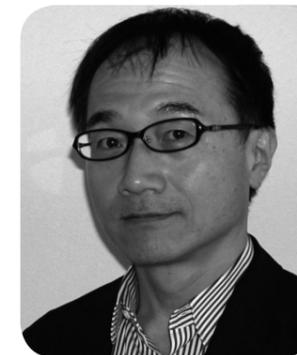
神奈川県立がんセンター臨床研究所がん分子病態／がん治療学部

患者から外科切除されたがん組織を直接、免疫不全マウスに移植して研究に利用する試み、いわゆる Patient Derived Xenograft (PDX) の作製は、株化がん細胞によるヒトがんマウスモデルの限界が数々指摘されるなか、個別化医療のための強力な研究、評価ツールとして様々なレベルの免疫不全を持つマウスで研究が進められてきた。我々は、実験動物中央研究所が作製した T、B、NK 細胞の機能不全を持つ NOG マウス (NOD/Shi-scid/IL2Rγ^{null}) を用いて、100 例強の種々の外科切除腫瘍について、皮下移植 (s.c.)、組織片移植 (単細胞に分散しない) による PDX 作製を試みた。強度の免疫不全マウスを用いることで格段に改善されることを期待した生着率 (engraftment rate) は 53% で、Nude マウスを用いた研究でも、より高い PDX 生着率の報告が散見された。PDX の作製に統一された SOP はなく、生着の定義も明確ではないので、単純に文献間で、その結果を比較できないが、生着には、免疫学的な拒絶以外の、がん細胞が持つ特性、がん組織に有利に働く宿主炎症反応、微小環境 (s.c. か orthotopic か) などが、大きく関わっていることを再認識させられた。我々の PDX では、転移巣の生着率 65% (50/79)、原発巣 27% (11/37) で、転移能を獲得したがん細胞の生着率が高い可能性が示唆された。また、原発巣移植の移植腫瘍の内訳は、約半数の 16 例が非上皮性腫瘍で、消化管間葉系腫瘍 (GIST) 10 例、悪性膠芽腫 5 例、MPNST 1 例で、これらの生着率は 1/16 と極端に低い結果を示した。非上皮性腫瘍の生着、増殖には、微小環境の影響が高いのか、GIST、悪性膠芽腫、といった腫瘍そのものの性質なのか、更なる検討が必要である。生着した Xenograft の組織像は極めて移植腫瘍に近似しており、がん細胞／組織が、移植源と同じ微小環境を再構築できることが生着に大きく関わっていることが解る。

本シンポジウムの「新しい治療法の開発を目指す患者由来がんモデル」の観点からみた NOG マウス PDX の最大の優位性は、移植源と高い近似性を示す組織像、がん間質の再構成にある。最初に患者腫瘍を移植したマウスを F0 とすると、我々の経験では、がん間質は、F3-Xenograft までにマウス由来の細胞で構築されるようになるが、極めて近似している。東京医科歯科大学難治ゲノム病理 (石川俊平教授) との共同研究では、Xenograft の RNAseq による発現解析を、mouse mRNA、human mRNA に分けて解析することで、間質細胞→がん細胞、がん細胞→間質細胞、の関係を分析すること (interactome) が可能となった。当該腫瘍の治療分子標的の探索、同定に於いては、がん細胞側の分子とするか、間質細胞側の分子とするか、その組み合わせとするかなど、詳細な解析による研究開発を期待することができる。一方で、経費と労力、多数の患者を想定した throughput 性を考えた場合に、患者がん組織からのがん細胞の初代培養や、これに細胞外基質を加えた 3 次元培養、更に、間質構成細胞やその幹細胞を加えたオルガノイド培養等の技術が多数開発されている。今後は、これらの技術と PDX の比較解析や、凍結保存した初代培養／3 次元オルガノイド培養から必要に応じて随時 PDX が作製できるか、また、この 2 次的 PDX と通常の PDX との比較、s.c. と orthotopic 移植の比較などを進めて、効率化と用途に合った技術の選択が重要になってくるものと考えられる。

【文献】

1. Establishment of patient-derived cancer xenografts in immunodeficient NOG mice. Chijiwa T, Kawai K, Noguchi A, Sato H, Hayashi A, Cho H, Shiozawa M, Kishida T, Morinaga S, Yokose T, Katayama M, Takenaka N, Suemizu H, Yamada R, Nakamura Y, Ohtsu T, Takano Y, Imai K, Miyagi Y, Nakamura M. Int J Oncol 47(1):61-70, 2015.



宮城 洋平

神奈川県立がんセンター臨床研究所／生体試料センター

1986年 横浜市立大学医学部卒
 1992年 博士 (医学)、横浜市立大学医学部病理学教室助手
 1990年 国立がんセンター研究所 リサーチレジデント
 1994年 スクリップス研究所 (米サンディエゴ) 免疫血管生物学 リサーチフェロー
 1996年 横浜市立大学医学部病理学教室助手、講師
 2000年 神奈川県立がんセンター臨床研究所腫瘍病理研究室 研究員
 2012年 同 臨床研究所がん分子病態学部 部長
 2017年 神奈川県立がんセンター生体試料センター センター長

Organoid culture of bile from advanced cancer patients and its clinical application

Yoshitaka Hippo

Chiba Cancer Center Research Institute

Majority of the patients with biliary tract cancer (BTC) are found inoperable at the initial diagnosis. Consequently, they are often treated by conventional chemotherapy, but BTCs are generally not sensitive to cytotoxic agents, leading to the poor prognosis requiring future development of more effective, molecular-targeted therapeutics. Organoid culture is an emerging technique that enables long-term propagation of primary cells in a physiological setting. This technique has been successfully applied to BTC specimens as well, if successfully resected by surgery. Samples from patients with more advanced BTC, however, have not been subject to organoid culture, partly because collection of tumors in an invasive way, such as percutaneous ultrasound-guided biopsy, could be hardly justified without therapeutic purposes. On the other hand, bile from advanced cancer patients could be alternatively obtained in a relatively non-invasive manner during therapeutic endoscopic retrograde cholangiopancreatography (ERCP), which is conducted to relieve obstructive jaundice caused by disease progression. However, collected samples are frequently accompanied by severe bacterial infection, making it difficult to think of bile as a starting material for cell culture.

