

(表紙)

表 題 患者由来癌細胞を用いた肺癌研究

論文の区分 博士課程

著 者 名 SURINA

担当指導教員氏名 萩原弘一

所 属 自治医科大学大学院医学研究科  
地域医療学系専攻  
呼吸器・循環器疾患学専攻分野  
呼吸器内科専攻科

2023年1月10日申請の学位論文



## 患者癌細胞を用いた肺癌研究

SURINA

自治医科大学大学院医学研究科地域総合医療学系

循環器・呼吸器疾患学呼吸器内科



## 目次

要約	5
背景	6
方法	8
1. 癌性胸膜炎胸水	8
2. 患者癌細胞の分離	8
3. スフェロイド作成	8
4. オルガノイド作成	9
5. 形態観察	10
5.1 PAP 染色と GIEMSA 染色	10
5.2 免疫染色	11
5.3 蛍光免疫染色	11
6. 全 RNA の抽出と二本鎖 cDNA の合成	11
7. cDNA LIBRARY の構築	12
8. RNA シークエンス結果解析	13
9. 胸水上清単核細胞と末梢血単核細胞を用いた <i>IN VITRO</i> 免疫反応系の構築	13
10. オルガノイドと免疫反応細胞の共培養	16

---



---

11. 全長 cDNA を含有する PLASMID の構築	17
11.1 全長 cDNA の合成	17
11.2 全長 cDNA PLASMID LIBRARY の構築	17
11. 大腸菌の形質転換	18
12. 全長 cDNA プラスミドの抽出	19
13. トランスフェクション	19
結果	20
1. 患者情報	20
2. 細胞培養	21
2.1 一般的な培養法	21
2.1 FEEDER CELL を用いた共培養	22
2.2 MATRIGEL MATRIX を用いた三次元培養	24
3. トランスクリプトミクス解析	26
3.1 主成分分析	27
3.2 患者癌細胞、スフェロイド、オルガノイドの遺伝子発現量解析	29
3.2.1 スフェロイドとオルガノイドに共通して高発現する遺伝子	29
3.2.2 スフェロイドとオルガノイドに共通して低発現する遺伝子	30
3.2.3 スフェロイドのみに高発現、低発現する遺伝子	31

---



3.2.4	オルガノイドのみに高発現、低発現する遺伝子	31
3.3	遺伝子セット濃縮分析 GENE SET ENRICHMENT ANALYSIS (GSEA)	34
3.4	遺伝子セット変動分析 GENE SET VARIATION ANALYSIS (GSVA) エラー! ブックマークが定義されていません。	
4.	<i>IN VITRO</i> 細胞傷害性アッセイ	42
5.	細胞傷害性アッセイにおけるオルガノイドのアポトーシス評価	45
6.	オルガノイド全長 cDNA を用いた mRNA ワクチンの作成と細胞への投与	53
	考察	57
	引用文献	61
	謝辞	72

---

## 要約

癌細胞は正常細胞と異なり、多くの遺伝子変異と、正常細胞とは異なる遺伝子発現プロファイルを持っている。患者由来癌細胞を用いると、癌細胞と正常細胞の違いだけではなく、その結果引き起こされる生物学的挙動の変化をも検討できる。

我々は 20 人の患者から癌性胸膜炎胸水を採取、胸水から患者由来スフェロイドとオルガノイドを確立する培養法を確立した。スフェロイドの形態は原発巣が局所進展する際の形態と類似し、遺伝子発現プロファイルは局所進展に有利と考えられるものであった。オルガノイドの形態は遠隔転移巣が拡大する際の形態と類似し、遺伝子発現プロファイルは遠隔転移巣拡大に有利と考えられるものであった。例えば、炎症反応と TGF- $\beta$  が引き起こす上皮間葉系転換に関連遺伝子の発現は、スフェロイドでは減弱し、オルガノイドでは増強していた。オルガノイドに免疫細胞作用させるとアポトーシスが引き起こされた。これは、末梢血単核細胞から分化した樹状細胞が、オルガノイドが有する癌抗原を細胞傷害性 T 細胞に提示していることを示していると推測した。これまでの結果に基づき、オルガノイド mRNA を用いたワクチンは、癌治療の有力な手段になることを期待して、オルガノイド mRNA を免疫細胞に移入する実験が進行中である。

## 背景

現在、癌は日本人死亡原因第一位である。そのうち、肺癌は男性の癌死亡第一位、女性の第二位を占める（国立がん研究センターがん情報サービス「がん統計」）。癌治療の進歩は、公衆衛生上大きな意味を持っている。

癌性胸膜炎は癌細胞を含んだ胸水が胸腔内に貯留する重篤な合併症である<sup>1-3</sup>。大量胸水貯留は呼吸・循環機能を損なうため、胸水排液治療が必要となる<sup>4</sup>。癌性胸膜炎は、癌細胞が胸水で培養されている状態とも言える。排液した胸水は、癌細胞と共に、炎症細胞、腫瘍関連線維細胞など腫瘍関連細胞も含んでいる。胸水から分離した癌細胞を用いれば、患者体内での癌細胞の分裂、増殖、薬剤応答性、DNA 変異、RNA 発現、各種生体因子に対する反応を検討できる。さらに、排液胸水から癌細胞、免疫細胞、腫瘍随伴細胞を分離し、再混合することで癌細胞と炎症細胞、間葉系細胞との相互作用を検討できる。

これまで、研究に用いられる癌細胞は、主として細胞株だった。細胞株は重要な実験系だが、長期の継代培養中に生じた染色体変化、遺伝子配列変化、遺伝子発現変化を蓄積しており、必ずしも生体内の状況を反映していない可能性がある<sup>5,6</sup>。胸水中の癌細胞を直接用いた場合、数回の分裂を行った後でも、新たに生じた変化は細胞株より少なく、患者体内の状態をより正確に反映していると推測できる<sup>7-9</sup>。また、胸水排液時に患者から末梢血を同時採取して各種免疫細胞を誘導分化すれば、癌細胞と循環免疫細胞との免疫反応を検討することも可能だろう。



我々は、以前の研究で、癌細胞のダメージが最小限になるよう物理的刺激を極力押さえた癌性胸膜炎胸水からの患者由来癌細胞（Patient-derived cancer cells: PDCC、以下患者癌細胞）分離手法を確立した<sup>10</sup>。しかし、この手法を用いて分離しても患者癌細胞は一般的な細胞培養液では培養困難であった。生体内では、患者癌細胞は胸膜中皮や胸壁間質から作用を受けている。我々は、本研究で、胸膜・胸壁を模した培養系を試みることにし、 $\gamma$ 線で分裂能を喪失させたマウス胎児線維芽細胞を feeder cell とする培養系<sup>11-13</sup>、また、癌細胞を Matrigel matrix に包埋する培養系を試みることにした<sup>14-16</sup>。両培養系は良好に働き、マウス胎児線維芽細胞を feeder cell とする培養系からは患者細胞由来スフェロイド（Patient cell-derived spheroid: PDS、以下スフェロイド）、Matrigel matrix を用いた培養系からは患者細胞由来オルガノイド（Patient cell-derived spheroid: PDO、以下オルガノイド）を得ることができた。

本研究では、スフェロイドとオルガノイドの形成に伴う形態変化、RNA 発現パターンの解析を行い、両者の生体内癌細胞との類似性を検討した。さらに両者を用いて構築可能な癌進展モデルに関して考察した<sup>17</sup>。

---

## 方法

### 1. 癌性胸膜炎胸水

我々は、2018年4月から2020年4月の間に自治医科大学附属病院呼吸器内科に入院した20名の癌性胸膜炎患者から同意を書面で取得し、診断、治療のため採取、排液された胸水の一部を収集した。本研究は自治医科大学倫理審査委員会の承認（遺第19-037号）を受けて行った。

### 2. 患者癌細胞の分離

癌性胸膜炎胸水は、癌細胞、炎症細胞、血球など含んでいる。癌細胞は、炎症細胞、血球と比較して細胞が大きく、従って沈降係数が大きい。そのため、粘性の高い牛胎児血清（fetal bovine serum: FBS）上に重層すると速やかに沈降するが、他の細胞は長時間、重層境界近くに留まる。我々は癌性胸膜炎胸水をFBS上に重層し、重力に従って沈降する細胞を採取することで、物理的外力を加えず癌細胞を分離、採取した<sup>10</sup>。

### 3. スフェロイド作成

マウス胎児線維芽細胞を $\gamma$ 線で照射することで、増殖能が無く、付着能が保たれた線維芽細胞を作成できる。培養フラスコに線維芽細胞を付着させ feeder cell layer とした。その上に、患者癌細胞数：線維芽細胞が1:100になるよう患者癌細胞を撒



き、共培養した。共培養用培養液は以下のように作成した。Nutrient Mixture F-12 Ham (F12; Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA)と Dulbecco's modified Eagle Medium (DMEM; Sigma-Aldrich)を 2:1 で混合し、5%の Fetal Bovine Serum (FBS; Biowest, Nuaille, France)を添加、さらに以下の物質を記載の最終濃度になるよう添加した。hydrocortisone (Sigma-Aldrich), 0.4  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ; insulin (FUJIFILM, Wako Pure Chemical Co., Osaka, Japan), 5  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ; cholera toxin (FUJIFILM), 8.4  $\text{ng}/\text{mL}$ ; recombinant human Epidermal Growth Factor (rh-EGF; SHENANDOAH Biotechnology, Warwick, PA, USA), 10  $\text{ng}/\text{mL}$ ; Adenine (Sigma-Aldrich), 24  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ; and ROCK Inhibitor Y-27632 dihydrochloride (Enzo Lifesciences, Farmingdale, NY, USA), 10  $\mu\text{M}$ 。増殖した細胞は、付着細胞剥離剤を使わずにピッペティングとフラスコを叩くことで剥離、feeder cell の無い培養フラスコに移し、上記培養液で培養を継続した。

#### 4. オルガノイド作成

Matrigel matrix は使用 24 時間前に 4 °C の冷蔵庫に移して溶解した。三次元培養用培養液 Matrix basement media (MBM)は以下のように作成した。DMEM/F12 - Dulbecco's Modified Eagle Medium : Nutrient Mixture F-12 (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA) を 1:1 で混合し、以下の物質を記載の最終濃度になるよう添加した。Gibco basic Fibroblast Growth Factor (bFGF; Thermo Fisher Scientific), 20  $\text{ng}/\text{mL}$ ; EGF, 50  $\text{ng}/\text{mL}$ ; Gibco N-2 MAX Supplement (Thermo Fisher Scientific), 1  $\times$ ; Gibco B-27

---



Supplement (Thermo Fisher Scientific), 1 ×; ROCK Inhibitor Y-27632 dihydrochloride, 10 μM; Penicillin-Streptomycin-Amphotericin B Suspension, 1 × (FUJIFILM)。癌細胞を融解した Matrigel matrix に  $10^7$  cells/mL になるよう懸濁し、24 ウェル培養用プレートに撒いた。そして、37°C にインキュベートして Matrigel matrix を固化させ、固化ゲル上に 500 μL の MBM を添加し、培養した。MBM は 4 日ごとに交換した。

オルガノイド形成後の継代は以下のように行った。ゲル溶解剤 Cell recovery solution (Corning) をウェルに加え、4°C に移して 1 時間保ち、ゲルを溶解した。4°C 冷却した phosphate buffer saline (PBS) を加えてゲル溶解剤を中和し、1400 rpm、4°C で 5 分間遠心した。ゲルを完全に除去できるまで、PBS を添加し遠心する上記ステップを繰り返した。洗浄後のオルガノイドを新しい Matrigel matrix に包埋し、MBM を添加して培養を継続した。

