

# 患者由来がんモデル研究会 ポスターセッション抄録集

## ポスターセッション

新規の多形肉腫株(NCC-PS1-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

秋山 太郎

RNA階層における乳がん幹細胞制御機構の解明

東京医科歯科大学 大学院医歯学総合研究科

システム発生再生医学分野

内田 雄太郎

抗がん剤開発における腫瘍移植鶏卵モデルの構築

徳島大学大学院社会産業理工学研究部

宇都 義浩

大腸がん転移におけるがん細胞集団の極性転換の役割

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

小沼 邦重

Li-Fraumeni症候群患者からの世界初の肉腫細胞株の樹立

国立がん研究センター研究所

希少がん研究分野

小野 拓也

口腔紡錘細胞扁平上皮癌由来細胞株の樹立

熊本大学病院 歯科口腔外科

川口 翔

Establishment of patient-derived xenograft (PDX)

and cell line of soft tissue sarcoma

熊本大学ヒトレトロウイルス学共同研究センター

Gunya Sittithumcharee

マウスに苦痛を与えない生体組織移植針キットの開発

九州オルガン針株式会社

城戸 響

STAT1活性化細胞により誘引される皮膚扁平上皮がんの集団浸潤

北海道大学 大学院生命科学院

熊谷 祐二

患者由来癌Organoidとゲノム解析を用いた膵胆道癌の個別化医療システムの開発

東北大学病態病理学分野

椎原 正尋

肉腫（サルコーマ）の会たんぽぽの活動と希少がんを取り巻く

状況の変化について

肉腫（サルコーマ）の会 たんぽぽ

志村 敬彬

Application of Patient-Derived Xenograft Model for

Determination of Trastuzumab (a classic anti-HER2 monoclonal antibody)

Immunotherapy towards Cholangiocarcinoma (CCA)

Division of Hematopoiesis,

Joint Research Center of Human Retrovirus Infection,

Kumamoto University

Jutatip Panaampon

悪性末梢神経鞘腫瘍の患者由来細胞株NCC-MPNST6-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

申 育實

ヒト腸管オルガノイドのフォルスコリン誘発性膨潤アッセイの自動化

コーニングインターナショナル株式会社

田口 亜紀子

細胞質アダプタータンパクFRS2 $\beta$ は、乳がん形成を促進する

炎症性サイトカインリッチ環境を形成する

金沢大学がん進展制御研究所

竹内 康人

本邦初の小児急性リンパ性白血病Patient-derived xenograft (PDX)

バイオバンクの樹立

京都大学医学部附属病院 発達小児科学

田中 邦昭

新規粘液線維肉腫細胞株の樹立とそれにより同定した新規治療薬候補

国立がん研究センター研究所

希少がん研究分野

土屋 流人

細胞に圧縮刺激を加える三次元培養系の開発と膵臓がん細胞の遺伝子発現変化

北海道大学大学院 生命科学院

細胞ダイナミクス科学研究室

二瓶 達也

発生部位の異なる骨肉腫に由来する細胞株における 抗がん剤および治療標的の同定

国立がん研究センター研究所

希少がん研究分野

野口 玲

Establishment and characterization of cholangiocarcinoma patient-derived xenograft

Division of Hematopoiesis

Joint Research Center for Human Retrovirus infection

Kumamoto University

Piyanard Boonnate

新規ホルモン治療薬耐性前立腺癌患者腫瘍組織移植モデル（PDX）の樹立

京都大学大学院医学研究科・医学部 泌尿器科

松岡 崇志

シングルセル解析からみえてきた膵がん腫瘍内不均一性と

新規がん幹細胞の同定および機能解析

熊本大学 大学院生命科学研究部

病態生化学講座

山崎 昌哉

患者由来「肉腫」モデルの構築

国立がん研究センター研究所

希少がん研究分野

吉松 有紀

## 新規の多形肉腫株(NCC-PS1-C1)の樹立

秋山太郎<sup>1,2</sup>, 吉松有紀<sup>1</sup>, 野口玲<sup>1</sup>, 申育實<sup>1</sup>, 土屋流人<sup>1,2</sup>,  
小野拓也<sup>1</sup>, 菅谷潤<sup>3</sup>, 小松原将<sup>3</sup>, 吉田朗彦<sup>4</sup>, 川井章<sup>3</sup>,  
大鳥精司<sup>2</sup>, 近藤格<sup>1</sup>

<sup>1</sup>国立がん研究センター研究所 希少がん研究分野

<sup>2</sup>千葉大学医学研究院整形外科

<sup>3</sup>国立がん研究センター中央病院 骨軟部腫瘍・リハビリテーション科

<sup>4</sup>国立がん研究センター中央病院 病理診断科

【背景】軟部肉腫は間葉系組織から発生する悪性腫瘍であり、その分化方向や分子学的背景から70以上のサブタイプに分類される。はっきりした組織学的分化傾向や特有の分子学的背景を有しない軟部肉腫を多形肉腫と呼んでいる。多形肉腫は全軟部肉腫の約25%を占め比較的頻度が高い。全身化学療法に抵抗を示すため、根治的治療は広範切除術のみである。広範切除困難例に対しては術前放射線療法により腫瘍を縮小した上で広範切除が実施される。しかし約半数が術後遠隔転移を生じるため、多形肉腫に対する全身化学療法の確立が必要である。我々は術前放射線療法後の多形肉腫切除検体から細胞株の樹立に成功し、これを使用して放射線療法併用術後再発多形肉腫に対して効果的な抗がん剤の候補を挙げたので報告する。

【方法】症例は72歳女性で、右膝から下腿にかけての疼痛性腫瘤を主訴に来院した。術前生検で多形肉腫の診断となり、術前放射線療法後に広範切除術が実施された。病理学的には、腫瘍組織は分化方向の明らかでない多形から多角形の細胞で構成されており、一部に粘液様成分が認められた。同手術検体の初代培養から細胞株を樹立した。本樹立株は適切に認証された上で、Single Nucleotide Polymorphism array (SNP array), NCCオンコパネルにより腫瘍の特性を確認した。また、抗がん剤214剤の増殖抑制試験から、効果的と思われた抗がん剤を選択し、詳細な増殖抑制試験を実施した上で、それぞれの50% Inhibitory Concentration (IC50)を決定した。

【結果】SNP array解析で、NCC-PS1-C1は多彩なCopy Number Alteration (CNA)を認めた(欠失: 1p13.3, 1p36.21, 2q33.2, 2q37.3, 4q27, 4p16.2, 6p21.2, 7q21.3, 8p23.2, 9q21.12, 11p15.1, 12q15, 16q23.1, 20p12.1 増幅: 7q21.3)。また、NCCオンコパネルでは p53に変異を認めた。増殖抑制試験では、doxorubicin, gemcitabineのIC50は136  $\mu$  M, 2.5  $\mu$  Mで、bortezomibとromidepsinのIC50がそれぞれ0.92nMと7.9nMであった。

【考察】術前放射線療法後の多形肉腫切除検体から、新規の多形肉腫株の樹立に成功した。分子生物学的な解析では多様なCNAとp53の変異を認めた。また、増殖抑制試験では一般的に軟部肉腫に使用されるdoxorubicinなどの抗がん剤よりも、プロテアソーム阻害薬であるbortezomibやHDAC阻害薬であるromidepsinの方が効果的であった。放射線療法後に再発を来す腫瘍は、放射線療法に抵抗性を有すると考えられる。それゆえに、本細胞株は術前放射線療法併用手術後の再発例に対する化学療法の研究に特に有用であると考えられた。一方で、多形肉腫の複雑な分子生物学的背景や、放射線療法による修飾を考慮すると1細胞株での結果は普遍性に欠けるのが問題である。更なる腫瘍株の樹立とその解析が必要であろう。