As we knew that bile collected during ERCP treatment for cytology examination frequently contained cancer cells, we asked if we could propagate those cancer cells as organoids. By optimizing various processes including vigorous washing and prompt sample processing, we finally established a robust way for organoid culture of bile-derived cells. A total of 82 patients with biliary disease who underwent ERCP have been subject to bile sampling for 3D culture. Organoids were characterized in various aspects, including histology, immunochemistry and tumorigenicity in immunodeficient mice. Success rate for organoid culture from bile was as high as 89% (73/82cases). Organoids were also obtained from surgically resected BTCs and from bile of non-cancer patients with biliary tract stenosis due to stones. Histological studies revealed atypical cribriform structures in tumor-derived organoids, but simple cystic structure in organoids derived from bile of non-malignant patients. Immunopositivity for p53, suggestive of its mutation, was observed in 32%, and HER2 positivity in 20% of the cases tested. About 45 % of organoids developed subcutaneous tumors in nude mice.

Collectively, we successfully conducted organoid culture of advanced biliary tumors from bile collected by ERCP. Recovered organoids well reflected the nature of underlying diseases, potentially contributing to development of companion diagnosis and novel therapeutics for BTC.

Honors

- 2005 Research Fellowship, The Uehara Memorial Foundation
- 2013 Young Investigator Award, Pancreas Research Foundation of Japan
- 2013 Research Grants, Princess Takamatsu Cancer Research Fund
- 2014 Relay-for-Life Research Grants, Japan Cancer Society
- 2015 Research Grants, The Naito Foundation

Publications

1. Sato T, Morita M, Tanaka R, Inoue Y, Nomura M, Sakamoto Y, Miura K, Ito S, Sato I, Tanaka N, Abe, Takahashi S, Kawai M, Sato M, **Hippo Y**, Shima H, Okada Y and Tanuma N. Ex vivo model of non-small cell lung cancer using mouse lung epithelial cells. *Oncology Lett.* 14: 6863-6868, 2017
2. Maru Y, Orihashi K, **Hippo Y**. Lentivirus-based stable gene delivery into intestinal organoids. *Methods Mol Biol*, 1422:13-21. 2016
3. Ochiai M, **Hippo Y***, Izumiya M, Watanabe M, Nakagama H. Newly Defined Aberrant Crypt Foci as a Marker for Dysplasia in the Rat Colon. *Cancer Sci.* 105(8):943-50. 2014 (* corresponding author)
4. Onuma K, Ochiai M, Orihashi K, Takahashi M, Imai T, Nakagama H, **Hippo Y**. Genetic reconstitution of tumorigenesis in primary intestinal cells. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 110(27):11127-32. 2013



Yoshitaka Hippo, MD, PhD

Department of Molecular Carcinogenesis, Chiba Cancer Center

- 1994 MD, The University of Tokyo
- 2000 PhD, Graduate School of Medicine, The University of Tokyo
- 2002 Research associate, The University of Tokyo
- 2005 Postdoctoral fellow, Cold Spring Harbor Laboratory
- 2009 Unit leader, National Cancer Center Research Institute
- 2014 Department head, Chiba Cancer Center Research Institute

患者由来膵癌細胞を用いた 三次元的癌組織の人為的創出

関根 圭輔

横浜市立大学 医学部 臓器再生医学

癌細胞社会を理解するためには、癌細胞のみならず間質に存在する間葉系細胞、血管内皮細胞など、癌を構成する様々な細胞の理解が必須である。膵癌は特に間質が豊富であり、豊富な間質が膵癌の治療抵抗性および予後と深く関わる事が知られている。一方、近年、膵癌において間質のみを標的とした治療はむしろ膵癌を増悪させることが明らかとなってきている。そのため、単に間質を標的とするのではなく、膵癌細胞-間質相互作用を理解し、制御することが重要であると考えられる。膵癌細胞-間質の相互作用の解析、膵癌の薬剤感受性の正確な評価のためには膵癌間質を再現可能な培養系の構築が必須である。

我々はこれまでにヒト組織を構成する複数の細胞間の立体的な相互作用を再現することで機能臓器の創出技術を開発してきた。すなわち、ヒト iPS 細胞由来肝内胚葉、血管内皮細胞、間葉系細胞を一定の条件で共培養することにより自律的な細胞凝集が生じ、肝臓原基 (iPSC 肝芽) が誘導されることを明らかにした (Takebe T, Sekine K et al, *Nature*, 2013; Takebe T, Sekine K et al, *Cell Reports*, in press, Camp JG, Sekine K et al, *Nature* 2017)。

そこでこの技術を立体的ながん組織の人為的な再構成に応用し、患者由来プライマリ膵癌細胞より間質を含むヒト膵癌組織 (膵癌オルガノイド) を再構成することに成功した。膵癌オルガノイドの in vitro における薬剤感受性を評価したところ、癌細胞単独群に比べ、膵癌の治療薬であるゲムシタビンを含む複数の薬剤への感受性が大きく低下することが明らかとなった。膵癌オルガノイドを免疫不全マウスに移植すると、間質ならびに膵管構造を有した膵癌ゼノグラフトが形成され、in vivo においても薬剤感受性が大きく低下することが明らかとなった。これらのことから膵癌オルガノイドは膵癌患者でみられる高い治療抵抗性を再現可能であり、膵癌の治療薬の開発に有効な手法となると期待される。

【文献】

1. **Sekine K**†, Camp JG†, Gerber T, Loeffler-Wirth H, Binder H, Gac M, Kanton S, Kageyama J, Damm G, Seehofer D, Belicova L, Bickle M, Barsacchi R, Okuda R, Yoshizawa E, Kimura M, Ayabe H, Taniguchi H, Takebe T*, Treutlein B*
† equal contribution., * corresponding author. Multilineage communication regulates human liver bud development from pluripotency. *Nature* 546:533-538. (2017)
2. Takebe T, **Sekine K**, Enomura M, Koike H, Kimura M, Ogaeri T, Zhang RR, Ueno Y, Zheng YW, Koike N, Aoyama S, Adachi Y, Taniguchi H. Vascularized and functional human liver tissue from an induced pluripotent stem cell-derived organ bud transplant. *Nature* 499(7459):481-484. (2013)
3. Takahashi Y, **Sekine K**, Kin T, Takebe T, Taniguchi H. Self-condensation culture enables vascularization of tissue fragments for efficient therapeutic transplantation. *Cell Reports* 23:1620-1629. (2018)
4. Takebe T, **Sekine K**, Kimura M, Yoshizawa E, Ayano S, Koido M, Funayama S, Nakanishi N, Hisai T, Kobayashi T, Kasai T, Kitada R, Mori A, Ayabe H, Ejiri Y, Amimoto N, Yamazaki Y, Ogawa S, Ishikawa M, Kiyota Y, Sato Y, Nozawa K, Okamoto S, Ueno Y, Taniguchi H. Massive and reproducible production of liver buds entirely from human pluripotent stem cells *Cell Reports* 21(10):2661-2670. (2017)