## 5. 形態観察

### 5.1 PAP 染色と Giemsa 染色

患者癌細胞、スフェロイド（第 8 から 10 継代細胞）、オルガノイド（第 8 から 10 継代細胞）を Cytospin 4 (Thermo Fisher Scientific) で 2000 rpm、3 分間スピンドウンし、スライドガラスに固定した。固定した細胞を PAP 染色および Giemsa 染色し、観察した。



## 5.2 免疫染色

スライドガラスに固定した患者癌細胞、スフェロイド（第 8 から 10 継代細胞）、オルガノイド（第 8 から 10 継代細胞）を一次抗体 anti-thyroid transcription factor antibody (Agilent Technologies, Santa Clara, CA, USA)最終濃度 10  $\mu\text{g}/\text{mL}$ 、二次抗体 goat anti-rabbit IgG using UltraView DAB Universal kit (Roche Diagnostics K.K., Basel, Swiss) 最終濃度 2  $\mu\text{g}/\text{mL}$  と反応させて染色し、Olympus DP74 (Olympus Corporation, Tokyo, Japan)で観察した。

## 5.3 蛍光免疫染色

患者癌細胞、スフェロイド（第 8 から 10 継代細胞）、オルガノイド（第 8 から 10 継代細胞）を一次抗体 anti-cytokeratin 7 monoclonal antibody (LifeSpan BioSciences, Seattle, WA, USA)最終濃度 10  $\mu\text{g}/\text{mL}$ 、二次抗体 alexa Fluor<sup>TM</sup> 488 goat anti-rabbit IgG (Invitrogen, Thermo Fisher Scientific)最終濃度 2  $\mu\text{g}/\text{mL}$  と反応させ、細胞核を Hoechst 33258 (DOJINDO, Kumamoto, Japan)最終濃度 2  $\mu\text{g}/\text{mL}$  で染色し、Fluoview FV1000 (FV10-ASW, Olympus)で観察した。

## 6. 全 RNA の抽出と二本鎖 cDNA の合成

患者癌細胞 ( $2 \times 10^6$  cells)、スフェロイド ( $2 \times 10^6$  cells)（第 8 から 10 継代細胞）、オルガノイド（1500 organoids）（第 8 から 10 継代細胞）から、TRIzol reagents (Life technologies, Carlsbad, CA, USA)を用いて全 RNA を抽出した。

---



---

1  $\mu$ g の全 RNA を用いて、PrimeScript™ Double Strand cDNA Synthesis Kit (TAKARA-Bio, Shiga, Japan) で二本鎖 cDNA を合成し、1.8  $\times$  AMPure XP (Beckman Coulter, Brea, CA, USA) で cDNA を精製した。

## 7. cDNA library の構築

合成された cDNA は、NEBuffer 2.1 (New England Biolabs, Ipswich, MA, USA), 1 $\times$ ; ATP (New England Biolabs), 1 mM; dNTP (TAKARA-Bio, Shiga, Japan), 1 mM; T4 polynucleotide kinase (New England Biolabs), 10 units; Taq DNA polymerase (New England Biolabs), 5 units を混合した反応液を用いて 37 $^{\circ}$ C で 30 分、70 $^{\circ}$ C で 20 min 反応させ、末端リン酸化、末端平滑化、dA tailing をした。次いで、cDNA 両端に Miseq system (Illumina, San Diego, CA, USA) が必要とする butterfly アダプターをライゲーションした。アダプターは K-orgDelA: 5'-Phospho-GATCGGAAGAGCACACGTCTGAACTCCAGTC-3' (100  $\mu$ M) と H-org H-org: 5'-ACACTCTTCCCTACACGACGCTCTTCCGATCT-3' (100  $\mu$ M) を使用した。最終濃度 1  $\mu$ M のアダプターミックスを作成し、T4 polynucleotide kinase, 10 units と T4 DNA ligase (New England Biolabs), 400 units とともに cDNA に加え、25 $^{\circ}$ C で 12 時間反応した。cDNA に結合しなかったアダプターは 0.7  $\times$  AMPure XP で除去した。この反応物を K-AMP primer: 5'-GACTGGAGTTCAGACGTGTGCTCTTCCGATCT-3', 200 nM; H-AMP primer: 5'-ACACTCTTCCCTACACGACGCTCTTCCGATCT-3', 200 nM; 1  $\times$  PrimeSTAR GXL buffer (TAKARA-Bio); dNTP, 800 nM; PrimeSTAR® GXL DNA Polymerase, 0.625 units の条件で、98 $^{\circ}$ C で 5 秒 denature した後、98 $^{\circ}$ C で 5 秒、68 $^{\circ}$ C



---

で 30 秒を 25 サイクルの PCR で増幅した。300 bp 以上の産物を 0.7 × AMPure XP で選択、精製した。生成産物の塩基配列を Miseq シークエンサーで決定した。カートリッジは MiSeq reagent kit v3 (Illumina)を用いた。

## 8. RNA シークエンス結果解析

出力された fastq ファイルを CLC genomic workbench version 20.0.4 (Qiagen, Venlo, Nederland)で解析し、主成分分析 (Principle Component Analysis: PCA 図)、heatmap 図と火山プロット (Volcano 図)を作成した。heatmap と火山プロットは  $p < 0.05$  を有意水準とした。遺伝子注釈ファイルは Ensembl

([https://asia.ensembl.org/info/docs/tools/vep/script/vep\\_cache.html](https://asia.ensembl.org/info/docs/tools/vep/script/vep_cache.html)) からダウンロードし

た。Gene Set Enrichment Analysis (GSEA)は Gene Set Enrichment Analysis (GSEA)

version 4.1.0 を用いて行った。FDR-q value < 25%と p value < 0.05 を有意水準とし

た。Gene Set Variation Analysis (GSVA)は TPM (Transcription per million)を用い、

molecular signature database C2 を遺伝子注釈データベースとして参照し、R で解析し

た。図の処理は Adobe Illustrator 2020 (Adobe, San Jose, CA, USA)と R studio 1.4.1106

を使用した。統計解析は GraphPad Prism 9 software (GraphPad Software, Inc., San

Diego, CA, USA)および R を使用して行った。

## 9. 胸水上清単核細胞と末梢血単核細胞を用いた *In vitro* 免疫反応系の構築

---

沈降により癌細胞を除いた胸水上清 (以下胸水上清) (n=1) を 250 × g、10 分間



遠心分離し、上清を除き、沈殿した単核細胞を収集した。患者末梢血 6 mL

(n=1)、健康ドナー末梢血 (n=1) 6 mL と PBS 6 mL をそれぞれ混合し、末梢血希釈液を作成した。リンパ細胞分離溶液 (nacalai tesque, Japan) 6 mL を回転数 1000 rpm、1 分間で遠心した。末梢血希釈液をリンパ細胞分離液の上に滴注し、室温 800 × g、25 分で遠心分離し、中間の単核細胞層を新しいチューブに採取、PBS と混合した。この細胞混合液を 250 × g、10 分間遠心分離し、リンパ細胞分離溶液を完全除去できるまで、洗浄を繰り返した。その後、上清を除き、沈殿した単核細胞を収集した。

得られた単核細胞に AIM-V (Sigma-Aldrich) 培養液を添加し、24 ウェル培養用プレートで 24 時間の培養後、浮遊した単核細胞を取り出し、新しい 24 ウェル培養用プレートで培養した。付着した単核細胞は現状のまま培養を継続した。

付着した単核細胞に AIM-V (10%FBS 含有)を添加し、以下の物質を記載の最終濃度になるよう添加した。Granulocyte-macrophage colony-stimulating factor GM-CSF (Invitrogen), 0.1 mg/mL、Interleukin IL-4 (Invitrogen), 0.1 mg/mL。付着した単核細胞は上記の培養液で 5 日間培養した。その後 AIM-V (10% FBS 含有)を添加し、以下の物質を記載の最終濃度になるよう添加した。IL-4, 0.1 mg/mL、Interferon IFN- $\alpha$ , (Invitrogen) 0.1 mg/mL、Tumor Necrosis Factor TNF- $\alpha$  (Invitrogen), 0.1 mg/mL、Prostaglandin E2 PGE-2, (Invitrogen) 1 mg/mL。付着した単核細胞は上記の培養液で 3 日間培養した。その後、一次抗体 Polyclonal Rabbit anti-Human CD86 Antibody

---



---

(Proteintech, Chicago, IL, USA)最終濃度 10  $\mu\text{g}/\text{mL}$ 、二次抗体 alexa Fluor<sup>TM</sup> 488 goat anti-rabbit IgG (Invitrogen, Thermo Fisher Scientific)最終濃度 2  $\mu\text{g}/\text{mL}$  と反応させ、細胞核を Hoechst 33258 (DOJINDO, Kumamoto, Japan)最終濃度 2  $\mu\text{g}/\text{mL}$  で染色し、Fluoview FV1000 (FV10-ASW, Olympus)で観察した。

浮遊した単核細胞を AIM-V に IFN- $\gamma$  (Invitrogen), 1mg/mL を添加した培養液で 1 日培養した。翌日、培養液を除去し、AIM-V に IFN- $\gamma$ , 1 mg/mL; Muromonab-CD3 (OKT-3; Invitrogen), 0.05 ng/ $\mu\text{L}$ ; IL-2 (Invitrogen), 0.1 mg/mL を添加し、3 日間培養した。次いで、AIM-V に IL-2, (Invitrogen) 0.1 mg/mL を添加、5 日間培養した。その後、一次抗体 Rabbit - Anti Human CD8 antibody (Proteintech, IL, USA)と Mouse - anti human CD4 antibody (Biogems, CA, USA)最終濃度 10  $\mu\text{g}/\text{mL}$ 、二次抗体 alexa Fluor<sup>TM</sup> 488 goat anti-rabbit IgG (Invitrogen, Thermo Fisher Scientific)と Anti-Mouse IgG, Dylight 594, Amplified Antibody Kit (Vector Laboratories, CA, USA)最終濃度 2  $\mu\text{g}/\text{mL}$  と反応させ、細胞核を Hoechst 33258 (DOJINDO, Kumamoto, Japan)最終濃度 2  $\mu\text{g}/\text{mL}$  で染色し、Fluoview FV1000 (FV10-ASW, Olympus)で観察した。

細胞傷害性アッセイに使用した免疫細胞培養液には、以下の物質を、記載の最終濃度になるよう AIM-V に添加した。IL-2, 0.1 mg/mL; IL-5, (Invitrogen) 0.1mg/mL; IL-7 (Invitrogen), 0.1 mg/mL。浮遊した単核細胞を 400  $\times$  g、3 分間で遠心し上清を除去、免疫細胞培養液で懸濁した後、付着した単核細胞と共培養し、細胞傷害性アッセイを構築した。培養液は 3 日間ごとに半分を取り出し、400  $\times$  g、3 分間で遠心分



離した。上清は-80℃で保存した。沈澱した細胞は新しい免疫細胞培養液で懸濁し、元のウェルに戻して継続培養した。その作業を繰り返し、3週間培養した。保存した上清について、3つのウェルを使用し、IFN- $\gamma$ の産出量をIFN- $\gamma$  cockatiel ELISA kit (Invitrogen) を用いて Biotek Epoch 2 multiplate reader で検出した。