## RNA階層における乳がん幹細胞制御機構の解明

内田雄太郎, 栗本遼太, 千葉朋希, 浅原弘嗣

東京医科歯科大学  
大学院医歯学総合研究科  
システム発生再生医学分野

乳がんは日本人女性が最も多く罹患するがんである。中でもトリプルネガティブ乳がん (TNBC) は乳がん全体の約20%を占め、ホルモン療法や分子標的薬といった他の乳がんサブタイプで用いられるホルモン療法や分子標的薬などの明確な治療法がなく、抗がん剤による薬物療法が試みられているものの非常に予後が悪いことで知られる。このような治療抵抗性を説明する上で非常に重要ながん細胞集団が乳がん幹細胞集団である。がん幹細胞研究において Musashi-2やNSAP1など疾患に特異的なRNA結合タンパク質によるRNA階層での発現制御が乳がん幹細胞の幹細胞性維持に関わっていることが既に報告されている (Ito et al, Nature. 2010, Kharas et al, Nat. Med.. 2010)。しかしながら、乳がん幹細胞におけるRNA階層での制御機構については未解明である。

そこで我々はまず、三症例のTNBC患者由来細胞をマウスに皮下移植したサンプルに対して scRNAseq解析を行った。その結果として、既知の乳がん幹細胞集団マーカーを発現する細胞集団 (CD44+, NRP1+, ZEB1+, CD24-) が大きく二つの亜集団に分かれる様子が明らかとなった。この二つの亜集団の腫瘍形成能を比較するため、両亜集団をソーティングしNOGマウスに再移植することで腫瘍形成能を比較したところ、新規分子マーカーによって標識される腫瘍形成能を強く示す新規乳がん幹細胞亜集団の存在が確認された。さらに、このがん幹細胞亜集団において特異的に発現するRNA結合タンパク質をスクリーニングしたところ、機能未知のRNA結合タンパク質であるRBPUの同定に成功し、TNBC患者由来細胞に対してこのRBPUをノックダウンすると腫瘍形成能が大きく減少した。またこのノックダウン細胞に対して scRNAseq解析を行ったところ、RBPUのノックダウンによって新規乳がん幹細胞亜集団が減少することが判明した。このRBPUのRNA階層における分子制御機構を解析するために、ノックダウン細胞に対するRNA-Seq解析、および標的mRNAをTranscriptome wideに同定するCLIP (Crosslinking Immunoprecipitation)解析を行ったところ、RBPUが乳がん幹細胞性を特徴づけるような遺伝子のmRNAの3'非翻訳領域に特異的に結合することでこれらの遺伝子の発現を安定化させることが判明した。現在このRBPUによる発現制御機構を詳細に解明するために解析を継続している。

## 抗がん剤開発における腫瘍移植鶏卵モデルの構築

宇都 義浩

徳島大学大学院社会産業理工学研究部 生物資源産業学域

がんの発育鶏卵モデルは1900年代にはじまり、1980年頃には我が国で先駆的な研究がなされてきたが、マウスの代替動物としての地位は未だ確立されていない。一方、欧米諸国では、マウス実験に対する厳しい規制のために発育鶏卵を用いた研究が活発に行われており、最近では、患者由来のがん組織を移植したPatient-Derived Xenograft (PDX) モデルの論文も報告されている。我々は、1998年から開始した鶏卵漿尿膜 (CAM) 法を用いた血管新生阻害剤の創薬研究を皮切りに、2007年以降は腫瘍移植鶏卵モデルを用いた種々の抗癌剤/制癌剤の創薬研究を行っている。その1つとして、腫瘍移植鶏卵モデルを用いた創薬研究として抗転移剤の創製がある。低酸素微小環境は多くの固形腫瘍に見られる特徴であり、化学療法抵抗性、放射線療法抵抗性、血管新生、脈管形成、転移及び浸潤を引き起こす。また、セリンスレオニンキナーゼのAKTは多くのヒトがん細胞で過剰発現しており、細胞の運動、生存、アポトーシスの抵抗性、転移・浸潤等、がん細胞にとって重要な役割を持っている。そこで、低酸素サイトトキシンTirapazamineにAKT阻害能を付加した抗転移性低酸素サイトトキシンの創製を検討し、Tirapazamine及び既知のAKT1/2 inhibitorをリードとしてTX-2137を設計・合成した。TX-2137は種々の腫瘍細胞に対して強い細胞増殖阻害活性を示し、A549細胞に対して強い低酸素細胞毒性を示した。また、AKT2タンパク質のリン酸化を選択的に阻害し、AKTの下流標的であるMMP9産生を阻害した。さらに、腫瘍移植鶏卵モデルにおいてアドリアマイシンと同程度の抗転移活性を示した。

もう1つの例として、放射線増感剤の創製がある。低酸素腫瘍細胞は放射線抵抗性や再発の要因として長年研究されており、数多くの低酸素細胞放射線増感剤が開発されてきたが成功例はNimorazoleのみである。そこで、がん細胞では好気性・嫌気性に関わらず解糖系代謝が亢進してグルコースを多く消費する“ワールブルグ効果”に注目し、O-グリコシド結合を介してアセチルグルコースを導入したニトロイミダゾール誘導体TX-2244が高い放射線増感活性を示すことを明らかにした。また、放射線増感効果を有する上皮成長因子受容体 (EGFR) 阻害剤のGefitinibにアセチルグルコースを修飾した誘導体UTX-114は、Gefitinibと同等のEGFR自己リン酸化阻害活性、高いグルコース取込み阻害活性と放射線増感活性を有することを明らかにした。さらに、これらの放射線増感剤を評価できる腫瘍移植鶏卵モデルの構築にも成功した。

以上の例より、腫瘍移植鶏卵モデルは抗がん剤の創薬研究においてマウスに代わるin vivo評価系になり得る可能性を有することが示された。

## 大腸がん転移における がん細胞集団の極性転換の役割

小沼邦重, 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

集団としてのがん細胞が転移に寄与することが報告されているが、そのメカニズムは未だ不明な点が多い。我々は独自に開発した大腸がん細胞塊培養物Cancer Tissue-Originated Spheroid (CTOS) を利用して、がん細胞集団の特性解析を行ってきた。大腸がんCTOSは、細胞外マトリクスの存在下では、スフェロイド内にapical面で覆われた管腔を持つ状態 (apical-in) になるが、浮遊培養下では、apical面がスフェロイドの外周を覆う状態 (apical-out) を示し、培養条件を変えると短期間で相互転換する (極性転換)。がん細胞は集団として血管内へ侵入した場合にapical-inからapical-outへ極性状態を転換させると予想されるが、実際に患者大腸がんでもそのような病理像が観察される。本研究では、apical-outの極性状態が転移過程に及ぼす影響を検討した。正常腸管上皮はapical面から活性酸素を放出し、感染防御に寄与していることが知られている。CTOS (C45)の培養液中では、apical-outの活性酸素量がapical-inと比較して有意に高かった。Micropapillary carcinomaは細胞外マトリクスの存在下にも関わらずapical-outの極性状態を維持する病態であるが、腫瘍内のmicropapillary病変部周囲の間質では、脂質過酸化のマーカである4-hydroxynonenalが強く発現していた。次に、肝転移における重要な段階である、がん細胞の肝血管内皮細胞への接着能を比較した。蛍光標識したヒト肝血管内皮細胞を単層培養し、蛍光標識したC45を重層した。播種3時間後に非接着細胞を除去し、蛍光を定量することで接着率を算出した結果、apical-inと比較してapical-outのC45は接着率が有意に増加した。また、接着後に、がん細胞が血管内皮を置換して広がる現象 (クリアランス) を定量したところ、apical-inと比較してapical-outのC45はクリアランス率が増加した。抗酸化物質のNACで処理した場合、さらにshRNAにより活性酸素種産生酵素の一つであるNOX1の発現量を減少させた場合、これらの現象は抑制された。以上の結果からapical-outの極性状態では、apical面の外側に放出された活性酸素が血管内皮に作用し、血管内から血管外への浸潤を促進することが示唆された。

## Li-Fraumeni症候群患者からの 世界初の肉腫細胞株の樹立

小野拓也<sup>1,2</sup>, 吉松有紀<sup>1</sup>, 野口玲<sup>1</sup>, 申育實<sup>1</sup>, 土屋流人<sup>1</sup>,  
秋山太郎<sup>1</sup>, 菅谷潤<sup>3</sup>, 福島俊<sup>3</sup>, 吉田朗彦<sup>4</sup>, 川井章<sup>3</sup>, 近藤格<sup>1</sup>