関根 圭輔

横浜市立大学 医学部 臓器再生医学

2000年 東京大学大学院農学生命科学研究科修了 博士(農学)
2000年 東京大学分子細胞生物学研究所機能形成分野助手
2009年 横浜市立大学大学院医学研究科臓器再生医学助教
2018年 同 講師

患者腫瘍移植モデル (Patient-derived tumor xenograft) の薬剤開発への活用

岡田 誠治

熊本大学エイズ学研究センター・大学院医学教育部

悪性腫瘍の病態解析や新規治療法の開発には、適切な解析系が必要である。これまでに、様々なマウス腫瘍モデルや腫瘍細胞株などが用いられてきたが、これらのモデルは必ずしも腫瘍の臨床病態を反映しうるものではなく、前臨床試験結果が臨床応用に直結するものではなかった。そのため、前臨床試験で有効とされた薬剤が、臨床試験で無効となる事例がかなりの確率で認められた。近年、様々な高度免疫不全マウスが開発され、ヒト細胞の移植が容易になり、患者腫瘍移植マウスモデル (Patient Derived Tumor Xenograft: PDX マウス) が開発された。PDX は、患者由来腫瘍細胞を、免疫不全マウス皮下・同所・腎皮膜下等に移植して作成する。PDX モデルでは細胞株と異なり当初の腫瘍の性質を維持していることから、in vivo における薬効評価や腫瘍の病態解析や個別化医療への活用が期待されている。最近、米国国立がん研究所 (US National Cancer Institute: NCI) は、従来薬剤スクリーニングに用いてきた腫瘍細胞パネル NCI-60 Human Tumor Cell Lines Screen から、PDX にシフトすると発表した。

1962年 Nude マウスの発見以来、免疫不全マウスにヒト腫瘍細胞を移植した腫瘍マウスモデルの作成が試みられてきた。その後、NOD/Scid マウス等の更に免疫不全度の高いマウスを用いることで高い確率でヒト腫瘍細胞株の移植が可能となった。近年、NOD/Scid マウスや BALB/c マウスをベースとした遺伝子改変マウスを用いて様々な高度免疫不全マウスが開発された。特に、NOG (NOD/Scid/IL2Rγ^{null}) マウス、NSG (NOD/Scid/IL2Rγ^{null}) マウス、NOJ (NOD/Scid/Jak3^{null}) マウスは、成熟した T 細胞 B 細胞 NKT 細胞と NK 細胞の欠損に加えて、補体活性の欠失と樹状細胞及びマクロファージの機能低下が認められる超高度免疫不全マウスであり、様々なヒト由来の細胞の移植・生着が可能であることが示された。私達は、NOD マウス及び BALB/c マウスをベースとした遺伝子改変マウスにより成熟したリンパ球と NK 細胞を消失させた新規高度免疫不全マウス：NOD/Scid/Jak3^{null} (NOJ) マウスと BALB/c Rag-2^{null} Jak3^{null} (BALB/c RJ) マウスを用いて PDX の樹立を試みている。

原発性滲出性リンパ腫 (Primary effusion lymphoma: PEL) は、HHV-8 の B 細胞への感染に起因し、HIV-1 感染などの免疫不全状態で発症する極めて予後の悪いリンパ腫である。PEL 患者由来の細胞を NOJ マウス腹腔内で継代することで PEL PDX を樹立した。一方、培養により同一患者由来の PEL 細胞株、GTO を樹立した。High-throughput screening により薬剤感受性を検討したところ、PEL PDX と GTO では薬剤感受性が異なっており、両者に感受性のある薬剤から Survivin 阻害薬である YM-155 の抗 PEL 作用が確認された。

メコン川流域では、肝吸虫感染を起因とする胆管細胞癌 (Cholangiocarcinoma: CCA) が多発し、大きな社会問題となっている。BALB/c RJ マウスに患者由来胆管細胞癌を皮下移植したところ、約 75% の確率で PDX の樹立が可能であった。また、PDX 細胞の培養から 4 株の細胞株が樹立された。一方、分子標的薬 X の有効性を PDX で確認したところ、標的分子が高発現している PDX では顕著な腫瘍増殖抑制効果が得られた。

PDX は、従来のモデルに比してヒト腫瘍をかなり忠実に再現しており、腫瘍の病態解析・個別化がん治療において有用なツールとなりつつある。前臨床試験結果が臨床試験に反映されやすく、薬剤開発における動物実験の効率的な運用と動物の福祉・愛護にも貢献する。今後、高度免疫不全マウスの改良や PDX ライブラリーの充実により、Precision cancer medicine への活用が期待される。

【学会賞など】

- 2010年 日本白血病研究基金一般研究賞
「ヒト白血病モデルマウスを用いた生体イメージングによる治療評価システムの樹立」
- 2000年 むのはな同窓会学術賞「転写因子c-Fosによる血液細胞の機能制御」
- 1993年 日本血液学会奨励賞「高度に純化されたマウス血液幹細胞の機能解析」

【文献】

1. *Okada S, Kariya R, and Vaeteewoottacharn K. Establishment of Patient-derived tumor xenograft (PDX) model and application for precision cancer medicine. *Chem Pharm Bull (Tokyo)* 66:225, 2018
2. Goto H, Kariya R, Kudo E, Okuno Y, Ueda K, Katano H and *Okada S. Restoring PU.1 induces apoptosis and modulates viral transactivation via interferon-stimulated genes in primary effusion lymphoma. *Oncogene* 36:5252, 2017
3. 岡田誠治. 患者腫瘍移植マウスモデル (Patient-Derived Tumor Xenograft : PDX) とその活用 - 個別化がん治療 (Precision Cancer Medicine) に向けて - *Cytometry Research* 27:51, 2017
4. Goto H, Kojima Y, Matsuda K, Kariya R, Taura M, Kuwahara K, Nagai H, Katano H, and *Okada S. Efficacy of anti-CD47 antibody-mediated phagocytosis with macrophages against primary effusion lymphoma. *Eur J Cancer* 50:1836, 2014



岡田 誠治

熊本大学エイズ学研究センター・大学院医学教育部 教授

- 1985年 自治医科大学医学部卒
- 1985年 茨城県衛生部医務課技術員、11年間茨城県で地域医療に従事
- 1992年 博士 (医学) 取得
- 1996年 千葉大学医学部附属高次機能制御研究センター 助手
- 2000年 千葉大学大学院医学研究科発生医学講座分化制御学 助教授
- 2002年 熊本大学エイズ学研究センター 教授
- 2003年 熊本大学大学院医学教育部 教授
- 2006年 生命資源研究・支援センターアイソトープ総合施設長兼任

