

患者由来大腸がん幹細胞培養を用いた薬剤感受性試験を開発

－個別化医療の実現へ期待－

概要

京都大学大学院医学研究科 武藤誠 特命教授（遺伝薬理学ユニット）、坂井義治 同教授（消化管外科）、京都大学産官学連携本部 三好弘之 特任准教授（インキュベーションプログラム）らの研究グループは、手術で摘出した大腸がんから効率よくがん幹細胞を分離し、立体的に培養する方法（スフェロイド培養）を開発しました。さらに、大腸がんスフェロイドを実験用マウスに移植してがんを形成させ、このマウスで投薬試験を行うことによって、実際の患者さんでの抗がん剤の効果を精度よく予測する方法（PDSX 法）を開発しました。

本研究成果は、米国の国際学術誌「Oncotarget」誌、および米国癌学会の「Molecular Cancer Therapeutics」誌の電子版に掲載されました。

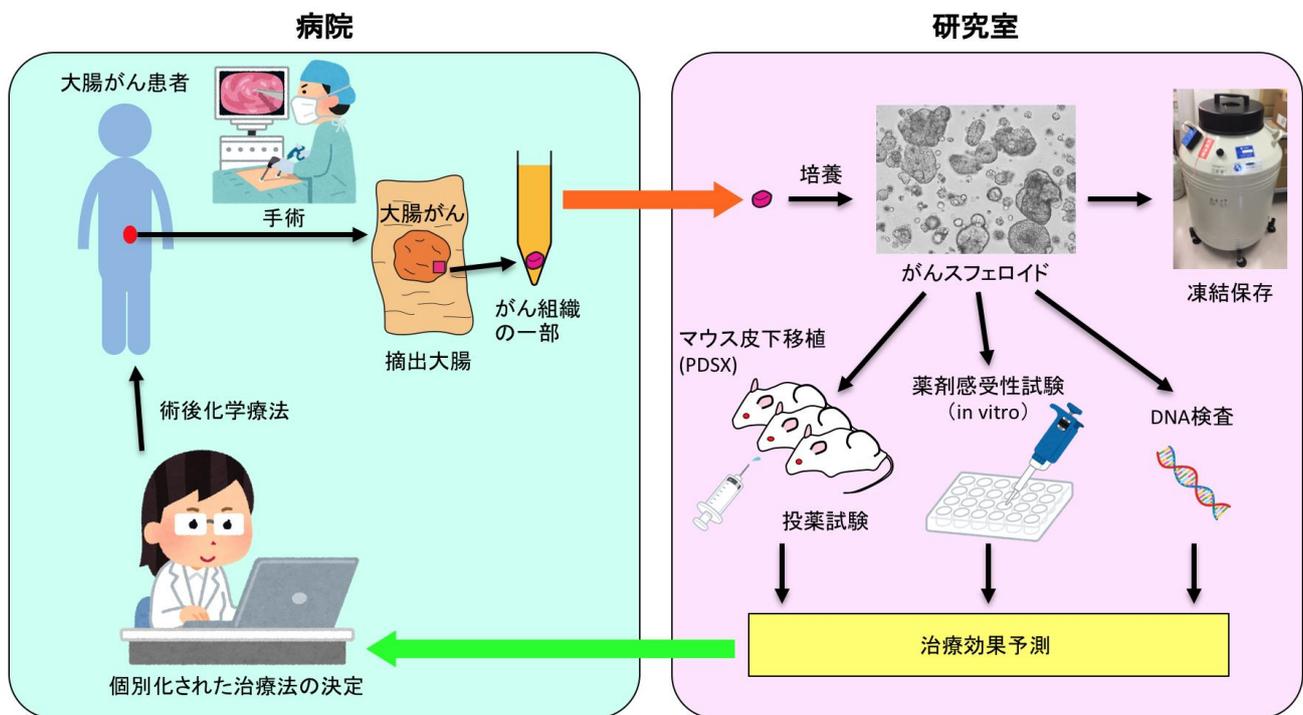


図 今回開発した技術に基づく大腸がん個別化医療構想

1. 背景

大腸がんは日本で最も罹患数の多いがんですが、手術技術や抗がん剤の進歩によって治療成績は年々向上しています。しかし肝臓や肺などの臓器に転移してしまった場合の予後は未だよくありません。転移がんに対する治療は化学療法が中心となりますが、抗がん剤の効果はがん細胞の性質によって違うため、どの抗がん剤が有効かを患者さんごとにあらかじめ予測して投与する「個別化医療」の実現が望まれています。

がん細胞には様々な遺伝子の異常が蓄積しており、そのパターンは個別のがんによって異なります。近年遺伝子解析技術の劇的な進歩によって、がん細胞の持つ遺伝子変異を全て明らかにすることができるようになりました。こうした技術を用いて多数の患者さんの遺伝子変異と治療成績の情報が解析され、データベース化されています。将来的には、個々の患者さんの情報をそのデータベースと照合することによって最適な薬剤を選択できるようになると期待されています。