<sup>1</sup>国立がん研究センター研究所 希少がん研究分野

<sup>2</sup>長崎大学大学院 医歯薬学総合研究科

<sup>3</sup>国立がん研究センター中央病院 骨軟部腫瘍・リハビリテーション科

<sup>4</sup>国立がん研究センター中央病院 病理診断科

Li-Fraumeni症候群 (LFS) は、TP53の生殖細胞変異によって引き起こされるがん素因症候群である。LFSの有病者は生涯でがんを発症するリスクが高く、そのリスクは30歳までに50%、60歳までに90%以上と報告されている。副腎皮質癌、乳癌、脳腫瘍、骨肉腫および軟部肉腫の5種類のがんがLFS関連がん全体の約80%を占めている。軟部肉腫の一つである未分化多形肉腫 (UPS) は、LFSに関連するがんの一つである。WHO分類において、UPSは未分化軟部肉腫のサブタイプであり、識別可能な分化傾向を示さないがんとして定義されている。UPSの標準的な根治治療として外科的な完全切除が実施されるが、切除後に局所再発や肺への遠隔転移が見られることが多い。そのため、UPS症例に対する新たな治療戦略が求められている。加えてLFS患者において、TP53生殖細胞変異はがんの素因であるだけでなく、化学療法および放射線療法への抵抗性にも関連している可能性が報告されている。患者由来がん細胞株は治療法を開発するための有用なツールである。公的バイオバンクから入手可能なUPS細胞株は4株あるが、LFS患者から樹立されたUPS細胞株は存在せず、そもそもLFS患者から肉腫細胞株が樹立された報告は過去にない。そこで、本研究ではLFS患者からUPS細胞株を樹立することを目的として実験を行った。

LFSの32歳女性から外科的に切除されたUPSの組織を用いて細胞株を樹立し、NCC-UPS4-C1と命名した。NCC-UPS4-C1には、single-nucleotide polymorphismアレイによりコピー数の異常およびNCCオンコパネル検査によりTP53癌抑制遺伝子の変異がみられた。NCC-UPS4-C1を用いて214種類の抗がん剤をスクリーニングしたところ、高い増殖抑制効果を有する2つの薬剤が同定された。これら2剤は、UPSに関する過去76件の臨床試験で調査されていない。また、当研究室でこれまでに樹立されたUPS細胞株、NCC-UPS1-C1、NCC-UPS2-C1、NCC-UPS3-C1には奏功せず、NCC-UPS4-C1にのみ奏効した薬剤が1剤同定された。

LFSの有病率は5,000～20,000人に1人、軟部肉腫の発症率は年間10万人あたり1.8～5.0人であることを考慮すると、LFS患者からの肉腫細胞株の樹立は今後も困難を極めることが考えられる。LFS患者から樹立された世界初の肉腫細胞株であるNCC-UPS4-C1を今後世界中の研究者の要望に応じて共有していく。



## 口腔紡錘細胞扁平上皮癌由来細胞株の樹立

川口翔,川原健太,吉田遼司,廣末晃之,中山秀樹

熊本大学大学院生命科学研究部歯科口腔外科学講座

【緒言】紡錘細胞扁平上皮癌は、紡錘形細胞を主とする肉腫様の組織と通常型の扁平上皮癌を伴って増殖する高悪性度癌であり、扁平上皮癌の亜型の1つとして分類されている。咽頭、喉頭に好発し、歯肉での発生は比較的稀である。通常型の扁平上皮癌と発症危険因子の喫煙・飲酒は同じであるが、放射線治療後に生じることも多く、肉眼的には偽膜に覆われた潰瘍を伴うポリープ状病変としてみられることが多い。今回われわれは上顎歯肉に生じた紡錘細胞扁平上皮癌に対して、初回治療後の後発頸部リンパ節転移をきたしたリンパ節から初代培養を行い、細胞株を樹立したので報告する。

【材料（対象）と方法】患者は84歳の女性。右側上顎歯肉紡錘細胞扁平上皮癌の診断のもと、201X年8月に全身麻酔下で右側上顎部分切除術を施行した。術後約8か月後に後発頸部リンパ節転移を認めたため、根治的頸部郭清術変法を施行した。手術同日に転移リンパ節から組織の一部を採取し、初代培養を開始した。約1年間50継代以上培養を継続し、樹立した細胞株において増殖能および浸潤能を測定した。さらに上皮間葉移行（epithelial mesenchymal transition: EMT）との関連も検討した。

【結果】初代培養細胞は紡錘形状を呈して増殖し、既存の口腔扁平上皮癌細胞株と比較して強い浸潤傾向を示した。またE-cadherinの発現低下とvimentinの発現上昇が認められ、紡錘細胞扁平上皮癌とEMTとの関与が示唆された。【結論】口腔紡錘細胞扁平上皮癌由来の細胞株樹立に成功した。本細胞株を用いることで、口腔癌の浸潤能や転移能の解明の一助となる可能性が示唆された。

## Establishment of patient-derived xenograft (PDX) and cell line of soft tissue sarcoma.

Gunya Sittithumcharee<sup>1,2</sup>, Sawako Fujikawa<sup>2</sup>,  
Ryusho Kariya<sup>1,2</sup>, Seiji Okada<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Division of Hematopoiesis, Joint Research Center for Human Retrovirus Infection,  
Kumamoto University  
<sup>2</sup>Quool Co.,Ltd

Soft tissue sarcoma (STS) is a type of malignant tumors arise from the mesenchymal tissue such as connective, adipose and vascular tissues. The characteristics of STS are highly diverse and heterogeneous with more than 80 histological subtypes depending on the origin of the tumor, while clinical behavior of STS also depends on the stage and mutation of each tumor from an individual patient. Despite of the heterogeneity of STS, the standard therapy still remained as classical chemotherapy which has serious side effects. In order to overcome the limitations in the heterogeneous of STS tumor, we tried to established STS patient-derived xenograft (PDX). We received patients' STS tissues from Department of Orthopaedic Surgery, Kumamoto University and xenograft into highly immunocompromised Balb/C *Rag-2* null/*Jak3* null (BRJ) mice. Since, the patient-derived xenograft (PDX) conserve morphological structure and microenvironment comparable to tumor from patient, the established PDX may be used for drug screening to find the candidate of effective drugs or used as a model to develop the therapy regimen. We also established PDX-derived STS cell lines from the STS PDX tissues and STS cell lines from patient's tissue. The cell lines characteristics and morphology were evaluate. STS has the limited numbers of available cell line collection of specific STS subtypes, our STS cell lines may serve as a model for primary screening prior the *in vivo* drug evaluation using PDX.

### 【Reference】

- 1 . Cancer Control. Jan-Feb 2005;12(1):5-21. Doi: 10.1177/107327480501200102.
- 2 . Pathol Int. 2017 Sep;67(9):435-446. doi: 10.1111/pin.12565. Epub 2017 Jul 31.
- 3 . Cells. 2019 Aug 13;8(8):889. doi: 10.3390/cells8080889.