## 10. オルガノイドと免疫反応細胞の共培養

オルガノイド：免疫反応細胞が1:10になるよう24ウェル培養用プレートで共培養した。一種類のオルガノイド培養液MBM：免疫細胞培養液が1:1になるよう培養液を作り、上記の培養系に添加した。共培養した細胞に、抗PD-1抗体Nivolumabを60  $\mu\text{g}/\text{mL}$ （治療薬として投与した際に期待される血中薬物濃度）添加した<sup>18</sup>。細胞核を染色するCellLight™ Nucleus-RFP BacMam 2.0 (Thermo Fisher Scientific)とカスパーゼを染色するCellEvent™ Caspase-3/7 Green Detection Reagent (Invitrogen)を共培養液に加え、24時間ごとに蛍光顕微鏡でオルガノイドのアポトーシスを観察し、結果を撮影した。蛍光写真を用いて、ImageJ 1.53Kを用いて (Wayne Rasband and contributors, National Institutes of Health, USA) RFPとCaspase-3/7の蛍光ピクセルを横、縦から計算した。RFPとCaspase-3/7のピクセル割合を換算した結果をアポトーシス係数と定義した。RFP/Caspase-3/7  $\geq 1$ の場合、オルガノイドはアポトーシスを惹起せず、RFP/Caspase-3/7  $< 1$ の場合、オルガノイドはアポトーシスを惹起したと解釈した。オルガノイドを添加した120時間のアポトーシス係数について、統計学

---





F Amp を使用した。cDNA 挿入部位の両側に作成したベクタープライマーは pEGFP-v-Forward: 5' GAGTTGGTAGCTCTTGATCCGGC-3' (100 μM) と pEGFP-v-Reverse: 5'-TTCCGAAGGTAAGTGGCTTCAGC-3' (100 μM) を使用した。最終濃度 10μM のプライマーミックスを作成し、10 ng のプラスミド DNA に 1×KOD one master mix (TOYOBO, Osaka, Japan)を添加、98°Cで 10 秒、55°Cで 10 秒、68°Cで 30 秒の 30 サイクルの PCR で増幅し、vector DNA を作成した。全長 cDNA を pEGFP-adjc-Forward: 5'-GCCGGATCAAGAGCTACCAACTCAGTACTTAATACGACTCACTATAGGGTGGATTGATATCTAAT - 3' (100 μM) と pEGFP-adjc-Reverse: 5'-GCTGAAGCCAGTTACCTTCGGAACGGCTCAGGCGTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTATTTCTAGA - 3' (100 μM) で増幅し、両側に vector DNA と同一の配列を添加した。まず最終濃度 10 μM のプライマーミックスを作成し、10 ng の全長 cDNA に 1 × KOD one master mix を添加し、98 °Cで 10 秒、55 °Cで 10 秒、68 °Cで 120 秒の 30 サイクルの PCR で増幅させ、vector DNA の一部配列を両端に持つ insert DNA を作成した。Vector DNA と二倍量の insert DNA を混合し、1 × Gibson assembly master mix を加え、50°Cで 1 時間反応させ、全長 cDNA plasmid を構築した。300 bp 以上の産物を 0.7 × AMPure XP で選択、精製した。

## 11. 大腸菌の形質転換



NEB 10-beta Electrocompetent *E. coli* (C3020, New England BioLabs, MA, USA) に 10 ng の全長 cDNA plasmid をエレクトロポレーションを用いて導入した。

## 12. 全長 cDNA プラスミドの抽出

培養した細菌懸濁液を  $11000 \times g$ 、1 分間で遠心した。細胞ペレットから、FavorPrep Plasmid Extraction Mini Kit (Favorgen Biotech Corporation, Taiwan)を用いて plasmid を抽出した。Plasmid は Nanodrop (Thermo Fisher Scientific)を用いて吸光度と濃度を測定した。

## 13. トランスフェクション

3T3-J2 マウス胎児線維芽細胞を、 $10^5$  cells/mL になるよう、24 ウェル培養用プレートに撒いた。全長 cDNA plasmid を Lipofectamine 3000 (SigmaAldrich)を用いて 70 – 90% コンフルエントになった細胞に添加し、トランスフェクションした。48 時間後、蛍光顕微鏡で導入した緑色蛍光タンパクを観察し、結果を撮影した。

## 結果

### 1. 患者情報

本研究の患者情報を表 1 に示す。全検体 20 人のうち、スフェロイドが形成されたのは 3 人の患者由来癌細胞であり、オルガノイドが形成されたのは 5 人の患者由来癌細胞であった。12 人の患者由来の癌細胞についてはスフェロイドとオルガノイドのどちらも形成できなかった。

患者 ID	性別	年齢	病理型	TNM 型*	スフェロイド・オル ガノイドのうち作成 に成功したもの
IDEN202001	男	55	小細胞肺癌	T4N3M1a	スフェロイド
IDEN202002	女	55	肺腺癌	T1bN3M1a	スフェロイド
IDEN202003	男	72	肺腺癌	T2aN2M1a	オルガノイド
IDEN202004	女	55	肺腺癌	T2bN3M1c	オルガノイド
IDEN202005	女	64	肺腺癌	T2bN2M1a	オルガノイド
IDEN202006	女	79	肺腺癌	T3N3M1c	オルガノイド
IDEN202007	女	64	肺腺癌	T4N3M1c	オルガノイド
IDEN202008	男	81	小細胞肺癌	T4N3M1a	スフェロイド

表 1

\*TNM 分類は UICC 8 版に基づき記載した

\$三種類の培養液: (1) RPMI-1640+10% FBS、(2) 胸水上清、(3) 1:1 (1)と(2)の混合液。

## 2. 細胞培養

### 2.1 一般的な培養法

我々は、以前の研究で、(1) 10%FBS を含んだ RPMI-1640 (10% FBS 含有)、(2) 胸水上清、(3) 両者の 1:1 混合液を用いて患者癌細胞の培養を試みた。いずれの培養液でも癌細胞は増殖しなかった (図 1)。

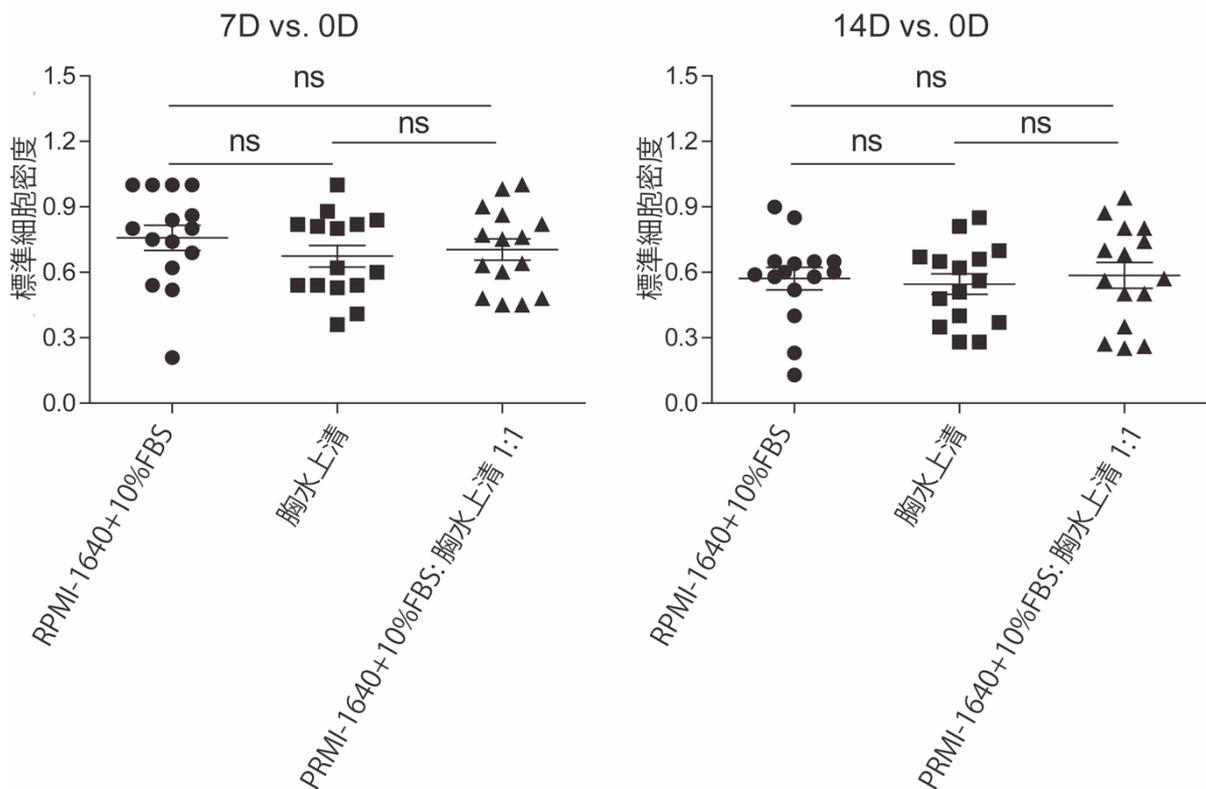


図 1 患者癌細胞を一般の培養液 (RPMI-1640、10% FBS 含有)、胸水上清、両者の 1:1 混合液で培養した結果。どの培養液でも癌細胞の増殖は認められなかった。0D: Day 0. 7D: Day 7.

14D: Day 14. ns: not significant.

一般の細胞培養液だけでなく、患者体内の培養液である胸水上清でも培養不能だったことは、癌性胸膜炎胸水に含まれる既存の栄養素、成長因子だけでは癌細胞の

増殖に不十分なことを示している。体内環境と今回の培養環境を比較考察した。癌性胸膜炎癌細胞は胸膜、胸壁間質細胞と相互作用している。この相互作用が欠落したため、培養が成功しなかったと推定した。癌細胞と他細胞との相互作用として足場依存性増殖（anchorage dependent growth）が有名である。何らかの足場を提供する培養系は、胸膜、胸壁間質細胞の代替になると考えた。

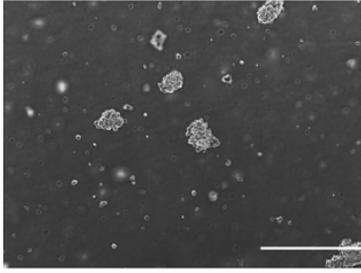
## 2.1 Feeder cell を用いた共培養

まず、癌細胞と feeder cell との共培養を試みた。Feeder cell 上に撒いた癌細胞は増殖を開始した。その後 feeder cell 無しの培養環境に移しても増殖し、スフェロイドを形成した（図 2A）。Feeder cell との接触により、癌細胞が増殖能を獲得したこと、またその増殖能が feeder cell 非依存的増殖能だったことは癌細胞が何らかの初期化（reprogramming）を受けたことを示唆している。どのような初期化を受けたか推測するため、患者癌細胞とスフェロイドの形態を比較した。Giemsa 染色では（n=3）、患者癌細胞、スフェロイド両者に細胞質の空胞、多核、明確な核小体が認められた（図 2B）。免疫蛍光染色では、スフェロイドに細胞核の崩壊像が認められた。これらの所見はスフェロイドが患者癌細胞より悪性度の高い形質を有することを示している（図 2C）。免疫染色では（n=1）、肺腺癌の患者癌細胞は腺癌マーカーである TTF-1 陽性だったが、肺腺癌スフェロイドは陰性だった。これは、患者癌細胞がより未分化、低分化な形質を有することを示唆している（図 2D）。

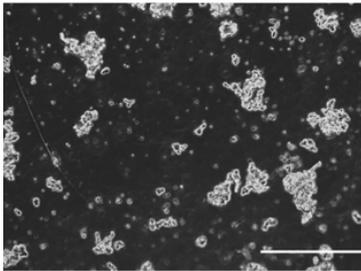


A

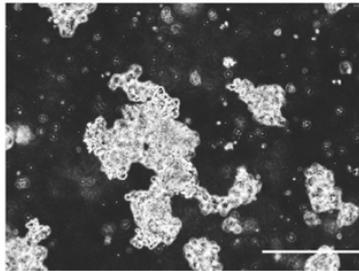
(i)