一方、手術で摘出したがん組織からがん細胞を培養し、この細胞に様々な抗がん剤を添加して抗がん効果を見ることはより直接的で早期に実現可能な方法です。従来、摘出がんから分離したがん細胞を体外培養するのは困難とされてきましたが、近年、ゲル状のタンパク質（マトリゲル）に埋め込んだがん細胞を「スフェロイド」または「オルガノイド」と呼ばれる立体的な細胞の塊として培養する方法が開発されました。しかし、こうした培養法は特殊な技術と複雑な組成の培養液を必要とするため、化学療法が必要な全ての患者さんのがん細胞を培養することは現実的ではありませんでした。

2. 研究手法・成果

そこで今回私たちは、「がん細胞スフェロイド」を体外培養して薬剤の効果調べる方法を改良し、コストを大幅に抑えるとともに試験に必要な期間を短縮することに成功しました。従来の方では、患者さんから取り出したがん細胞を培養するために 10 種類以上の化学物質やタンパク質を加えた特殊な培養液が使用されますが、今回の研究では、一般的な培養液に 2 種類の化学物質（Y27632：ROCK 阻害薬、SB431542：TGF- β 受容体阻害薬）を加えた比較的単純な組成の培養液を使用して、大腸がん患者由来のがん細胞スフェロイドを短期間で（2 週間から 2 ヶ月）効率よく樹立しました。さらに EGF（上皮成長因子）と FGF（線維芽細胞成長因子）という 2 種類の増殖因子や、NECA（アデノシン受容体賦活薬）という化学物質を加えることによって、培養の成功率が約 9 割にまで上がりました。また、ホタルの発光酵素（ルシフェラーゼ）を用いた感度の高い増殖測定法を開発し、体外での薬剤感受性試験が簡単に行えるようになりました（原著論文 1）。

しかし、生体内でがん細胞は様々な体内環境の影響を受けるため、体外で行う試験ではある種の薬剤（例：血管新生阻害剤）の効果を予測できません。このような場合は、ヒトのがん組織を免疫不全マウスに移植するゼノグラフト（異種移植）を行って移植がんを形成させ、このマウスに対して薬剤を投与する試験が行われます。この PDX (Patient-derived xenograft) と呼ばれる方法は開発当初、個別化医療を実現する有力な技術として世界中で臨床応用が試みられてきましたが、手術で取り出したがん組織をマウスに移植してもなかなか定着しないこと、それによって試験期間が長くなりコストも増大することから、実際の臨床サービスに用いるのは難しいとされています。

そこで、今回私たちは一旦大腸がん組織からがんスフェロイドを培養し、十分な量に増やしたスフェロイドを免疫不全マウスに移植することによって、がん組織を直接移植するよりも効率よく、短期間で移植がんを作出することに成功しました。私達はこの方法を PDSX (Patient-derived "spheroid" xenograft) と名付けました。PDSX と従来の PDX を比較したところ、PDSX の方が形成された移植がんの大きさが均一で、投薬試験でより信頼性の高い結果が得られました。後向き試験では、7 件の症例全てで PDSX による投薬試験の結果と

患者さんの治療成績が一致しました。また、試験にかかる期間は PDX で平均 5 ヶ月程度であったのに対し、PDSX では平均 2 ヶ月程度でした（原著論文 2）。

3. 波及効果、今後の予定

今回発表したスフェロイド培養および PDSX はいずれも従来の技術より低コスト、高効率であり、医療サービスとして直ちに提供できる水準にあります。この方法によって、有効な抗がん剤を事前に予測するだけでなく、効かないと予測される抗がん剤の使用を避けることで、患者さんの経済的・身体的負担を軽減できる可能性があります。今後は治療中の患者さんでの効果を見る前向き臨床試験を通して実際の臨床現場での効果を検証するとともに、他施設での臨床研究の需要に応えるため、企業への技術移転を行ってこれらの試験を受託事業として受注する体制を整える予定です。

4. 研究プロジェクトについて

今回開発した培養法、試験法に関する技術は京都大学産官学連携本部・出資事業支援部門のインキュベーションプログラム（研究代表者：武藤誠）および日本医療研究開発機構(AMED)の革新的がん医療実用化研究事業（研究代表者：武藤誠）により開発されました。また、京大発ベンチャー企業である京ダイアグノスティクス株式会社より特許出願を行いました。

< 論文タイトルと著者 >

< 原著論文 1 >

タイトル：An improved method for culturing patient-derived colorectal cancer spheroids（患者由来大腸がんスフェロイドを培養する改良された方法）

著者：三好弘之、前川久継、柿崎文彦、山浦忠能、河田健二、坂井義治、武藤誠（京都大学大学院医学研究科遺伝薬理学ユニット・消化管外科学、京都大学産官学連携本部）

掲載誌：Oncotarget DOI：10.18632/oncotarget.25134（2018年4月24日公開）

< 原著論文 2 >

タイトル：A Chemosensitivity Study of Colorectal Cancer Using Xenografts of Patient-Derived Tumor Initiating Cells（患者由来がん幹細胞の異種移植モデル(PDSX)を用いた大腸がんの薬剤感受性試験）

著者：前川久継、三好弘之、山浦忠能、板谷喜朗、河田健二、坂井義治、武藤誠（京都大学大学院医学研究科遺伝薬理学ユニット・消化管外科学、京都大学産官学連携本部）

掲載誌：Molecular Cancer Therapeutics DOI：10.1158/1535-7163.MCT-18-0128（2018年7月3日公開）