## マウスに苦痛を与えない生体組織移植針キットの開発

城戸 響

九州オルガン針株式会社

薬の開発において、患者を対象とした臨床試験を行う前に、マウスなどのモデル動物を用いた非臨床試験が必要不可欠である。これまで、がん細胞株をマウスに移植したCDX (Cell line Derived Xenograft) モデルが抗がん剤の薬効試験に用いられてきたが、臨床再現性が低く、抗がん剤の開発成功率が低い原因となっていた。近年、がん患者の腫瘍組織を直接、免疫不全マウスに移植した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。

動物モデルの樹立は、簡便且つ可能な限り動物に苦痛を与えない方法を用いることが望ましい。一般的にPDXモデルマウスの樹立は、麻酔下のマウスの皮膚を解剖用はさみで切開し、ピンセットにてヒト腫瘍組織塊を皮下に移植した後、縫合またはクリップにて切開部位を接着する方法が用いられている。しかしながらこの方法では、吸入麻酔器などの特別な装置を必要とすることに加え、皮膚を切開するため、マウスに大きな苦痛を与えてしまう。そこで我々は、PDX腫瘍組織移植に適した腫瘍移植針デバイスの開発を行った。この移植針の側面には腫瘍組織塊を挿入する穴が設けられている。この側面の穴から腫瘍組織塊を充填したのち、移植針を皮下に挿入、ピストンで移植針内に充填された腫瘍塊をマウス皮下に押し出すことで皮下移植を行う。この移植針を用いた場合、マウスの皮膚には非常に小さな穴しか開かないため、マウスに対する侵襲性が極めて低く、動物愛護の観点からも非常に優れた移植デバイスである。我々はこの移植針と、PDX樹立に適した高度免疫不全マウスBALB/c Rag-2/Jak3 KO (BRJ) マウスを用いて口腔がん、胆管がんなどの様々なPDXモデルマウスの樹立を進めている。本講演会では、開発した腫瘍移植針デバイスの特徴及び使用法を紹介する。

## STAT1 活性化細胞により誘引される皮膚扁平上皮がんの集団浸潤

熊谷祐二<sup>1</sup>, 小林純子<sup>2</sup>, 石原誠一郎<sup>3</sup>,  
榎本篤<sup>4</sup>, 芳賀永<sup>3</sup>

1. 北海道大学 大学院生命科学院, 2. 北海道大学 大学院医学研究院 組織細胞学教室  
3. 北海道大学 大学院先端生命科学研究院, 4. 名古屋大学 大学院医学研究科 腫瘍病理学

がんが全身に広がること（転移）はがん患者の予後を悪化させる。転移する過程で、がん細胞が原発巣から周囲の正常組織へと広がることを浸潤という。がん細胞は多様な浸潤様式を有しているが、近年ではその一つである集団浸潤が注目されている。集団浸潤とは、がん細胞が細胞塊として浸潤する現象であり、他の浸潤様式と比較して転移巣を形成する能力が高いことが報告されている。さらに、集団浸潤はがん患者の予後不良と相関することも示されていることから、集団浸潤を阻害することでがん患者の予後を改善できる可能性がある。集団浸潤するがん細胞塊は不均一な細胞集団であるため、集団浸潤を効率的に阻害するためには、不均一な細胞集団の中から治療標的として適切な細胞を選択する必要がある。しかしながら、そのような細胞は明らかになっていない。これらのことから本研究では、がん細胞集団の中から、集団浸潤を誘引する細胞を特定し、その分子機構を明らかにすることを目的とした。この目的を達成するために、がん細胞集団に対するサブクロニングが有効だと考え、集団浸潤能を有するがん細胞株（ヒト皮膚扁平上皮がんA431細胞）から20種類のサブクローンを樹立した。これらのサブクローンの浸潤能をそれぞれ調べたところ、集団浸潤能の高い（高浸潤）サブクローン及びほとんど浸潤しない（低浸潤）サブクローンが存在した。次に、これらのサブクローンに対してトランスクリプトーム解析を行ったところ、高浸潤サブクローンにおいて転写因子STAT1が活性化していることが分かった。さらにsiRNAによるSTAT1の発現抑制は高浸潤サブクローンの集団浸潤を有意に抑制した。続いて、不均一な細胞集団におけるSTAT1活性化細胞の役割について調べるために、高浸潤サブクローン（STAT1高活性）と低浸潤サブクローン（STAT1低活性）を共培養し、浸潤アッセイを行った。その結果、高浸潤サブクローンが集団浸潤の浸潤先端に存在し、それに追従して低浸潤サブクローンも集団浸潤を起こしていた。この結果はSTAT1活性化細胞が、がん細胞集団を牽引することで集団浸潤を引き起こすことを示唆している。さらに、ヒト皮膚扁平上皮がんの組織解析においても、STAT1は集団浸潤するがん細胞集団の浸潤先端において高発現していた。以上のことから、本研究ではSTAT1活性化細胞が浸潤先端に位置しがん細胞集団を牽引することで、集団浸潤を誘引することを明らかにした。本研究の成果は、集団浸潤を阻害するための治療標的分子としてSTAT1が有用である可能性を示唆している。

## 患者由来癌Organoidとゲノム解析を用いた 膵胆道癌の個別化医療システムの開発

椎原正尋, 古川徹

東北大学大学院医学系研究科 病態病理学分野

背景：膵胆道癌は高悪性・難治性で治療選択肢が少なく予後不良である。予後改善の方策として個別化医療があげられる。Organoid 培養とは組織の構築・特徴を保つ in vitro 三次元培養法で生体内に近い状態を維持するとされている。膵胆道癌について organoid 培養とゲノム解析を用いた個別化医療システムを開発した。

方法：膵胆道癌手術切除検体から organoid 培養を既存のプロトコルを改変して行なった。並行して切除腫瘍組織の whole exome 解析を行い、変異プロファイルを明らかにして、organoid がゲノム変異を維持し、病理学的性質が一致することを確認した。変異プロファイルから治療標的分子候補を抽出し、候補分子標的薬の効果を organoid 培養細胞で確認した。

結果：Organoid 培養を膵胆道腫瘍 76 例で行い 29 例(52. 6%)で organoid を得た（膵癌:13/27, IPMN:6/19, 胆道癌:13/21, 胆嚢癌:7/7, 乳頭部癌:2/2）。培養 organoid は balloon-like organoids と solid organoids の 2 種類を呈した。Balloon-like organoids には腫瘍特異的遺伝子変異が検出されず、cancer organoid でないことが示唆された。Solid organoids は分子病理学的特徴が手術腫瘍検体とよく一致し、cancer organoid と確認された。Whole exome 解析から in silico analysis で driver mutations を検出し、そこから治療標的候補を抽出した。胆嚢癌例で *ILK*: integrin linked kinase に着目しその阻害剤を用いて organoid で増殖アッセイを行い、増殖抑制効果を確認し、同分子の主要基質であるリン酸化 AKT の発現減少を確認した。

結論：外科切除腫瘍検体を用いた organoid と whole exome 解析から個別に分子治療候補を拾い上げその効果を実際の腫瘍検体由来の organoid で確認することで膵胆道癌の究極の個別化医療システムを開発した。改良を加えて迅速化・汎用化し臨床応用を実現する。

## 肉腫（サルコーマ）の会たんぽぽの活動と希少がんを取り巻く状況の変化について

志村敬彬，押田輝美

肉腫（サルコーマ）の会たんぽぽ

肉腫患者にとっての主な課題は、希少疾患であるが故の孤立、正しい医療情報が少なくそれらへのアクセスが困難であること、社会的理解、支援体制の不足が挙げられる。弊会は2015に肉腫の患者、家族を対象とした患者会として立ち上げられ、上記の課題に鑑み、患者、家族同士の交流の場としてのお茶会の開催、正しい医療情報を学ぶ場として専門医を招いての勉強会、社会的理解を促進するため各種関連イベントへの参加を行ってきた。

上記で述べた肉腫患者に関する課題は、その他の希少がんにも共通するものである。希少がんは、個々の患者数が全体に占める割合は少ないが、希少がん全体としては全がん患者の約2割を占める。近年、希少がんをめぐる状況は大きく変化をしようとしている。2018年、第3期がん対策推進基本計画において、難治性がん・希少がんの研究促進が明記された。また、数か所の専門病院に希少がんセンターが開設されるようになり、患者への情報提供や希少がんに焦点をあてたセミナーの開催により、以前よりも正しい医療情報へのアクセスが容易になった。

このような情勢の変化に伴い、患者会としての活動内容も変化しつつある。これまで個別に活動を行ってきた各希少がんの患者会、団体が、お互いに連携して様々な活動に取り組む組織として、日本希少がん患者会ネットワーク（RCJ）が2017年に発足した。また、特にこの数年で大きな変化を見せているのが、患者の医療参画（PPI）である。これまで、患者は医療者から治療を提供される立場であったが、今後の医療に関する意思決定を、医療者と患者が同時に関わって取り組んでいくことが重要であると認識されるようになった。具体的には、治療ガイドライン、研究計画書、臨床試験の同意文書などの策定時の参加である。