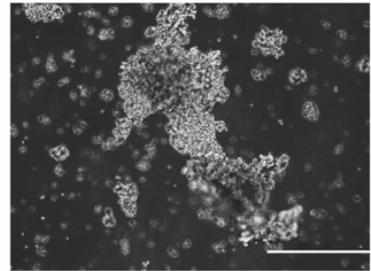
(ii)



(iii)



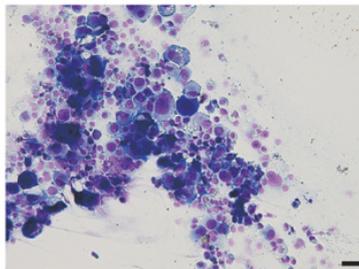
(iv)



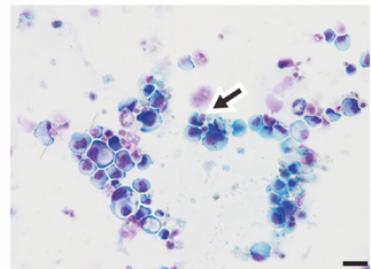
B

**Giemsa staining**

患者癌細胞



スフェロイド



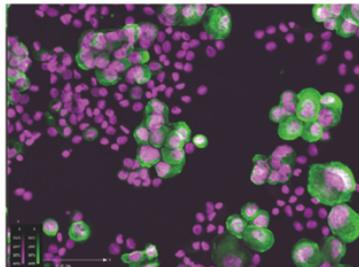
C

**Cytokeratin 7**

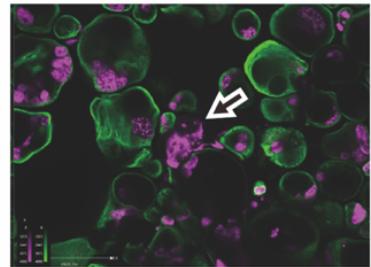
**Hoechst 33258**

免疫蛍光

患者癌細胞



スフェロイド

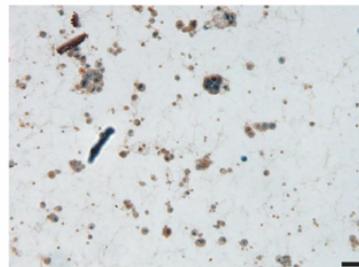


D

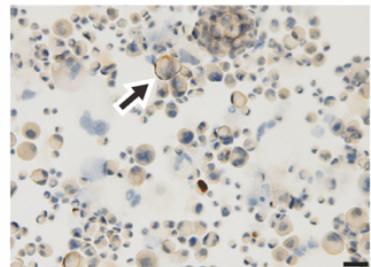
**TTF1**

免疫染色

患者癌細胞



スフェロイド



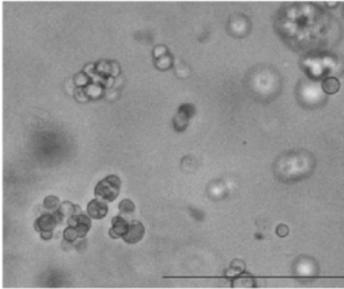
**図 2** スフェロイドの形成と形態変化。IDEN202002 のデータを代表的なデータとして示した。(A) 位相差顕微鏡像。(i) 癌細胞を feeder cell 除いて培養した培養 1 日目。(ii) 第 1 継代 10 日目。(iii) 第 15 継代 10 日目。(iv) 第 30 継代 10 日目。継代に伴い、癌細胞は悪性度の高い形質を示すようになった。スケールバーは 200  $\mu\text{m}$  を示す。(B) Giemsa 染色の結果。スケールバーは 50  $\mu\text{m}$  を示した。(C) 免疫蛍光の結果。上皮細胞マーカー Cytokeratin 7 (CK7) は細胞膜を染色し、Hoechst 33258 は細胞核を染色する。(D) 免疫染色結果。腺癌細胞マーカー TTF-1 は細胞質を染色する。スケールバーは 50  $\mu\text{m}$  を示す。矢印はスフェロイドを示す。

## 2.2 Matrigel matrix を用いた三次元培養

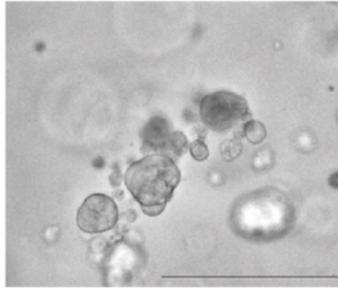
患者癌細胞を Matrix matrigel に包埋した三次元培養では、癌細胞は Matrix matrigel の中で増殖、直径 200  $\mu\text{m}$  を超える細胞塊に成長し、オルガノイドの基準を満たした (図 3A) エラー! 参照元が見つかりません。 。作成された全てのオルガノイドと患者癌細胞を比較した結果 (n=5)、免疫蛍光染色では、内部構造が見られ、細胞核の大小不整は認めなかった (図 3B)。免疫染色では TTF-1 陽性だった。すなわち、患者癌細胞と比較し、オルガノイドはより分化した形態を示した (図 3C)。

A

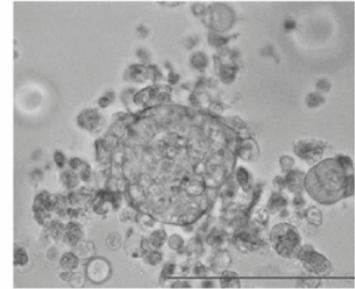
(i)



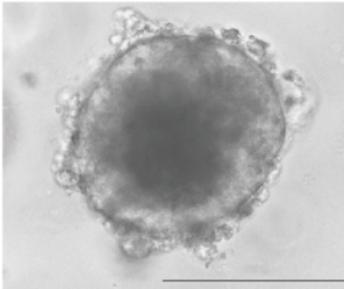
(ii)



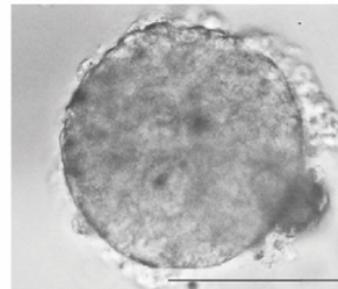
(iii)



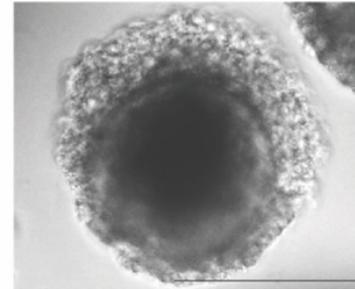
(iv)



(v)



(vi)



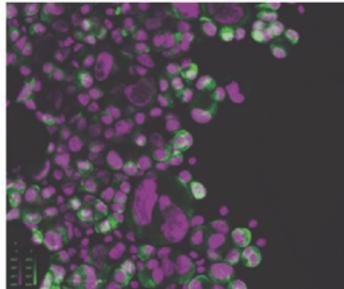
B

Cytokeratin 7

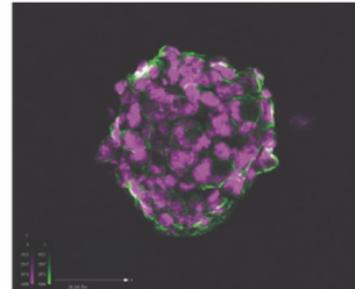
Hoechst 33258

免疫蛍光

患者癌細胞



オルガノイド

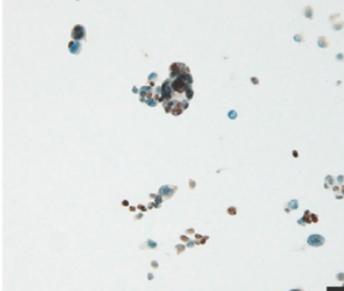


C

TTF1

免疫染色

患者癌細胞



オルガノイド

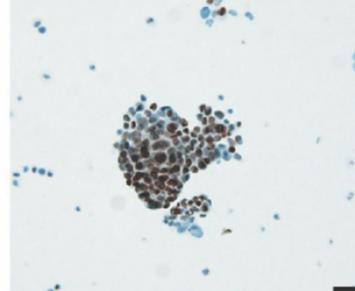


図 3 オルガノイドの形成と形態変化。IDEN202006 のデータを代表的なデータとして示し

た。(A) 位相差顕微鏡像。(i) 患者癌細胞を matrix Matrigel に包埋した直後 (第 0 継代 0 日

目)。 (ii) 第 0 継代 10 日目。 (iii) 第 0 継代 20 日目。 (iv) 第 5 継代 20 日目。 (v) 第 10 継代 20 日目。 (vi) 第 15 継代 20 日目。 スケールバーは 200  $\mu\text{m}$  を示す。 (B) 免疫蛍光染色結果。 上皮細胞マーカー Cytokeratin 7 (CK7) は細胞膜を染色し、Hoechst 33258 は細胞核を染色した。 (C) 免疫染色結果。 腺癌細胞マーカー TTF-1 は細胞質を染色した。 スケールバーは 50  $\mu\text{m}$  を示す。

興味深いことに、スフェロイドを形成した患者癌細胞はオルガノイドを形成せず、オルガノイドを形成した患者癌細胞はスフェロイドを形成しなかった (表 1)。 すなわち、スフェロイドの形成とオルガノイドの形成は排他的な関係があることを示唆している。

### 3. トランスクリプトミクス解析

患者癌細胞、スフェロイド、オルガノイドが示す形質は、それぞれが発現している mRNA の種類、発現量で決定されていると考えられる。我々は、患者癌細胞、スフェロイド、オルガノイドの mRNA 発現プロファイルを比較検討するため、RNA-sequencing を行った。一サンプルあたり平均 163877 リードが取得できた。 *in silico* 解析は以下の通りに行った。 (I) 主成分分析を用いて、患者癌細胞とスフェロイド、患者癌細胞とオルガノイドの相違を概略評価した。 (II) 遺伝子発現量の相違を数値化、視覚化することによって検討した。 (III) GSEA と GSVA を用いて、スフェロイドとオルガノイドに関与している生物学的過程、シグナル伝達経路を解析

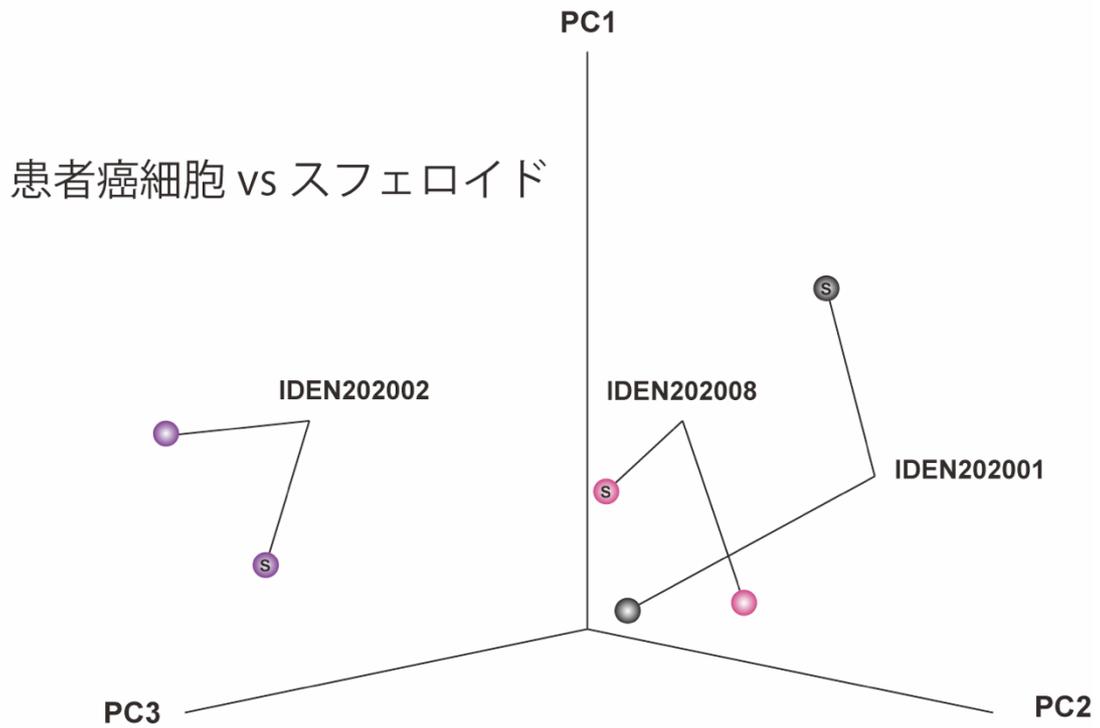
した。

### 3.1 主成分分析

主成分分析は、遺伝子発現の概略を三次元に縮約し、遺伝子発現の大まかな方向性を比較する解析手法である。我々は、主成分分析により、患者癌細胞とスフェロイド、患者癌細胞とオルガノイドの遺伝子発現を比較した。患者癌細胞とスフェロイドとの距離は離れていたが（図 4A）、患者癌細胞とオルガノイドはより近かった（図 4B）。これは、患者癌細胞からスフェロイドが形成された際の変化が、患者癌細胞からオルガノイドを形成された際の変化より大きいことを示唆している。すなわち、スフェロイド形成の初期段階で feeder cell を用いた時に、癌細胞が何らかの初期化を受けたのではないかという我々の推測と一致する所見であった。一方、オルガノイド形成時の変化はより緩やかであり、オルガノイドの遺伝子発現パターンは元の患者癌細胞の遺伝子発現パターンにより近いと考えられた。