Using patient-derived tumor xenografts for drug discovery and to facilitate individualized cancer therapy

Thomas Metz

Charles River Drug Discovery Research Services GmbH

Patient tumor explants transplanted into and passaged in immunodeficient mice (patient-derived tumor xenografts, PDXs) typically retain important characteristics of the original patient tumor including histology, molecular characteristics and drug sensitivity. Consequently, PDX-bearing immunodeficient mice have been used as “avatars” to identify the most promising treatments for the donor patient. In addition, PDXs have been valuable assets for drug discovery, in particular for the preparation of clinical trials. Novel experimental formats like single mouse trials (mouse clinical trials) allow the testing of large and diverse PDX collections, or the exploration of several treatment options for a single patient in a preclinical setting. Results of such experiments can also be used to predict response rates of novel therapeutic agents in the clinic, and to identify biomarkers of response. The feasibility of using PDX models for these purposes will be discussed for reagents that target the tumor cell, the tumor stroma and the immune system.



Thomas Metz, PhD

Research Director, Charles River Drug Discovery Research Services GmbH, Freiburg/Germany

- 1986 Diploma in Molecular and Cellular Biology, Biocenter University of Basel/Switzerland (with Markus Noll)
- 1992 PhD, European Molecular Biology Laboratory, Heidelberg/Germany (with Thomas Graf)
- 1992 Post-doctoral fellow, The Walter and Eliza Hall Institute, Melbourne/Australia (with Jerry Adams)
- 1994 Laboratory Head and Program Coordinator, Boehringer Ingelheim Oncology, Vienna/Austria
- 2002 Director of Drug Discovery, Oncotest GmbH Prof. Fiebig, Freiburg/Germany
- 2015 Head of Project Management, Charles River Discovery Research Services Germany GmbH
- 2018 Research Director, Charles River Discovery Research Services Germany GmbH, Freiburg/Germany

臨床効果を予測するための薬物動態解析 - 動物からヒトへの外挿のために -

濱田 哲暢

国立がん研究センター 分子薬理研究分野 / 薬効試験部門

抗がん薬の開発では、標的分子への作用評価である proof of concept の取得は、創薬開発のマイルストーンの一つである。血中の薬物濃度を解析する従来の薬物動態 / 薬力学評価は、有効性と安全性の解析方法であるが、標的固形組織の評価に限界がある。標的組織への薬剤デリバリーは、細胞間質組織の生理的・構造的な要因、薬物代謝・解毒・薬物輸送タンパク、化合物自体の物理化学的性質、腫瘍血管の透過性の変化・毛細血管構造異常が影響するため、血中薬物動態評価で予測するのは困難である。新規薬物動態解析システムとして、生検組織中の薬物分子分布を可視化する薬物イメージングが期待され、生体を非侵襲的に観察できる in vivo イメージング、侵襲的であるが詳細な解析を可能とする in vitro イメージングに分けられる。

In vitro イメージングは、検体採取が必要であるため、組織レベルでの解析が可能であり、情報量が多いため多くの医薬品にも応用が進められている。特に、質量分析イメージングは、解析対象薬物のラベル化が不要であり、未変化体だけでなく代謝物の生体内分布を解析することが可能である。抗がん薬への応用例として、薬剤スクリーニング、毒性評価、DDS 評価が知られている。ラパチニブ反復投与後のイヌ肝臓内の未変化体および代謝物の分布可視化により、肝障害による炎症部位に選択的に代謝物が分布していることが報告され、肝機能障害メカニズム解明に有益な指標を与えると期待される。また、DDS 製剤の評価として、パクリタキセルを製剤学的修飾ミセル化により腫瘍内取込の増大が動物モデルにて報告されている。薬剤の分布を組織レベルで示すため、抗菌薬、中枢作用薬においても有用性が期待できる。

近年開発が進められている抗体医薬品は、小分子化合物に比べて分子サイズが大きく、標的組織へのデリバリーの評価が重要である。抗体医薬のイメージングでは、PET probe を用いた in vivo イメージングが実用化に向けて検討が進められている。笹田らは、乳がん患者において Her 2 発現量とトラスツズマブの分布の相関を示している。一方、病勢進行や病理学的な病態生理の変化において、細胞レベルの医薬品の局所への到達具合の解析は重要である。しかしながら、質量分析イメージングで感度良くとらえることは困難であった。ブレイクスルーする手法として、組織診断技術である蛍光色素手法が期待される。本法は、検出に蛍光ナノ粒子 (PID :Phosphor Integrated Dots) を用いた 1 粒子蛍光ナノイメージングである。PID はその蛍光強度の強さから、輝点個数という新たな定量手法を可能にしており、乳がんにおける Her 2 発現を細胞レベルで解析しており、細胞膜における Her 2 タンパク分布を明らかにしている。現在、当分野では、PID イメージングを行うことで、前臨床研究における新規薬剤開発や副作用に対する安全性評価、さらには組織中薬物動態の解明に研究を実施している。一部の研究成果であるが、動物モデルにおける抗体医薬トラスツズマブの組織分布は、均一でなく経時的にヘテロな分布を示すことを確認している。

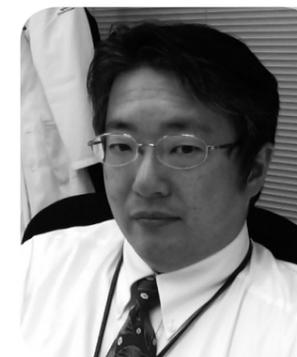
分子イメージング技術は、細胞あるいは全身レベルでの薬物可視化により新しい情報を示す革新的研究手法の一つであり、医薬品開発研究が促進されることを期待している。本講演では、抗がん薬開発のための薬物動態を理解するために、当分野で検討しているイメージングシステムについて紹介する。

【学会賞など】

- 2013年 臨床薬理研究振興財団 学術論文賞
- 2011年 日本薬物動態学会奨励賞
- 2007年 臨床薬理研究振興財団奨励賞
- 2007年 ASCO Merit Award