このように、希少がんをめぐる学術的、社会的情勢は変革の時を迎えている。しかしながら、希少がん患者にとっての支援体制はまだ不十分であり、引き続き患者を取り巻く環境の改善に向けた努力が求められる。さらに、効果的な治療法の開発は残された大きな課題であり、医療者と患者、患者会との連携も、これまで以上に重要になると考えられる。

## Application of Patient-Derived Xenograft Model for Determination of Trastuzumab (a classic anti-HER2 monoclonal antibody) Immunotherapy towards Cholangiocarcinoma (CCA)

Jutatip Panaampon, Ryusho Kariya, Seiji Okada

Division of Hematopoiesis,  
Joint Research Center for Human Retrovirus Infection,  
Kumamoto University, Kumamoto, Japan

Cholangiocarcinoma (CCA) is a cancer that forms in the bile ducts, and most of CCAs are multifocal and cannot be completely removed by surgery and are incurable. The standard first line therapy for advanced CCA is a combination of gemcitabine and cisplatin. However, an immunotherapy has started to play role for the treatment in clinical trials. Trastuzumab (TRAS) is a humanized IgG1 kappa monoclonal antibody, targets the extracellular domain of human epidermal growth factor receptor 2 (HER2). It is FDA approved antibody for the treatment of HER2<sup>+</sup> breast cancer. In this study, we established PDX-derived CCA cell line and CCA PDX model, which are original from the same patient. We examined HER2 expression on CCA cells and found that CCA cells express HER2. We evaluated TRAS efficacy by assessment of antibody dependent cytotoxicity (ADCC) and antibody dependent cell phagocytosis (ADCP) by using expanded NK cells/monocyte-derived macrophages from a healthy donor and mouse macrophages. Finally, we determined the efficacy of TRAS *in vivo*. To verify TRAS efficacy, we confirmed experiments in PDX model. TRAS induces CCA cell death by ADCC, ADCP and demonstrated *in vivo* inhibitory effect. TRAS can be a promising antibody immunotherapy for the treatment of CCA.

胆管細胞癌PDXの抗HER2抗体を用いた免疫療法への活用

Jutatip Panaampon、刈谷龍昇、岡田誠治

熊本大学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

胆管細胞癌（CCA）は胆管由来の予後不良の悪性腫瘍であり、外科的療法以外に治癒は望めないが多くのCCAは多発性であり完全治癒は困難である。Gemcitabineとcisplatinによる化学療法行われているが治療効果は不良である。本研究では、CCAがHER2を発現していることを見出し、抗HER2抗体（Trastuzumab）の有効性を同一患者から樹立した細胞株及びPDXを用いて検討した。健康成人末梢血単核球から誘導したNK細胞及びマクロファージを用いてCCAに対するTrastuzumabのADCC及びADCPを確認した。CCA PDXにTrastuzumabを投与したところ有意に腫瘍増殖を抑制した。これらの結果から抗HER2抗体が胆管細胞癌への有効性及び同一患者由来の細胞株とPDXが前臨床試験における効果判定に有用であることが示唆された。

## 悪性末梢神経鞘腫瘍の患者由来細胞株

### NCC-MPNST6-C1の樹立

申育實<sup>1</sup>,野口玲<sup>1</sup>,吉松有紀<sup>1</sup>,土屋流人<sup>1</sup>,  
秋山太郎<sup>1</sup>,小野拓也<sup>1</sup>,吉田朗彦<sup>2</sup>,川井章<sup>3</sup>,近藤格<sup>1</sup>

<sup>1</sup>国立がん研究センター研究所 希少がん研究分野

<sup>2</sup>国立がん研究センター中央病院 病理診断科

<sup>3</sup>国立がん研究センター中央病院 骨軟部腫瘍・リハビリテーション科

悪性末梢神経鞘腫瘍 (malignant peripheral nerve sheath tumor; MPNST) は末梢神経から発生する稀な肉腫であり、組織学的には紡錘型細胞を特徴とする。神経線維腫症 (neurofibromatosis; NF1) に合併するものと散発性のものがあり、割合は各々約50%である。放射線治療後の発生も約10%で報告されている。発生パターンが多岐に渡るが故に以前は診断が困難であったが、近年ヒストンのメチル化異常検出の有用性が見出された。High-gradeのMPNSTの約80%でPRC2活性の完全欠損やH3K27me3の欠損が見られ、正常なH3K27me3の免疫組織染色像であることが多い紡錘型細胞の中で、MPNSTの特異的な診断マーカーとなっている。MPNSTにおいて有効性が確認された抗がん剤は存在せず手術が唯一の根治的治療法であるが、予後は極めて不良である。

MPNSTに限らず、前臨床試験で有効性が確認された薬剤が臨床試験では十分な薬効を発揮しないことは多い。その原因として、長期に渡り継代を重ねる/人為的に遺伝子操作をする等した培養細胞が患者の生体内環境を再現できていないことが挙げられる。生体内環境を再現する為に、腫瘍組織から樹立されたpatient-derived cell (PDC) が使用されている。しかし希少がんではそれらの入手は困難であり、抗がん剤開発の障壁になっている。例えば公的な細胞バンクから入手可能なMPNST細胞株は9種類である。MPNSTの多様な発生パターンを考慮すると、充分であるとは言い難い。我々は希少がん患者の腫瘍組織からPDCの樹立を行い、希少がんに適応拡大可能な抗がん剤探索に応用している。これらの細胞株は樹立直後で継代回数が少なく人為的な遺伝子操作がないことが特徴であり、生体内環境により近いことが期待される。今回、MPNSTのPDC樹立に成功したことを報告する。

本研究では外科的に切除した腫瘍組織を用いて細胞株を樹立し、NCC-MPNST6-C1と命名した。ドナー患者はNF-1の既往歴がない72歳の男性で、腫瘍は右大腿部に位置していた。腫瘍組織およびNCC-MPNST6-C1細胞の両方で、H3K27me3の欠損が確認できた。樹立したNCC-MPNST6-C1細胞の由来を確認するためにキャピラリー電気泳動法によるSTR解析を行い、元腫瘍との同一性を証明した。その後、一塩基多型 (SNP) アレイによるジェノタイプピングを行い、DNAコピー数を網羅的に調べた。その結果、がん抑制遺伝子であるCDKN2AやCDKN2Bを含む広範囲なコピー数の異常が見出された。NCC-MPNST6-C1細胞は35継代以上増殖し、スフェロイド形成能や浸潤能を有した。さらに、214種類の抗がん剤のスクリーニングを行い、NCC-MPNST6-C1細胞に対して増殖抑制効果を持つ抗がん剤を複数特定した。今後、これらの薬剤のin vivoでの有効性を検証する必要がある。またNCC-MPNST6-C1細胞と生体内環境の類似性を調べるとともに、より多様なMPNST患者由来細胞株を樹立することがMPNSTの薬剤開発に繋がると期待される。



## ヒト腸管オルガノイドのフォルスコリン誘発性膨潤アッセイの自動化

田口 亜紀子

コーニングインターナショナル株式会社

この数年において、患者由来のオルガノイドを用いた個別化医療や創薬への関心が高まっています。その理由は、臓器の構造を再現して疾患をモデル化し、ドナー組織の遺伝的多様性を維持することができるオルガノイドがその有望なツールとなっているからです。オルガノイドの潜在能力を最大限に引き出すためには、より自動化されたハイスループットな手法に対応する必要がありますが、オルガノイドの取り扱いを自動化するには粘性のある基底膜抽出液を操作する必要があります、これまではその点が課題となっていました。