A



B

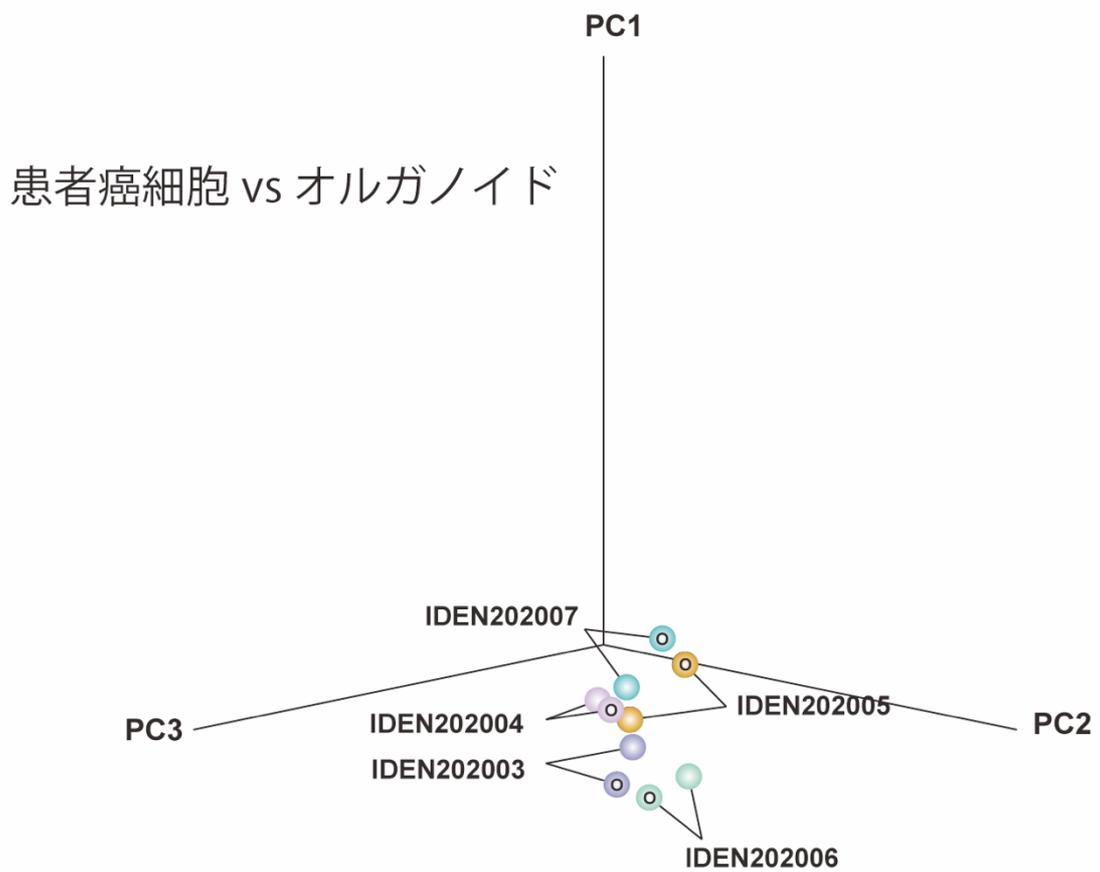


図 4 主成分分析結果。対数変換した transcription per million (TPM)を用いて解析した。一つの点は一つのサンプルの RNA sequence 結果を示した。患者癌細胞とスフェロイド、患者癌細胞とオルガノイドの結果をペアで示した。

### 3.2 患者癌細胞、スフェロイド、オルガノイドの遺伝子発現量解析

患者癌細胞とスフェロイド、患者癌細胞とオルガノイドの二群の遺伝子発現量を比較した。遺伝子発現量を視覚化するため、Heatmap を用いて遺伝子発現量の変化を色彩の濃淡で示し、火山プロットを用いて遺伝子の発現比と統計的有意性 (p 値) を二次元に展開して示した。これらのアプローチを用いてスフェロイドとオルガノイドで発現が変化した遺伝子、関与している生物学的機能を検討した。

#### 3.2.1 スフェロイドとオルガノイドに共通して高発現する遺伝子

患者癌細胞と比較し、スフェロイドとオルガノイドで共通して高発現した遺伝子を検討した。そのような遺伝子は SCGB3A1 のみであった。SCGB3A1 は気管支上皮細胞のマーカーである。すなわち、患者癌細胞は、スフェロイドとオルガノイドの形成に従い、より強く気管支上皮の形質を示すようになる<sup>19,20</sup>。患者癌細胞は胸水中に浮遊しているが、スフェロイドとオルガノイドは細胞集塊であり、構造を有している。そのため、気管支上皮の形質を強く示すのかもしれない。

### 3.2.2 スフェロイドとオルガノイドに共通して低発現する遺伝子

患者癌細胞と比較し、スフェロイドとオルガノイドに共通して低発現した遺伝子は13個あったが、その中には補体系に属する遺伝子が3つ含まれていた（図5）。これらの遺伝子、C1QA、C1QBとC1QCはいずれも免疫反応を弱めることが知られている。補体系遺伝子の低発現は、腫瘍細胞の増殖、進展に有利な周辺環境形成に利すると考えられる<sup>21</sup>。

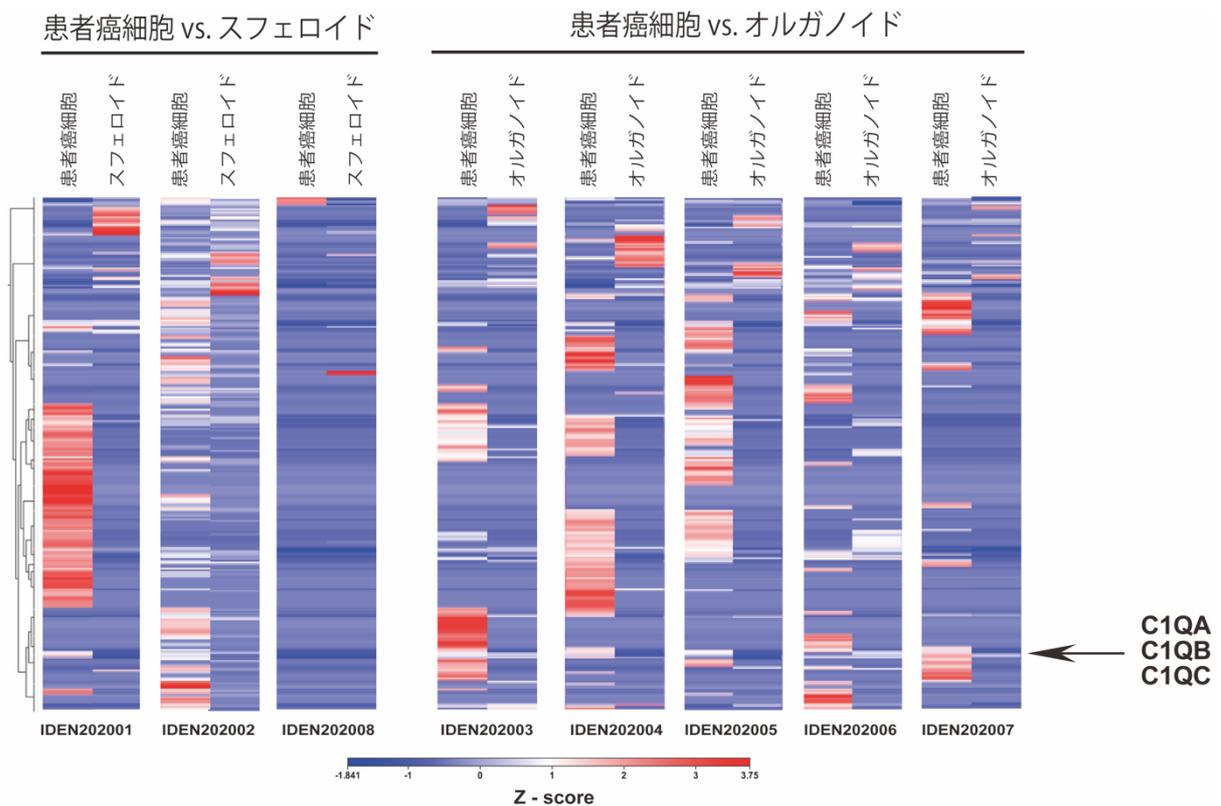


図5 Heatmapの結果。患者癌細胞と比較した遺伝子発現量変化を異なった色で示す。赤色は高発現した遺伝子を表し、青色は低発現した遺伝子を表している。患者番号は下に表記している。補体関連3分子の位置を矢印で示す。

### 3.2.3 スフェロイドのみに高発現、低発現する遺伝子

スフェロイドのみに有意に高発現している遺伝子は7個あった。この中で、mucin 5B (MUC5B)と mucin 5AC (MUC5AC)に着目した (図 6A)。この二つの遺伝子は細胞外基質の形成を促進することで、腫瘍細胞の増殖を促進することが知られている<sup>22,23</sup>。

スフェロイドで有意に低発現した遺伝子は96個あったが、この中で、STAB1と CD14に着目した (図 6A)。STAB1は scavenger 受容体であり、腫瘍の成長を促進し、転移を抑制する<sup>24</sup>。CD14は toll-like 受容体の共通受容体であり、MyD88、TRIFなどのシグナル伝達経路を活性化し、腫瘍の増殖を促進する<sup>25,26</sup>。スフェロイドで発現が変化した遺伝子は、免疫系を含む細胞外環境がスフェロイドの増殖に対して重要であることを示唆している。

### 3.2.4 オルガノイドのみに高発現、低発現する遺伝子

オルガノイドでの遺伝子発現はスフェロイドと異なっていた。有意に高発現した遺伝子は49個あったが、この中で、EIF3CLと SFTPA1に着目した (図 6B)。

EIF3CLは真核細胞転写開始因子として、腫瘍の転移を促進する<sup>27</sup>。SFTPA1は肺胞表面活性物質の重要な構成成分であり、肺胞と気腔の界面を維持している<sup>28</sup>。