【文献】

- Nishimura M, Hayashi M, Mizutani Y, Takenaka K, Imamura Y, Chayahara N, Toyoda M, Kiyota N, Mukohara T, Aikawa H, Fujiwara Y, Hamada A, Minami H. Distribution of erlotinib in rash and normal skin in cancer patients receiving erlotinib visualized by matrix assisted laser desorption/ionization mass spectrometry imaging. *Oncotarget*. 2018; 9:18540-18547.
- Nishidate M, Yamamoto K, Masuda C, Aikawa H, Hayashi M, Kawanishi T, Hamada A. MALDI mass spectrometry imaging of erlotinib administered in combination with bevacizumab in xenograft mice bearing B901L, EGFR-mutated NSCLC cells. *Sci Rep*. 2017 Dec 1;7(1):16763.
- Ryu S, Hayashi M, Aikawa H, Okamoto I, Fujiwara Y, Hamada A. Heterogeneous distribution of alectinib in neuroblastoma xenografts revealed by matrix-assisted laser desorption ionisation mass spectrometry imaging: A pilot study. *Br J Pharmacol*. 2018 Jan;175(1):29-37.
- Tsubata Y, Hayashi M, Tanino R, Aikawa H, Ohuchi M, Tamura K, Fujiwara Y, Isobe T, Hamada A. Evaluation of the heterogeneous tissue distribution of erlotinib in lung cancer using matrix-assisted laser desorption ionization mass spectrometry imaging. *Sci Rep*. 2017 Oct 3;7(1):12622.
- Sasada S, Kurihara H, Kinoshita T, Yoshida M, Honda N, Shimoi T, Shimomura A, Yonemori K, Shimizu C, Hamada A, Kanayama Y, Watanabe Y, Fujiwara Y, Tamura K. Visualization of HER2-specific breast cancer intratumoral heterogeneity using (64) Cu-DOTA-trastuzumab PET. *Eur J Nucl Med Mol Imaging*. 2017 Aug 3.
- Aikawa H, Hayashi M, Ryu S, Yamashita M, Ohtsuka N, Nishidate M, Fujiwara Y, Hamada A. Visualizing spatial distribution of alectinib in murine brain using quantitative mass spectrometry imaging. *Sci Rep*, 30:6:23749(2016).



濱田 哲暢

国立がん研究センター 分子薬理研究分野 / 薬効試験部門

- 1992年 熊本大学大学院薬学研究科修了
- 1999年 熊本大学医学部附属病院助手
- 2005年 米国国立癌研究所客員研究員
- 2008年 熊本大学大学院臨床薬物動態学分野准教授
- 2012年 国立がん研究センター研究所 ユニット長
- 2013年 同 臨床薬理部門長
- 2016年 同 臨床薬理研究分野長
- 2017年 同 分子薬理研究分野長 / 薬効試験部門長

CTOSパネルを用いた 薬剤感受性試験

井上 正宏

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 特定教授

組織培養法は100年以上前にはじまり現在に至るまで進歩を続けている。最近、がん細胞を初代培養する技術が、患者腫瘍の特性を保持した培養系として創薬への応用が期待され、急速に利用されるようになってきた。特にSatoらの開発した組織幹細胞培養法をがん細胞に応用した方法（Gastroentelology 2011）が海外では広く用いられている。一方、我々は患者腫瘍検体からがん細胞を調製し三次元培養する新しい方法（cancer tissue-originated spheroid (CTOS) 法）を独自に開発した。CTOS法の原理は調製・培養の過程の中で常に細胞-細胞間接着を維持することにある。CTOS法により患者腫瘍やPDX腫瘍から高純度で細胞死の少ない癌細胞を効率よく調製することができる。これまでに、大腸癌、肺癌、膀胱癌、子宮体癌子宮頸癌でCTOS法が応用可能であることを示した。マウス移植腫瘍を2代以上継代でき、移植腫瘍から調製した多数のCTOSを凍結保存できたものを「CTOSライン」として、多数のラインからなるCTOSパネルの作製を行っている。

CTOS法は感受性試験に応用可能である。まず、肺癌CTOSでEGFRチロシンキナーゼ阻害剤(TKI)感受性に症例間で大きな感受性の差があること、臨床ですでに明らかになっているように、EGFR TKIがEGFRに変異のある肺癌CTOSに有効であることを明らかにした。同様に、大腸癌CTOSでは抗EGFR抗体はKRAS野生型にのみ腫瘍縮小効果がある。これらのCTOSの細胞内シグナルの挙動はその事実を忠実に反映しており、CTOS移植腫瘍の治療実験とも結果が一致する。現在、卵巣癌CTOSの感受性試験と臨床での治療成績を照合する後方視的解析を行っている。

CTOS法ではがん細胞の調製効率が非常に高いことから、CTOS移植腫瘍あるいはPDXからは大量のCTOSが調製できるため、多数の薬剤のスクリーニングに応用できる。まず、子宮体癌CTOSを用いて約100剤のスクリーニングを行い、候補薬はパネル(11例)内で感受性差があることを明らかにした。次にハイスループットスクリーニングへの応用を試みた。CTOSの384プレートへの分配には自動分配機(セルハンドラー:ヤマハ発動機)を用いた。CTOSの増殖は細胞内ATPレベルで評価した。2例の大腸癌CTOSラインをマウス移植腫瘍から調製し、2427薬剤(FDA認可剤と標的既知の低分子化合物)のスクリーニングを行った。100nM以下で7日間の増殖を40%以下に抑制する薬剤を15剤選択した。次に30例の症例から樹立したCTOSラインを用いて、15剤のCTOS間での感受性の差異を検討した。ほとんどの薬剤においてCTOS間で大きな感受性の差異が観察された。同一の作用点を持つ3組の薬剤(6剤)は、感受性順位が有意に関連したことは、アッセイの信頼性を支持している。

近年、DNAシーケンス技術の革新とコストダウンによってがんゲノムのシーケンスが容易になったことから、ゲノム診断に基づくがん治療への道が開かれることとなった。既に臨床実装に向けて国際的に準備が進んでいるが、これまでのクリニカルシーケンスの臨床試験の結果は必ずしも良好ではない。最終的にどれくらいの患者利益があるのか現時点では明らかではない。真の個別化医療を行うためには何らかの追加手段が必要なことは明らかである。既に、がんのクリニカルシーケンスを行い、並行して感受性試験やPDXの作製を行うことは試みられ始めている。感受性試験はクリニカルシーケンスで得られた候補薬剤や薬剤の併用法を絞り込むことにとどまらず、クリニカルシーケンスで候補薬剤が同定できない多くの患者のバックアップになる可能性がある。個別患者の微量な生検材料を用いて薬剤感受性試験を行い、最適な薬剤を選択するためには、さらなる技術革新が必要である。

【文献】

1. Piulats, J. M. et al. **Oncotarget** 9, 15968-15983, (2018).
2. Tashiro, T. et al. **PLoS One** 12, e0174151, (2017).
3. Endo, H. et al. **Oncogene** 36, 2824-2834, (2017).
4. Kiyohara, Y. et al. **Cancer Sci** 107, 452-460, (2016).
5. Okuyama, H. et al. **Am J Pathol** 186, 899-911, (2016).
6. Kondo, J. et al. **Proc Natl Acad Sci U S A** 108, 6235-6240, (2011).