本報では、SPT Labtech社のdragonfly® discoveryを使用して、オルガノイド培養用のCorning® Matrigel®マトリックスと混合したヒト腸管オルガノイドの小滴（3 $\mu$ L）を分注し、その後、フォルスコリン誘発性膨潤（FIS）アッセイを行った例を紹介します。使用したヒト腸管オルガノイド（HIO）には、健常ドナーとF508del/S1251N変異を持つ嚢胞性線維症（CF）のドナーから採取した組織を用いました。FIS アッセイは、嚢胞性線維症の膜貫通型調節因子（CFTR）をコードする変異の有無やその機能不全を改善するための潜在的な治療法を見つけるための機能的なオルガノイドアッセイとして選択しました。また、FISアッセイのようなオルガノイドアッセイを自動化するためには、リキッドハンドラーが96ウェルマイクロプレートにオルガノイドを正確に分注できることが重要となりますが、各ウェルの一定位置に同じサイズの液滴を分注でき、安定したアッセイが行えました。

## 細胞質アダプタータンパクFRS2 $\beta$ は乳がん形成を促進する炎症性サイトカインリッチ環境を形成する

竹内 康人

金沢大学 がん進展制御研究所 分子病態研究分野

乳がんの発症において、炎症性変化の関与が示唆されているが、その分子メカニズムは未だに不明である。本研究では、一部の乳腺上皮細胞で発現する細胞質アダプタータンパクFRS2 $\beta$ が、前がん状態の乳腺組織において、間質細胞を介して炎症性変化を誘導し、乳がんの発症に関与していることを明らかにした。乳がん自然発症マウスモデル（MMTV-ErbB2）で、FRS2 $\beta$ をノックアウトすると、腫瘍形成が著しく低下した。重要な点は、MMTV-ErbB2マウス由来の乳がん細胞を、FRS2 $\beta$ ノックアウトマウスの乳腺組織に移植したところ、腫瘍が著しく抑制された。このことから、乳癌形成において、FRS2 $\beta$ を発現する乳腺組織が必要であることが示唆された。

また、FRS2 $\beta$ とIKK複合体サブユニットであるNEMOが初期エンドソームに局在すると、NF $\kappa$ Bが活性化されることを見出した。さらに、NF $\kappa$ Bの活性化によって誘導されるCXCL12とIGF1は、慢性的な炎症性変化を誘導することを明らかにした。すなわち、CXCL12は、主要な間質細胞であるがん関連線維芽細胞（CAF: Cancer-associated fibroblast）を誘導し、IGF1は、がん幹細胞様細胞（CSC: Cancer stem-like cell）の幹細胞性の維持に重要な役割を果たしていることが分かった。さらに、FRS2 $\beta$ の発現量が高いヒト乳がん組織では、間質組織も豊富であった。以上より、FRS2 $\beta$ を介したNF $\kappa$ Bの活性化は、線維芽細胞を含む周囲組織に炎症性変化を引き起こし、乳がん発症の基盤形成に重要であることが示唆された。

現在、乳がん患者由来細胞のみを用いて、生体内でがんが形成される過程を再現する混合培養オルガノイド培養系の構築を進めている。予備実験として、乳がん患者由来のがん細胞の単独培養オルガノイドと、乳がん患者由来のがん細胞と線維芽細胞の混合培養オルガノイドとの比較を行った。単独培養オルガノイドでは、オルガノイド外部へと浸潤するがん細胞は観察されなかった。一方、混合培養オルガノイドでは、オルガノイドから外部へと向かって浸潤するビメンチン陽性のがん細胞が観察された。このことから、患者由来がん細胞は、患者由来CAFとの相互作用によって、上皮間葉転換（EMT: Epithelial-mesenchymal transition）を起こし、周囲組織へと浸潤することが示唆されました。今後、患者由来細胞のみを用いたオルガノイド培養系を用いて、がんの浸潤転移に対する新たな治療標的の創出を目指したいと考えている。

## 本邦初の小児急性リンパ性白血病Patient-derived xenograft (PDX)バイオバンクの樹立

田中邦昭<sup>1</sup>,加藤格<sup>1</sup>,土橋悠<sup>2</sup>

今井順一<sup>2</sup>,三上貴史<sup>1</sup>,伊藤守<sup>3</sup>

中畑龍俊<sup>4</sup>,滝田順子<sup>1</sup>,小川千登世<sup>5</sup>

足立壯一<sup>6</sup>,渡辺慎哉<sup>2</sup>,後藤裕明<sup>7</sup>

<sup>3</sup>公益財団法人実験動物中央研究所,<sup>4</sup>京都大学iPS細胞研究所 基盤技術開発部門,

<sup>5</sup>国立がん研究センター中央病院 小児腫瘍科,<sup>6</sup>京都大学大学院医学研究科 人間健康科学,

<sup>7</sup>神奈川県立こども医療センター 血液・腫瘍科

希少がんの研究において、患者サンプルの希少性は病態解明や新規治療開発における大きな障壁である。小児急性リンパ性白血病（小児ALL）は300~400人/年の頻度で発症する希少疾患で、治療の進歩により治療成績は向上しているが、10%程度は再発難治であり未だその予後は不良である。近年、患者由来サンプルから樹立したpatient-derived xenograft (PDX)モデルががん研究に頻用されている。小児がんサンプルを用いたいくつかの大規模PDXバイオバンクが海外では樹立されているが、その中でも再発小児ALL PDXモデルは少数であり、加えて、種々の規制から日本国内で海外のPDXバイオバンクの検体へのアクセスは困難である。こうした背景から、我々は日本小児がん研究グループ（JCCG）再発ALL委員会主導の臨床研究において収集された再発小児ALLの臨床検体を中心とした日本初の小児ALL PDXバイオバンクを樹立した。我々のPDXバイオバンクは、福島県立医科大学と京都大学において免疫不全マウスであるNOGマウスを用いて、56検体のPDXモデルを樹立し、PDXマウスの骨髄、及び、脾臓から回収された細胞をALL-PDX細胞として保存しバイオバンクを構築した。ALL-PDX細胞が小児ALL研究に有用なresourceであることを裏付けるため、PDXマウスの病理像が髄外病変を含めて、ヒトでのALLの臓器浸潤像を再現していることを示し、また、DNA-microarrayを用いてALL-PDX細胞が由来するprimary細胞と相同性を持つことを確認した。同時に、RNA-seqを以てALL-PDX細胞が由来するprimary細胞の有するcytogenic abnormalityに応じてclusteringされ、ALL-PDX細胞はprimary細胞の遺伝子発現パターンを反映していた。神奈川こども医療センターにてALL-PDX細胞を用いてin vitroで分子標的薬を含めた80種の薬剤感受性プロファイルを作成した。

今回、再発難治性小児ALLに対する病態解析、及び、新規薬剤開発のplatformとなることを目標として、我々が樹立した国内初のALL-PDXバイオバンクについて紹介する。

## 新規粘液線維肉腫細胞株の樹立とそれにより同定した新規治療薬候補

土屋 流人

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】粘液線維肉腫は複雑な核型をもつ高悪性度肉腫である。粘液線維肉腫は強い浸潤能を持つことが知られており、そのために外科的切除を行っても不完全切除に終わってしまうことが多く、およそ30-40%の症例で局所再発すると報告されている。しかし粘液線維肉腫における従来の化学療法の効果は限定的であり、新規治療法開発が望まれる。

患者由来細胞株は前臨床研究を行うのに必須のツールである。近年、common cancerにおいては大量の細胞株と薬剤を用いてのスクリーニング試験が行われるようになってきており、新規治療薬同定に繋がっている。しかし粘液線維肉腫は過去にわずか12細胞株しか報告されておらず、薬剤スクリーニングを行うのに十分な数の細胞株を入手することは極めて困難である。そこで我々は手術検体を用いて新規粘液線維肉腫細胞株の樹立を試み、樹立に成功した細胞株を用いて薬剤スクリーニング試験を行った。

【方法】2014年4月～2021年6月までの期間に、国立がん研究センター中央病院にて手術を行い、研究の同意を得られた粘液線維肉腫症例合計58症例を対象とし初代培養を行った。コピーナンバー数変異を有し、20継代以上安定して増殖する株を新規細胞株とした。樹立した細胞株に対し、214剤を用いた薬剤スクリーニング試験を行い、新規治療薬候補を同定した。