有意に低発現していた遺伝子は10個あったが、この中で、MAZと MMP7に着目した。MAZは myc 関連 zinc finger タンパクとして、腫瘍の血管新生を促進する<sup>29</sup>。



MMP7 は matrix metalloproteinase の一種であり、細胞外基質の分解を調節する<sup>30,31</sup>。

オルガノイドで発現が変化した遺伝子は、腫瘍構造を維持するタンパク、生物学的過程を含んだ細胞外環境が、オルガノイドの増殖に対して重要であることを示唆している。

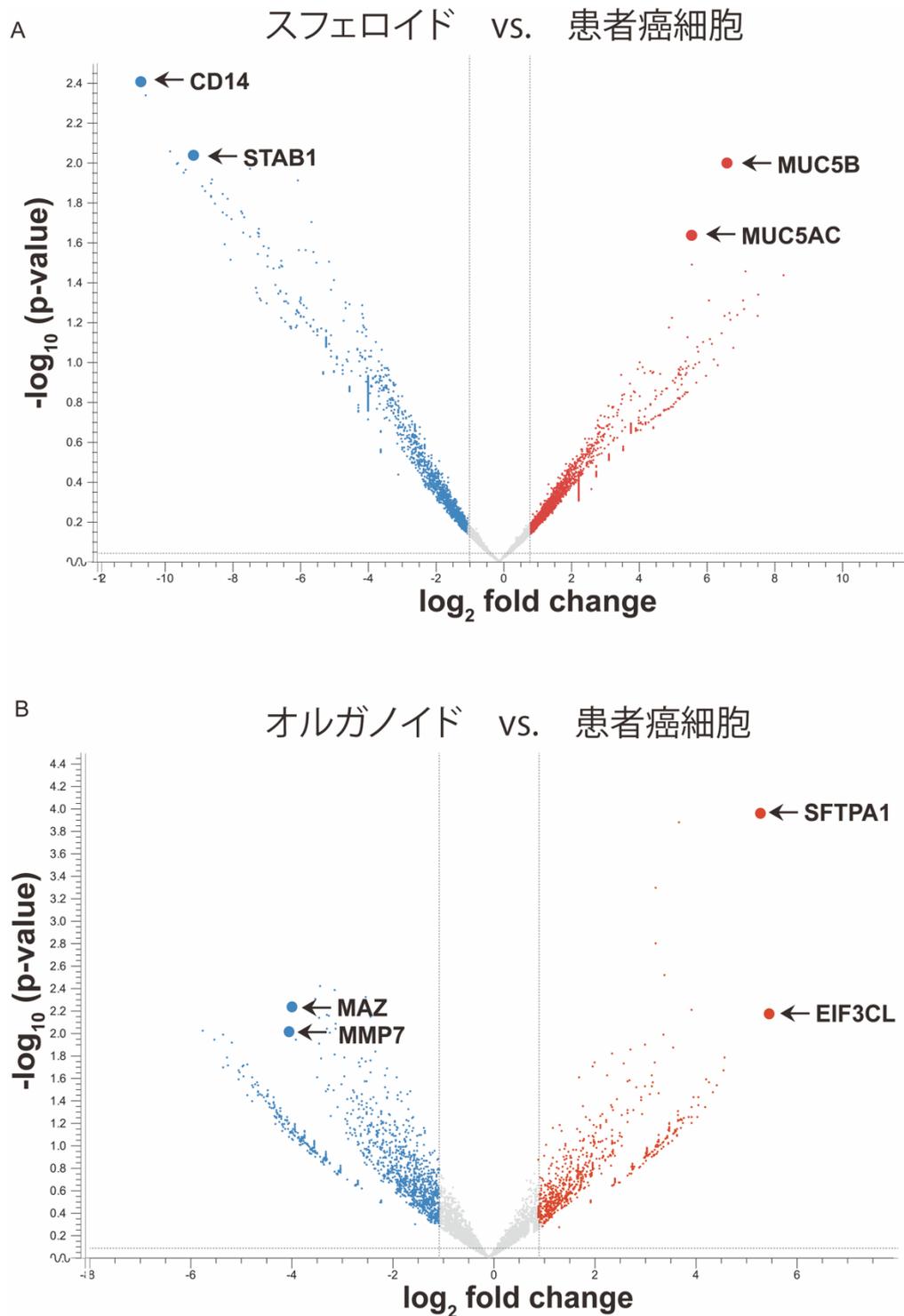


図 6 火山プロットの結果。(A) スフェロイドと患者癌細胞を比較して発現量が変化した遺伝子。(B) オルガノイドと患者癌細胞を比較して発現量が変化した遺伝子。赤色ドットはスフェロイド、オルガノイドで発現量が増加した遺伝子を示す ( $\log_2$  fold change > 1, p value < 0.05)。

---

青色ドットはスフェロイド、オルガノイドで発現量が低下した遺伝子を示す ( $\log_2$  fold change < -1, p value < 0.05)。

### 3.3 遺伝子セット濃縮分析 Gene set enrichment analysis (GSEA)

遺伝子発現量が変わると細胞機能も変わる。しかし、複数の遺伝子の発現量が同時に変わるため、個々の遺伝子発現変化を調べるだけでは、どの機能が変化したか推定しにくいことがある。このため、関連した機能を有する複数の遺伝子をセットとし、遺伝子セットの発現変化を検討する手法が開発された。これが GSEA である。GSEA を使用すれば、関連機能を有する遺伝子セットごとに解析できる。GSEA を用いてスフェロイドとオルガノイドを患者癌細胞と比較し、特定の細胞機能が増強、減弱するか検索した。

スフェロイドでは増強した細胞機能は認められなかったが、減弱した細胞機能として炎症反応が検出された (図 7A)。炎症反応は癌と癌間質で活性化されているシグナル伝達経路と生物学的反応過程を含んでいる<sup>32</sup>。GSEA の結果から示された炎症反応の減弱は、免疫反応が弱まることを意味し、腫瘍が局所的に進展するための有利な変化であることを示唆している。スフェロイドは、胸膜に浸潤した癌細胞が免疫反応の低下した胸膜表面で増殖、進展する現象を模した癌モデルであると考えられる。

一方、オルガノイドではスフェロイドと逆に、減弱した細胞機能を発見できな

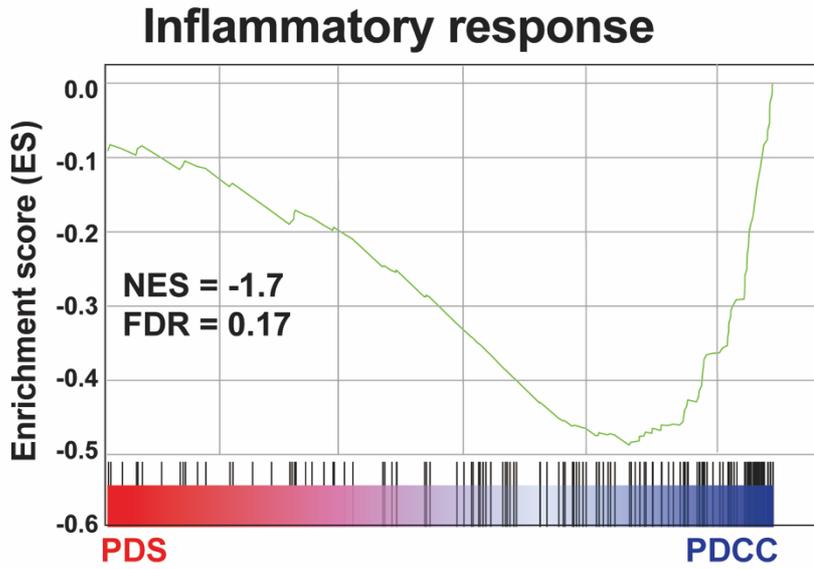
ったが、増強した細胞機能を 10 個発見した。増強した細胞機能のうち血管新生 (Angiogenesis) と上皮間葉系転換 (Epithelial mesenchymal transition: EMT) 二つに着目した。血管新生は腫瘍に栄養成分を提供し、腫瘍の成長を支え、腫瘍の転移ルートを提供する<sup>33</sup>。EMT は腫瘍発生に関与するだけでなく、EMT が増強された癌細胞はアポトーシスに抵抗し、さらに移動能と浸潤能が増強された結果、転移能が増強される<sup>34</sup>。これは、遠隔転移に有利な変化である。オルガノイドは、浸潤、転移する現象を模した癌モデルであると考えられる。

最後に、スフェロイドとオルガノイドを比較した結果、変化した 11 個の細胞機能を検出した。スフェロイドで減弱していた炎症反応はオルガノイドで増強、オルガノイドで増強していた上皮間葉系転換はスフェロイドで減弱していた (図 7C)。これは、スフェロイドとオルガノイドでは細胞機能に違いがあることを示している。生体内でも、癌はその進展場所によって異なる挙動を示す。スフェロイドとオルガノイドはこのような異なる挙動を示す癌のモデルになる可能性がある。我々は、シグナル伝達経路を中心に細胞機能を調べることにした。