井上 正宏

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 特定教授

1987年 大阪大学医学部卒
 1987年 臨床研修 大阪大学第一外科、小児外科など
 1991年 大学院 大阪大学小児外科、大阪大学細胞工学センター
 1998年 博士研究員 UC San Francisco
 2001年 大阪国際がんセンター(旧大阪府立成人病センター) 生化学部 部長
 2018年 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 特定教授

癌の鶏卵モデル: 患者由来がんモデルと ナノ治療開発系としての可能性

玉野井 冬彦

京都大学、高等研究院
カリフォルニア大学ロサンゼルス校

癌を鶏卵の中でつくる癌の鶏卵モデルは簡便かつ有望な動物モデルである。今までも癌の動物モデルとして使われてきたが、近年の個別医療の進展によりその価値が明らかになってきている。私の発表ではこのモデルの特徴、個別医療への応用、またこの系を使い新規ナノ粒子の解析を行った結果を報告したい。

このモデルを作るには有精卵を用いる。有精卵を10日間インキュベートし、殻に窓をあけ、鶏の胚をとり囲んでいるChorioallantoic membrane (CAM)の上にヒトの癌細胞を植えつくと3日後には癌ができる。非常に早く癌ができるのは栄養の高いCAM膜の環境と免疫系がまだ完全に確立されていないことによっていると考えられる。私達は卵巣癌、肺癌、メラノーマ、脳腫瘍の細胞を使い、鶏卵にヒトの癌を作ることに成功している [1]。できた癌の切片を作りトリクローム染色やVimentinに対する抗体を使った染色をおこない、できた癌がTumor microenvironmentを形成していることを確かめた。また、癌には多量の血管形成がおきていることがわかった。実際、鶏卵で作った癌と患者の癌をH&E染色で比較すると非常に似ていることが確認される。

私達は、最近、卵巣癌の患者のサンプルを鶏卵に植え付けることに成功した (City of Hope Cancer Centerのグループとの共同実験) [1]。患者の癌サンプルを小さく碎きCAM膜上に乗せてから4日後に鶏卵のなかで癌を作ることができた。また、鶏卵に抗癌剤を静脈注射すると、2, 3日後に癌が完全に消滅した。そこで私達はこの系をPatient derived chicken model (PDC model)と呼んでいる。このPDCモデルを用い、抗癌剤のスクリーニングを行うことができる。一連の操作が短期間でできるという点で他の患者由来のモデルに比べ利点が多いと思われる。それぞれの患者に適した抗癌剤をさがす、個別医療にユニークな貢献ができる系なのではないかと私達は考えている。

癌の鶏卵モデルは新規の癌治療を検証するアッセイ系としても有望と思われる。私達は、最近“Biodegradable PMO” (生体分解型メソポーラス有機シリカ) という新規のナノ粒子を開発している [2,3]。これらは約200 nmの直径の多孔性のナノ粒子で、粒子骨格に生体内で分解されるS-S結合などの有機成分を含んでいる。抗癌剤であるDoxorubicinを内包したBiodegradable PMOを血管に打ち込むことにより癌を消滅させることができる。鶏の胚から肝臓、腎臓、心臓、肺、小腸などを切り出して調べるとDoxorubicinのデリバリーによる毒性はみられなかった。フリーのDoxorubicinは強い毒性を示すことを考えると、この知見は興味深い。ナノ粒子を使うとDoxorubicinの毒性が見られないのは、抗癌剤が癌に選択的にデリバリーされているからと考えられる。実際にこの抗癌剤の持つ赤い蛍光を調べると、癌でのみ検出された。さらに、蛍光をもったナノ粒子の分布を調べると癌への顕著な蓄積がみられた。現在、新規ナノ粒子の選択的な癌蓄積についてさらなる検討を行っている。

癌の鶏卵モデルは、ヒトの癌のレプリカを短期間で鶏卵の中に作れること、安価であること (有精卵は一つ65円)、また簡便で大規模な実験に適していることなど、利点が多い。今後この系が広く使われることを期待したい。

【文献】

1. B.T. Vu et al. Chick chorioallantoic membrane assay as an in vivo model to study the effect of nanoparticle-based anticancer drugs in ovarian cancer. (2018) Scientific Reports in press.
2. J. Croissant et al. Biodegradable ethylene-bis(propyl)disulfide-based periodic mesoporous organosilica nanorods and nanospheres for efficient in vitro drug delivery. (2014) Adv Mater 26, 6174.
3. J. Croissant et al. Biodegradable oxamide-phenylene-based mesoporous organosilica nanoparticles with unprecedented drug payloads for delivery in cells. (2016) Chem. Eur. J. 22, 14806.



玉野井 冬彦

京都大学、高等研究院、物質-細胞統合システム拠点、特定教授

1977年 理学博士、名古屋大学理学部分子生物学
1978年 ハーバード大学医学部、博士研究員
1980年 コールドスプリングハーバー研究所、主任研究員
1985年 シカゴ大学生化学部、助教授
1993年 シカゴ大学生化学部、准教授
1997年 カリフォルニア大学ロサンゼルス校、教授
1996年 ジョンソン癌研究所シグナル伝達部門、部門長
2008年 カリフォルニアナノシステムズ研究所、研究主任
2017年 京都大学、高等研究院、特定教授

Analysis of regulatory mechanisms in breast cancer-stem like cells by using spheroid cultures and PDX models

Noriko Gotoh

Division of Cancer Cell Biology, Cancer Research Institute, Kanazawa University

Breast cancer is the most common type of cancer among women throughout the world. The increasing rate of mortality due to breast cancer raises serious problems. Recent evidence indicates that tumor tissues are comprised of heterogeneous cell populations including a relatively small number of cancer stem-like cells (CSCs) and large number of differentiated cancer cells. CSCs tend to survive irrespective of conventional chemotherapy, radiotherapy, and following treatment with molecular targeted drugs, because these treatment strategies target rapidly proliferating differentiated cancer cells but not CSCs. Targeting CSCs is thus important to improve the prognosis of cancer patients, however, molecular targeting drugs against CSCs are still unmet needs, since it is still largely uncertain the molecular mechanisms how CSCs are maintained in tumor tissues. CSCs are surrounded by a variety of cell types, including differentiated cancer cells and cancer associated fibroblasts (CAFs). All these cells create a microenvironment that is called the CSC niche. Recent emerging evidence indicates that CSCs survive by utilizing the CSC niche. However, the underlying molecular mechanisms are still unclear.