【結果】初代培養の結果、合計5株の新規粘液肉腫細胞株の樹立に成功した。樹立細胞株は粘液線維肉腫に多いとされているCDKN2A, CDKN2Bの欠損を認め、遺伝学的に典型的な性質を有していた。薬剤スクリーニング試験においてはトポイソメラーゼ阻害薬、ALK阻害薬、HDAC阻害薬、プロテアソーム阻害薬が著明な抗腫瘍効果を示した。その中でも特にプロテアソーム阻害薬BortezomibとHDAC阻害薬Romidepsinは、粘液線維肉腫の標準治療薬であるDoxorubicinより低いIC50値を示した。

【考察】新規粘液線維肉腫細胞株の樹立に成功し、粘液線維肉腫としては過去最大規模の薬剤スクリーニング試験を行った。その結果、プロテアソーム阻害薬BortezomibとHDAC阻害薬Romidepsinが有望な新規治療薬候補として同定された。一方でこれら薬剤が奏功する分子背景はまだ十分に解明されていないため、今後機能解析を行うとともに、最終的には臨床へと応用されることを期待する。

## 細胞に圧縮刺激を加える三次元培養系の開発と 膵臓がん細胞の遺伝子発現変化

二瓶 達也<sup>1</sup>、石原 誠一郎<sup>2</sup>、榎本 篤<sup>3</sup>、芳賀 永<sup>2</sup>

<sup>1</sup>北海道大学 大学院生命科学院,<sup>2</sup>北海道大学 大学院先端生命科学研究院,

<sup>3</sup>名古屋大学大学院医学系研究科 腫瘍病理学

近年、様々な生命現象や病態の進行に「硬さ」や「力」といった物理的な刺激が関与していることが明らかにされつつある。細胞が物理的な刺激を感じ、応答する仕組みを調べる学問は「メカノバイオロジー」と呼ばれ、近年盛んに研究が行われている。我々はこの「メカノバイオロジー」の観点からがんを理解し、新たな視点から難治性がんに対する治療法を提案することを目的に研究を行っている。腫瘍の内外で発生する様々な物理的な「力」が、がんの進行に寄与することは示唆されているが、そのメカニズムに関しては未だ不明な点が多い。その原因としては、細胞に物理刺激を加えるin vitro実験系の欠如やin vivo環境との解離、特定のがん種に対して適切な物理刺激を選択できていないことなどが挙げられる。本研究においては、がんの進行に関わる物理刺激として「圧縮刺激」に、また圧縮刺激が関与するがんとして「膵臓がん」に着目し、物理刺激を受けた細胞の遺伝子発現変化の観点から実験を行っている。

膵臓腫瘍では、腫瘍微小環境においてコラーゲン繊維等の細胞外基質成分が蓄積し、またその限られた狭い環境下でがん細胞が無秩序に増殖することで、圧縮刺激が生じることが知られている。その一方、圧縮刺激が膵臓がん細胞に与える影響についての知見は少ない。そこで我々は、三次元環境下でがん細胞に圧縮刺激を加えることが可能な実験系を開発した。本実験系では、生体材料であるコラーゲンで作られたゲルの中で細胞を三次元的に培養し、これに重りを乗せることで細胞に圧縮刺激を加える。本系は簡便かつ、ライブイメージングや細胞の回収を容易に行うことが可能である。我々は本実験系を用いて、圧縮刺激を受けた膵臓がん細胞ではアクアポリンを介した水の排出による細胞体積の減少と細胞質pHの低下が生じ、それに伴い細胞内遊離亜鉛イオン濃度が上昇することを発見した。さらにこの細胞内遊離亜鉛イオンの増加がMEK/ERK経路の活性化を引き起こし、コラーゲン分解タンパク質の一種であるMMP1の発現が亢進されることを見出した。

本研究は、圧縮刺激が膵臓がん細胞の遺伝子発現を変化させることで膵臓がんを進行させることを示唆している。将来的には、圧縮刺激を取り除くことで膵臓がんの進行を抑える治療法の開発や、圧縮刺激が加えられているがん細胞に対する創薬スクリーニングから、新たな分子標的治療薬の開発へとつながることが期待される。

# Summary

## 発生部位の異なる骨肉腫に由来する細胞株における抗がん剤および治療標的の同定

野口玲<sup>1</sup>, 吉松有紀<sup>1</sup>, 申育實<sup>1</sup>

土屋流人<sup>1</sup>, 小野拓<sup>1</sup>, 秋山太郎<sup>1</sup>, 谷山知優<sup>1</sup>

吉田朗彦<sup>2</sup>, 川井章<sup>3</sup>, 近藤格<sup>1</sup>

<sup>1</sup>国立がん研究センター希少がん研究分野

<sup>2</sup>国立がん研究センター中央病院病理診断科

<sup>3</sup>国立がん研究センター中央病院骨軟部腫瘍・リハビリテーション科

【背景と目的】骨肉腫は腫瘍細胞が骨を形成する肉腫である。骨肉腫の多くを占める通常型骨肉腫は骨格系に発生する。一方、骨格系以外に発生する骨肉腫として骨外性骨肉腫がある。両者は臨床学的特性と分子背景が異なる。通常型骨肉腫では化学療法が有効であるが、骨外性骨肉腫には有効な化学療法はない。そのため、骨外性骨肉腫の新しい治療戦略が必要である。しかし、骨外性骨肉腫はまれに発症し、治療開発のための疾患モデルは無い。本研究の目的は、①通常型骨肉腫と骨外性骨肉腫の細胞株を樹立すること、②樹立した細胞株を用いて治療標的となる分子異常を明らかにすること、③抗腫瘍効果のある抗がん剤を同定することである。

【方法】通常型骨肉腫と骨外性骨肉腫の腫瘍組織から細胞株を樹立した。そして、樹立細胞株の治療標的として遺伝子変異・コピー数変化・キナーゼを調べた。遺伝子変異はNCCオンコパネル、コピー数変化はSNPアレイ、キナーゼ活性はPamstation12を用いて調べた。抗腫瘍効果を有する抗がん剤を同定するために、悪性腫瘍治療薬214剤を用いて薬剤感受性試験を行った。

【結果と考察】通常型骨肉腫の腫瘍組織からゼノグラフトを樹立し、ゼノグラフト腫瘍から細胞株NCC-OS1-X2-C1を樹立した。続いて、骨外性骨肉腫の腫瘍組織から細胞株NCC-ESOS1-C1を樹立した。NCC-OS1-X2-C1では治療標的となりうる遺伝子変異は同定されなかった。NCC-ESOS1-C1では治療標的であるPIK3CAの遺伝子変異 (c.3410A>G, p.H1047R) が同定された。NCC-OS1-X2-C1では多数のコピー数変化を認めたものの、治療標的となりうるコピー変化は認めなかった。NCC-ESOS1-C1では治療標的であるCDKN2Aの欠損を認めた。キナーゼ活性プロファイルは両細胞株間で明らかな差はなく、共通して活性の高いキナーゼとしてFES、FER、PDGFR- $\beta$ 、VEGFR2、Wee1が同定された。薬剤感受性試験において、NCC-OS1-X2-C1の方がNCC-ESOS1-C1より多くの薬剤で抗腫瘍効果を認めた。また同定された治療標的であるPI3K-AKT、CDKN2A、PDGFR- $\beta$ 、VEGFR2に対する抗がん剤は抗腫瘍効果を発揮しなかった。これらの結果から、両骨肉腫細胞株は異なる分子背景を有していた。しかし、分子背景から有効な抗がん剤は同定できなかった。一方で、有効な抗がん剤の同定には薬剤感受性試験が必要であった。疾患モデルが存在しない骨外性骨肉腫において我々は細胞株の樹立に成功した。両細胞株は骨肉腫の治療戦略の開発に有用な疾患モデルであると考えられる。なお、我々は研究者からのリクエストに応じて樹立した細胞株を配布している。多くの研究者が配布した細胞株を用いて研究を行うことにより、骨肉腫の研究が発展することに寄与できると期待している。

## Establishment and characterization of cholangiocarcinoma patient-derived xenograft

Piyanard Boonnate<sup>1</sup>, Gunya Sittithumcharee<sup>1</sup>  
Sawako Fujikawa<sup>1</sup>, Ryusho Kariya<sup>1</sup>, and Seiji Okada<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Division of Hematopoiesis,  
Joint Research Center for Human Retrovirus infection,  
Kumamoto University, Japan