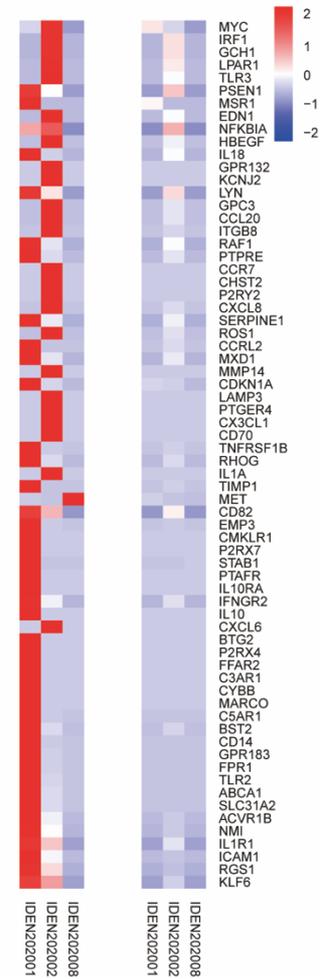


A

### スフェロイド vs. 患者癌細胞

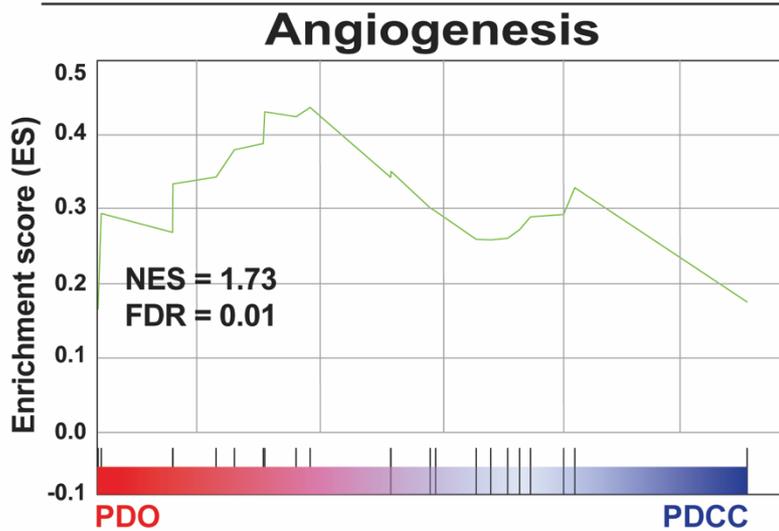


患者癌細胞 スフェロイド



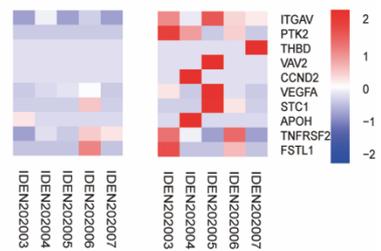
B

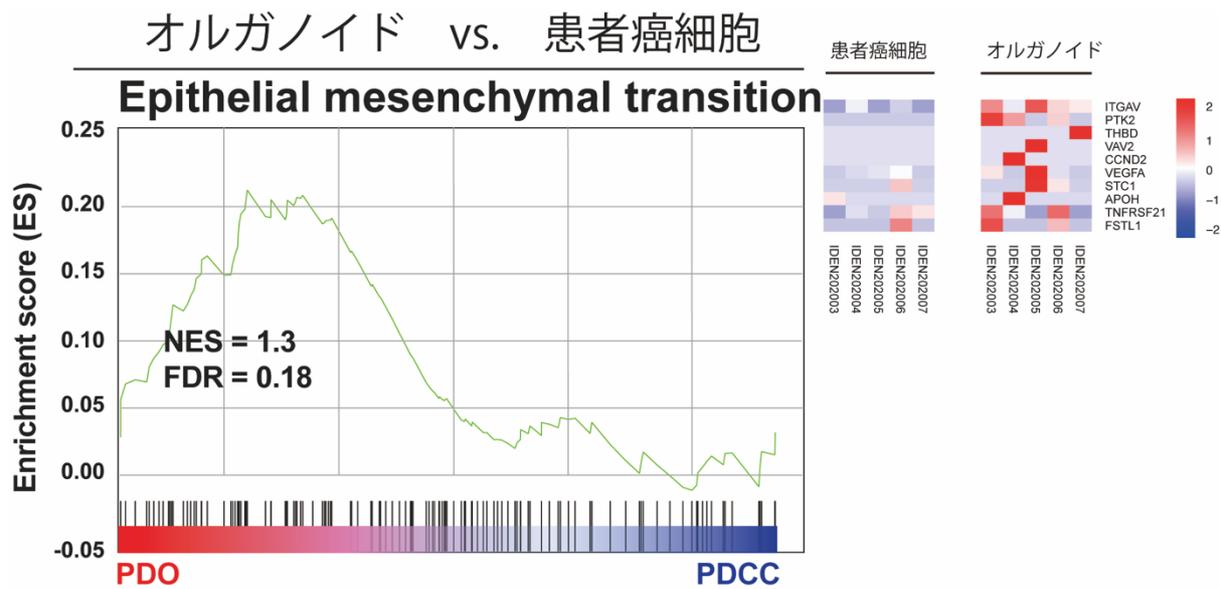
### オルガノイド vs. 患者癌細胞



患者癌細胞

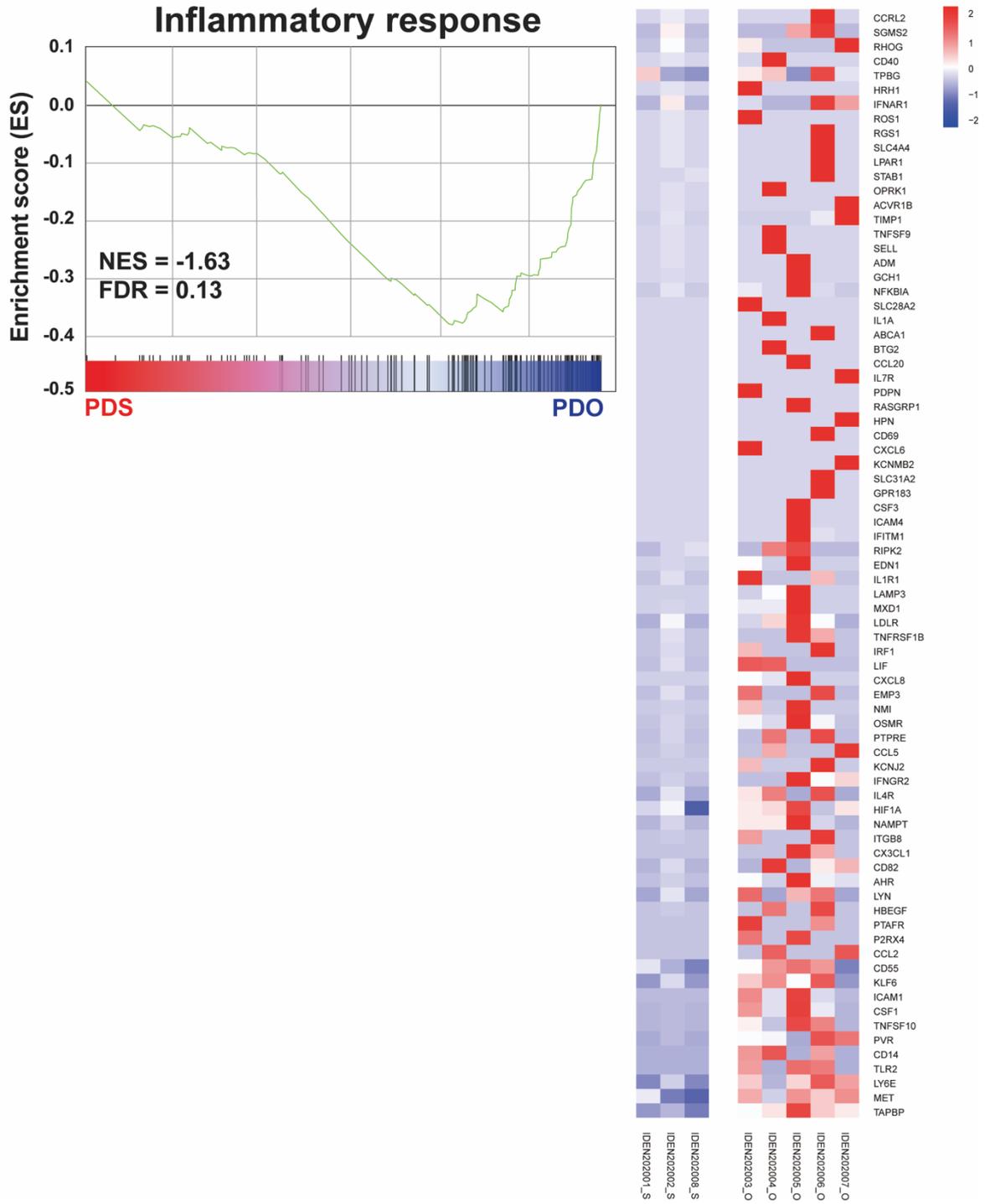
オルガノイド







### C スフェロイド vs. オルガノイド





# スフェロイド vs. オルガノイド

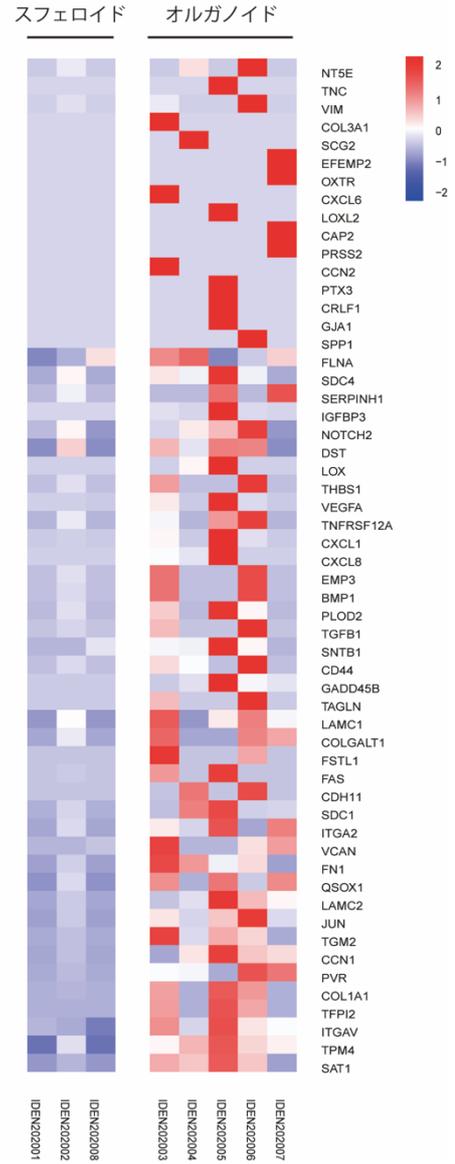
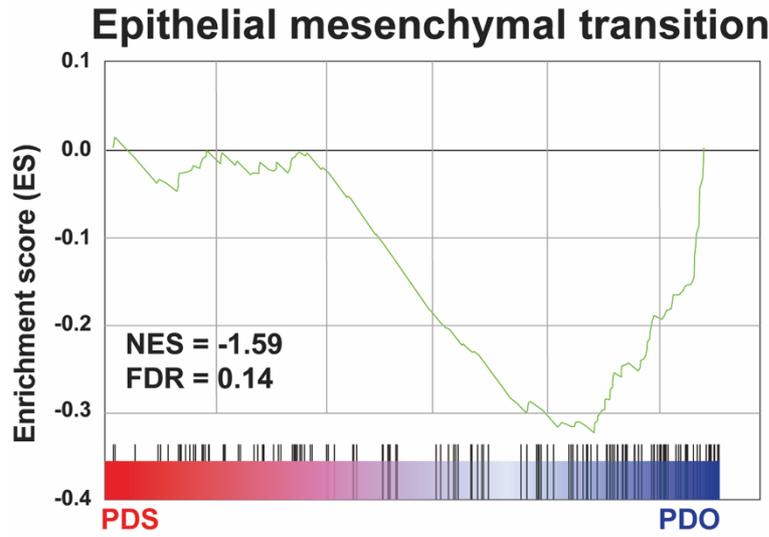


図 7 TPM に基づいた計算した GSEA 結果。(A) スフェロイドと患者癌細胞の比較。(B) オルガノイドと患者癌細胞の比較。(C) スフェロイドとオルガノイドの比較。緑色の曲線は濃縮された遺伝子セットを示す。底部のバーは遺伝子を示す。左側の赤色は増強した遺伝子を示す。右側の青色は減弱した遺伝子を示す。縦型の黒い線は関連遺伝子セットの位置を示す。右側の Heatmap はこの生物機能に参与している関連遺伝子セットを示す。

### 3.4 遺伝子セット変動分析 Gene Set Variation analysis (GSVA)

GSVA は GSEA でのシグナル伝達経路の変化を、教師なし学習方式で評価する手法である<sup>35</sup>。GSVA を用いてシグナル伝達経路変化を検索した。患者癌細胞と比較し、スフェロイドでは transforming growth factor beta (TGF- $\beta$ )により引き起こされた上皮間葉系転換の促進が抑えられる (図 8A)。すなわち、スフェロイドは、上皮間葉系転換の生物学的過程を抑制することを示唆している。患者癌細胞と比較し、オルガノイドでは TGF- $\beta$  により引き起こされた上皮間葉系転換の抑制がさらに促される (図 8B)。すなわち、オルガノイドは上皮間葉系転換の生物学的過程を促進することを示唆している。同様にスフェロイドとオルガノイドを比較した結果においてもオルガノイドで TGF- $\beta$  により引き起こされた上皮間葉系転換が増強されていた (図 8C)。これは GSEA の結果を支持するものである。スフェロイドは胸膜表面で進展する癌モデルになり、オルガノイドは遠隔臓器で増殖する癌モデルになるのではないかという我々の考えと矛盾しないものであった<sup>36</sup>。