In order to clarify the molecular mechanisms how CSCs are maintained in CSC niche in human breast cancer tissues, we established patient-derived tumor spheroid culture and patient-derived xenograft (PDX) models by using primary breast cancer tissues from the patients. We also established co-culture system of patient-derived tumor spheroids and CAFs.

Growth factor or cytokine signaling plays important roles for a variety of biological aspects in physiological and pathological conditions, including tumorigenesis. It is thought that inflammatory microenvironment creates a pro-tumorigenic state through production of growth factors or cytokines. We found that growth factor/cytokine signaling plays critical roles for the communication between cancer stem-like cells and CSC niche. We identified key growth factors or cytokines that are derived from cancer cells or CAFs. We uncovered the various key mechanisms mediated by signaling through NF- κ B, IGF1 receptor, beta-catenin, semaphorin, and so on. There are various mechanisms: autocrine-paracrine mechanisms, regulation of stemness, regulation of symmetric-asymmetric division and regulation of metabolism. CSCs appear to survive and divide by using these mechanisms in order to adapt in the different conditions of the CSC niche. Among them, we have been able to identify proper molecular targets for CSCs to eradicate tumors. I would like to talk about several key mechanisms we have recently identified for maintenance of CSCs in the CSC niche.

【学会賞など】

- 平成10年 ヒューマンフロンティア財団 (HFSP)、 Long Term Fellowship
- 平成11年 上原記念生命科学財団 リサーチフェローシップ
- 平成18年 財団法人ノバルティス科学振興財団、研究助成金
- 平成19年 内藤記念科学振興財団研究助成
- 平成19年 細胞科学記念財団 研究助成
- 平成30年 高松宮妃癌研究基金 研究助成

【文献】

1. Sasahara A, Tominga K, Nishimura T, Yano M, Kiyokawa E, Noguchi Miki, Noguchi Masakuni, Kanauchi H, Ogawa T, Minato H, Tada K, Seto Y, Tojo A, Gotoh N.: An autocrine/paracrine circuit of growth differentiation factor (GDF) 15 has a role for maintenance of breast cancer stem-like cells. *Oncotarget*, 8, 24869-24881, 2017
2. Tominaga K, Shimamura T, Kimura N, Murayama T, Matsubara D, Kanauchi H, Niida A, Shimizu S, Nishioka K, Tsuji E, Yano M, Sugano S, Shimono Y, Ishii H, Saya H, Mori M, Akashi K, Tada K, Ogawa T, Tojo A, Miyano S, Gotoh N.: Addiction to the IGF2-ID1-IGF2 circuit for maintenance of the breast cancer stem-like cells. *Oncogene*, 36,1276-1286, 2017
3. Murayama T, Nakaoku T, Enari T, Nishimura T, Tominaga K, Nakata A, Tojo A, Sugano S, Kohno T, Gotoh N.: Oncogenic fusion gene CD74-NRG1 confers cancer stem cell-like properties in lung cancer through a IGF2 autocrine/paracrine circuit, *Cancer Res*, 76, 974-983, 2016.
4. Nakata A, Yoshida R, Yamaguchi R, Yamauchi M, Tamada Y, Fujita A, Shimamura T, Imoto S, Higuchi T, Nomura M, Kimura T, Nokihara H, Higashiyama K, Kondoh K, Nishihara H, Tojo A, Yano S, Miyano S, Gotoh N.: Elevated beta-catenin pathway as a novel target for patients with resistance to EGF receptor targeting drugs. *Sci Rep*, 5, 13076, 2015
5. Hinorara K, Kobayashi S, Kanauchi H, Shimizu S, Nishioka K, Tsuji E, Tada K, Umezawa K, Mori M, Ogawa T, Inoue J, Tojo A. & Gotoh N.: ErbB/NF- κ B signaling controls mammosphere formation in human breast cancer. *Proc. Natl. Acad. Sci., USA*, 109, 6584-6589, 2012.



後藤 典子

金沢大学がん進展制御研究所 分子病態研究分野 教授

- 1989年 金沢大学医学部卒業
- 1993年 東京大学大学院医学系研究科博士課程 (内科系臨床医学) 修了
- 1993年 東京大学医科学研究所助手 (細胞遺伝学分野)
- 1998年 ニューヨーク大学医学部 Department of Pharmacology, Visiting scientist
- 2002年 東京大学医科学研究所講師 (腫瘍抑制分野)
- 2005年 東京大学医科学研究所助教授 (腫瘍抑制分野)
- 2007年 東京大学医科学研究所特任准教授 (独立)
- 2013年 金沢大学がん進展制御研究所教授 (分子病態研究分野) 現在に至る

がん臨床検体のスフェロイド培養系を用いた がん幹細胞増殖機構の解析及び抗がん剤奏功性 検証への応用

岡本 康司

国立がん研究センター研究所 がん分化制御解析分野

これまで我々のグループでは、大腸がん及び卵巣癌由来の臨床検体を用いたスフェロイド培養により、長期継代が可能な細胞の樹立を行ってきた。各種発現解析、フローサイトメトリー解析、及びマウス移植実験による造腫瘍性の解析等により、スフェロイド構成細胞のかなりの部分はがん幹細胞の特性を有している事、及びこれらの細胞のマウス移植により原発腫瘍と同様の病理像を呈する腫瘍を再構成できる事が明らかになった。とりわけ進行性大腸がんにおいては過半数の症例において、スフェロイドの樹立が可能であり、難治性大腸がんの細胞パネルとしての有用性が期待される。現在、これらの培養スフェロイド細胞及びそのマウス移植腫瘍を対象として、がん幹細胞特性、がん組織多様性、抗がん剤抵抗性等に関する解析を行なっている。とりわけ、樹立した細胞パネルを用いて、包括的遺伝子発現解析、オンコパネルを用いたがん変異の解析、抗がん剤抵抗性の包括的解析等を行う事により、大腸がん、卵巣がん細胞の層別化、及び新たな治療標的パスウェイの探索を行なっているので紹介したい。