Patient-derived xenograft (PDX) models are created by engraftment of patient tumor tissues into immunocompetent mice. Since a PDX model retains the characteristics of the primary patient tumor including gene expression profiles and drug responses, it has become the most reliable in vivo human cancer model. Cholangiocarcinoma (CCA) is an epithelial bile duct cancer with high mortality rate. Since there is no standard regimen for CCA treatment except for surgery, novel strategy of treatment is urgently needed. This study aimed to develop a patient-derived xenograft (PDX) model as well as PDX-derived cell lines of CCA from same patients for future drug screening. Frozen CCA patient tissues were transplanted into BALB/c Rag-2<sup>-/-</sup> /Jak3<sup>-/-</sup> (BRJ) mice subcutaneously. When tumor growth was observed, tissues were isolated for next transplantation, histological study, and in vitro culture to establish CCA cell lines. Currently, we succeeded to establish several PDX and PDX derived cell lines. The combination of PDXs and PDX derived cell lines can be useful model for evaluation of candidate drugs against PDX.

# Summary

## 新規ホルモン治療薬耐性前立腺癌患者腫瘍組織移植モデル（PDX）の樹立

松岡 崇志

京都大学大学院医学研究科・医学部 泌尿器科 助教

【背景】患者腫瘍移植マウスモデル（Patients-Derived Tumor Xenograft : PDX）は治療効果予測に有用なバイオマーカー探索や病態メカニズム解析、更には新規薬剤開発に有効であることが期待されている。一方で前立腺癌の移植片は生着率が極めて低く、生着した腫瘍の増殖にも長時間を必要とするためPDX樹立が最も困難な癌腫の一つとして知られている。前立腺癌は治療開始初期においてアンドロゲン除去療法に良好な感受性を示すが一定期間で同療法に抵抗性を獲得し去勢抵抗性前立腺癌（Castration resistant prostate cancer : CRPC）に移行する。実臨床においては新規抗アンドロゲン剤であるEnzalutamide等に耐性を示すCRPC患者に対する治療方法は限定されておりアンメットニーズとして存在する。従って、同薬剤耐性のpreclinicalモデル樹立が非常に重要となる。今回、多剤薬剤耐性の前立腺癌患者由来の新規PDX樹立に成功し、マウスモデルにおいても薬剤耐性を保持していることが確認されたので報告する。

【方法】新規ホルモン治療薬耐性患者のTransurethral Resection of Prostate (TUR-P) から採取した前立腺癌腫瘍組織片をNOD SCID、または、NSGマウス（雄）の皮下および腎被膜に移植を行った。切片をおよそ3-5mm大に切り分け、腫瘍を移植した部位にMatrigel®を滴下、保温を行いcoveringした。一度生着した組織片に関しては皮下に移植を行うことで継代を行った。

【結果】4症例の前立腺癌腫瘍組織片を3匹ずつ腎被膜および皮下に移植を行った。NOD SCIDマウスに移植した1症例で組織片の生着を認め、残りの3症例では認めなかった。腫瘍増殖を認めた症例では移植したマウス3匹中2匹の腎被膜で早期の発育を認め、腫瘍組織の再移植を行うことで継代可能なPDXマウスモデルが樹立された。同PDXはin vivoにおいても新規抗アンドロゲン剤のEnzalutamideに対して耐性を示した。

【結論】新規薬剤に対する耐性を保持する前立腺癌 PDX モデルの樹立に成功した。今回のPDXモデルは前立腺癌治療に応用可能なバイオマーカー探索や新規薬剤開発において有用なモデルと考えられる。



## シングルセル解析からみえてきた膵がん腫瘍内不均一性と新規がん幹細胞の同定および機能解析

山崎 昌哉

熊本大学 大学院生命科学研究部 病態生化学講座

膵がんは、予後不良の悪性腫瘍の1つである。膵がんは、進展の早期より局所浸潤や転移がみられることや、多くの抗がん剤治療に対して抵抗性をもつことが知られており、新たなアプローチによる治療法提案のため、さらなるがんの本態理解が喫緊の課題となっている。

近年、がんの腫瘍内不均一性と進展や治療抵抗性との関係が注目されているが、それらの現象の芽となる細胞として、がん幹細胞の存在が示唆されている。しかし、何を起点にがんが発生し、どのように不均一な細胞の集団を形成し進展するのか、また環境に応じて癌が生存を保つためにいかなる適応性を持って可塑的に転ずるのか、など理解されていない点が多い。そこで我々は、難治性がんの代表である膵がんを対象に、腫瘍内不均一性ならびにその現象を司るがん幹細胞の解明に着手した。

まず、膵がん異種移植片について1細胞遺伝子発現解析ならびにRNA velocityを用いた細胞系譜解析を行ったところ、Partial EMT様の細胞集団を起点とした様々な細胞への遷移が示唆された。さらに、Partial EMT様の細胞に高発現している分子として、受容体チロシンキナーゼROR1に注目した。ROR1は多くの癌で高発現しているとの報告があるが、膵がんにおける不均一性やその機能については未だ不明である。

膵がん組織内に不均一に存在するROR1高発現細胞の機能解析を行ったところ、興味深いことにROR1高発現細胞は、高い癌原性を有していた。また、抗癌剤処置後の膵がん組織における残存細胞でのROR1発現上昇、抗癌剤処置とROR1発現阻害の同時処置による再燃の抑制を確認した。さらに、転移巣でROR1が高発現していることが見受けられ、膵がん同所移植モデルマウスの解析によりROR1の発現抑制は転移を抑えることを見出した。このように、膵がん組織内に不均一に存在するROR1高発現細胞は、様々ながん幹細胞の特徴を示していることに加え、ROR1分子が機能を有していることが明らかとなった。

また腫瘍内の不均一なROR1発現は、エピジェネティックに制御されている可能性を見出し、ROR1の新規エンハンサー領域、さらには発現制御に関与する転写因子群を同定した。本発表では、膵がんの腫瘍内不均一性及びROR1を起点としたがんの進展様式、さらにその発現制御メカニズムについて、最新の解析結果を報告したい。

共同発表者：伊藤隆明（熊本保健科学大・保健科学・医学検査学）、日野信次朗（熊本大・発生医研・細胞医学）、臼杵慎吾（熊本大・発生医研・LILA）、山縣和也（熊本大・院生命科学・病態生化学）

## 患者由来「肉腫」モデルの構築

吉松 有紀

国立がん研究センター希少がん研究分野

患者由来がんモデルは、がん研究において必須のツールとして長年にわたり使われてきた。しかし、ほとんどの希少がんにおいて患者由来がんモデルは樹立されておらず、そのことが研究や治療法開発の大きな妨げとなっている。この問題に取り組むために、我々は肉腫を対象として多数の患者由来細胞株およびゼノグラフトを樹立し、樹立したモデルを国内外の研究者に無償で配布してきている。しかし、ひとつの研究室が多種多様な希少がんのすべてに対応することは難しく、多種多様なモデル系すべてを高いレベルで樹立することもできないので、今後は、多施設共同の取り組みが必要である。モデル系がないから希少がんの研究ができず、研究成果がでず、そしてモデル系が作られない、という「希少がん研究の悪循環」を、新しいモデルを樹立することで改善したい。

希少がん研究分野の細胞株がより多くの方に使用していただくため、細胞株は無償で提供していただいている。日本、米国、カナダ、ドイツなどの研究者との交流を通じて、希少がんの研究に貢献していきたい。細胞株の樹立は数十年前に今のような形になり、基本原理はさほど進歩していないが、細胞株を用いた研究から得られるものは多く、ゲノム解析やプロテオーム解析そして薬効スクリーニングやバイオインフォマティクスとリンクさせることでいろいろな側面から解析することが可能である。

これからも患者由来がんモデルの樹立を通じて希少がん研究の基盤を充実させ、臨床に還元できる研究に長期的に貢献したいと考えている。