【文献】

1. Ishiguro T, Ohata H, Sato A, Yamawaki K, Enomoto T, Okamoto K. Tumor-derived spheroids: Relevance to cancer stem cells and clinical applications. *Cancer Sci.* doi: 10.1111/cas.13155, 2017
2. Shiokawa D, Sato A, Ohata H, Mutoh M, Sekine S, Kato M, Shibata T, Nakagama H, Okamoto K. The Induction of Selected Wnt Target Genes by Tcf1 Mediates Generation of Tumorigenic Colon Stem Cells. *Cell Reports* 19, 981-994. doi: 10.1016/j.celrep.2017.04.017, 2017
3. Ishiguro T, Sato A, Ohata H, Ikarashi Y, Takahashi R, Ochiya T, Yoshida M, Tsuda H, Onda T, Kato T, Kasamatsu T, Enomoto T, Tanaka K, Nakagama H, Okamoto K. Establishment and characterization of an *in vitro* model of ovarian cancer stem-like cells with an enhanced proliferative capacity. *Cancer Res.* 76, 150-160, 2016
4. Ohata H, Ishiguro T, Aihara Y, Sato A, Sakai H, Sekine S, Taniguchi H, Akasu T, Fujita S, Nakagama H, Okamoto K. Induction of the stem-like cell regulator CD44 by Rho kinase inhibition contributes to the maintenance of colon cancer-initiating cells. *Cancer Res.* 72, 5101-5110, 2012



岡本 康司

国立がん研究センター研究所 がん分化制御解析分野 分野長

1986年 東京大学医学部卒
 1986年 東京大学病院 研修医
 1991年 コールドスプリングハーバー研究所 博士研究員
 1992年 医学博士、東京大学医学系大学院
 1996年 コロンビア大学生物学部 博士研究員
 2000年 国立がんセンター研究所 放射線研究部 室長
 2010年 国立がん研究センター研究所 がん分化制御解析分野 分野長

希少がんの患者由来がんモデルの現状と課題

近藤 格

国立がん研究センター研究所 希少がん研究分野

患者由来がんモデルは、がん研究においてなくてはならないツールとして過去数十年にわたって使用されてきた。In vitro/in vivo のモデルなかりせばありえなかった重要な発見は多く、新しい抗がん剤が次々と開発される今日においては前臨床試験での需要がますます高まっている。患者由来がんモデルとして、in vitro で細胞・組織を維持するモデル系、動物に組織を移植して構築するモデル系などいくつものバリエーションが開発されてきた。

希少がん研究分野では、希少がんを対象として細胞株およびゼノグラフト株の樹立を行っていた。症例が少なく研究に使用できる臨床検体が得難いため、細胞株やゼノグラフトが樹立されていない希少がんは多い。そして、そのことが基礎研究や新しい治療法の開発が進まないことの一因となっている。たとえば、臨床検体を用いた解析で見いだされた遺伝子の機能を調べるためには培養細胞が不可欠である。また、新しく開発された抗がん剤が奏効するかどうか分からない場合、細胞株やゼノグラフトがないがん種では、治療法の開発はそこで中断したり、前臨床試験のデータなしに臨床試験を実施したりすることになるだろう。希少がんのモデルを樹立し配布することは、希少がんの症例が比較的多く集積する国立がん研究センターに期待されることである。希少がん研究分野では、今までに肉腫を対象として30株以上の細胞株、40株以上のPDXを樹立し、リクエストに応じて研究者や企業に使用していただいている。

希少がんは症例数で定義される悪性腫瘍であり、200種類もの悪性腫瘍が希少がんに分類されている。それぞれの希少がんが異なる分子背景や臨床的な特性を有しており、細胞株やゼノグラフトがそれぞれに必要な。単独の研究施設ですべて樹立することは明らかに困難であり、組織の垣根を越えた活動が必要である。

モデル系が少ない希少がんでは、一つ一つのモデル系の特性を特に吟味して研究に使用する必要がある。樹立した細胞株やゼノグラフトの分子背景を調べてみると、果たして元の腫瘍組織とは歴然と異なっていることがわかる。何にでも使えるモデル系は存在しえないことを前提として、樹立の過程でどのような分子パスウェイが保存されているのか、何の目的に使うことがベストなモデル系なのか、を見極める必要があるだろう。

患者由来がんモデルの開発とその応用は、がん研究のトピックの一つとして盛り上がりを見せている。希少がんの研究ではモデル系が開発は従来から切に求められており、この時流に乗じて今までの遅れを取り戻すことができないものかと考えている。

【学会賞など】

2010年 児玉賞・日本電気泳動学会「電気泳動法を用いたがん個別化医療のためのバイオマーカー開発」、2009年 田宮記念賞・公益財団法人がん研究振興財団「プロテオーム解析によるがんバイオマーカーの開発」、2007年 日本癌学会奨励賞・日本癌学会、「個別化医療の実現を目指した肺がんのプロテオーム解析-肺腺がんの術後再発症例に対し gefitinib を処方した際の奏効性を予測するためのバイオマーカーの開発-」、2004年 Young Investigator Award・Human Proteome Organization「Proteomics of Lymphoid Neoplasms - Proteome-mining for 2D gel -」

肉腫のプロテオゲノミクスの活動について

International Cancer Proteogenomics Consortium (ICPC) に参加している。参加国はそれぞれに担当するがん種についてプロテオゲノミクスの解析を進め、データを共有する。日本からは国立がん研究センターが参加し、肉腫を担当している。肉腫のモデル系やプロテオゲノミクスのデータを参加国間で共有することで、希少がんの研究を推進したいと考えている。いろいろな可能性を検討しつつ、国際連携の場としてICPCを活用していきたい。

【文献】

1. Kondo T. Current status of proteomics of soft tissue sarcomas. *Expert Rev Proteomics*. 2017 Dec;14(12):1131-1140.
2. Pan X et al., Current status of publicly available sarcoma cell lines for use in proteomic studies. *Expert Rev Proteomics*. 2016;13(2):227-40.
3. Rodriguez H et al., Revolutionizing Precision Oncology through Collaborative Proteogenomics and Data Sharing. *Cell*. 2018 Apr 19;173(3):535-539.
4. Kito F et al., Establishment and characterization of the NCC-SS1-C1 synovial sarcoma cell line. *Hum Cell*. 2018 Apr;31(2):167-174.
5. Oyama R et al., Establishment and proteomic characterization of a novel synovial sarcoma cell line, NCC-SS2-C1. *In Vitro Cell Dev Biol Anim*. 2018 Apr 6.



近藤 格

国立がん研究センター研究所 希少がん研究分野 分野長

1992年 岡山大学医学部卒
 1996年 医学博士、岡山大学医学部助手
 1998年 ミシガン大学博士研究員
 2001年 国立がんセンター研究所 生物学部室長 腫瘍プロテオミクスプロジェクト
 2006年 同 プロテオーム・バイオインフォマティクス・プロジェクト プロジェクトリーダー
 2010年 国立がん研究センター研究所 創薬プロテオーム研究分野 分野長
 2014年 同 希少がん研究分野 分野長