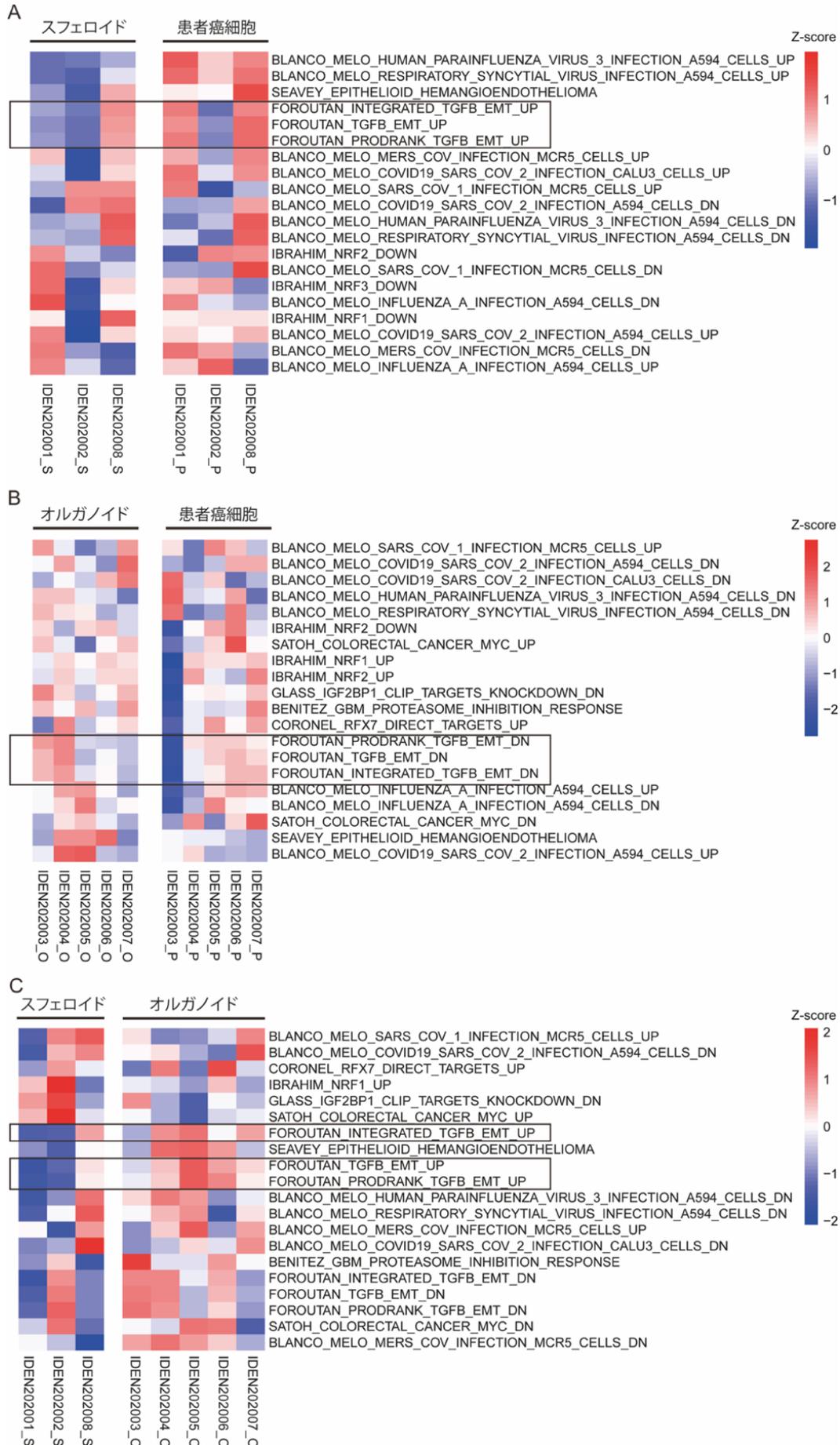


図 8 GSA の結果。(A) スフェロイドと患者癌細胞の比較。(B) オルガノイドと患者癌細胞の比較。(C) スフェロイドとオルガノイドの比較。GSA は MSigDB C2 を参照した。各列は一つのサンプルに対応する。活性が増強したシグナル伝達経路は赤色で、活性が減弱したシグナル伝達経路は青色で示す。

#### 4. *In vitro* 細胞傷害性アッセイ

細胞傷害性アッセイ (Cytotoxic Killing Assay: CTL killing assay) は、腫瘍免疫を評価する一手法である。免疫細胞を添加した環境下で、癌細胞の挙動を観察した。トランスクリプトミクス解析の結果、免疫反応がスフェロイドでは減弱し、オルガノイドでは増強したことが予想されることから、免疫応答を惹起しやすいオルガノイドを使用し、細胞傷害性アッセイを行った。

免疫細胞を作成するため、同一患者由来末梢血単核細胞と健康ドナー由来末梢血単核細胞、胸水上清から採取した胸水単核細胞を樹状細胞と細胞傷害性 T 細胞に誘導分化した。

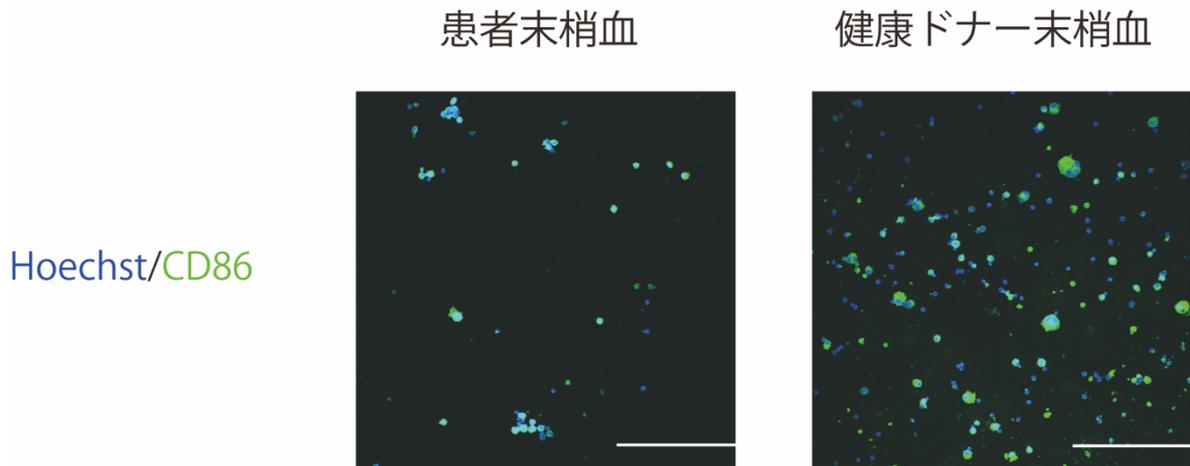
免疫蛍光染色を用いて誘導分化した細胞の種類を確認した。CD86 は付着単核細胞を染色することから、染色された細胞は成熟樹状細胞であり、抗原提示機能を保有すると推測した (図 9A)。CD4 と CD8 は浮遊単核細胞を染色することから、染色された細胞は細胞傷害性 T 細胞であり、他細胞を攻撃する機能を保有すると推測した (図 9B)。



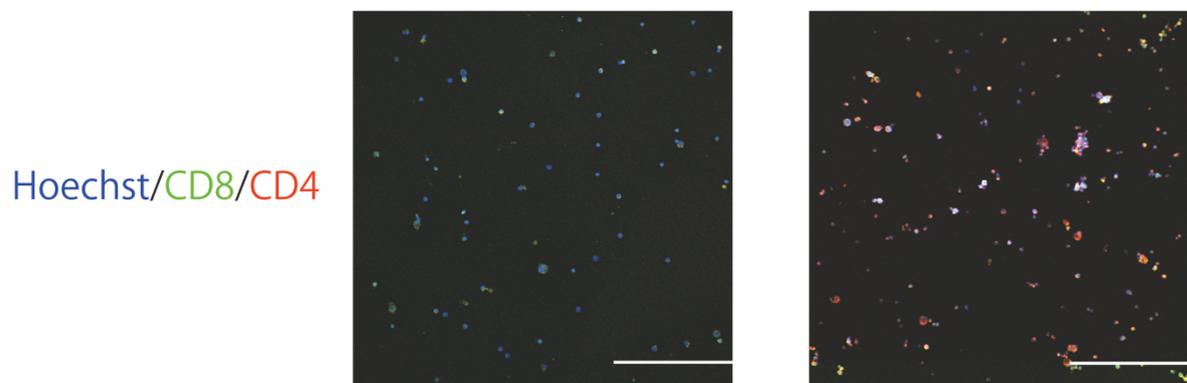
細胞傷害性アッセイの機能評価として IFN- $\gamma$  の産出量を測定した。健康ドナー由来末梢血単核細胞では IFN- $\gamma$  の産出が持続したが、胸水上清由来単核細胞では IFN- $\gamma$  の産出が減少した（図 9C）。胸水単核細胞は、末梢血単核細胞と異なり、炎症因子、ケモカインへの反応性が減弱している可能性があると考えた<sup>37</sup>。

患者末梢血と健康ドナー末梢血の両者が単核細胞から樹状細胞あるいは細胞傷害性 T 細胞に分化し、健康ドナー末梢血単核細胞で IFN- $\gamma$  の産出量は持続していることは、末梢血単核細胞を使用することでより鋭敏に細胞傷害性が検討できると考えられた。

A



B



C

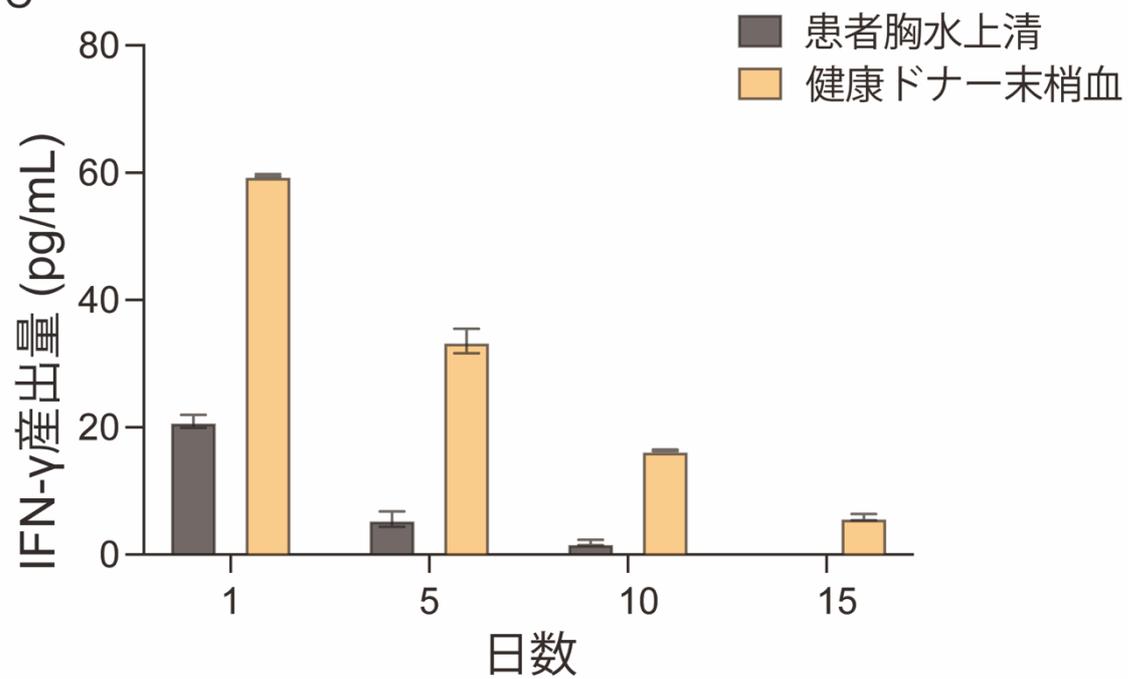


図 9 In vitro 細胞傷害性アッセイ。(A) 免疫蛍光染色結果。成熟樹状細胞マーカーCD86は

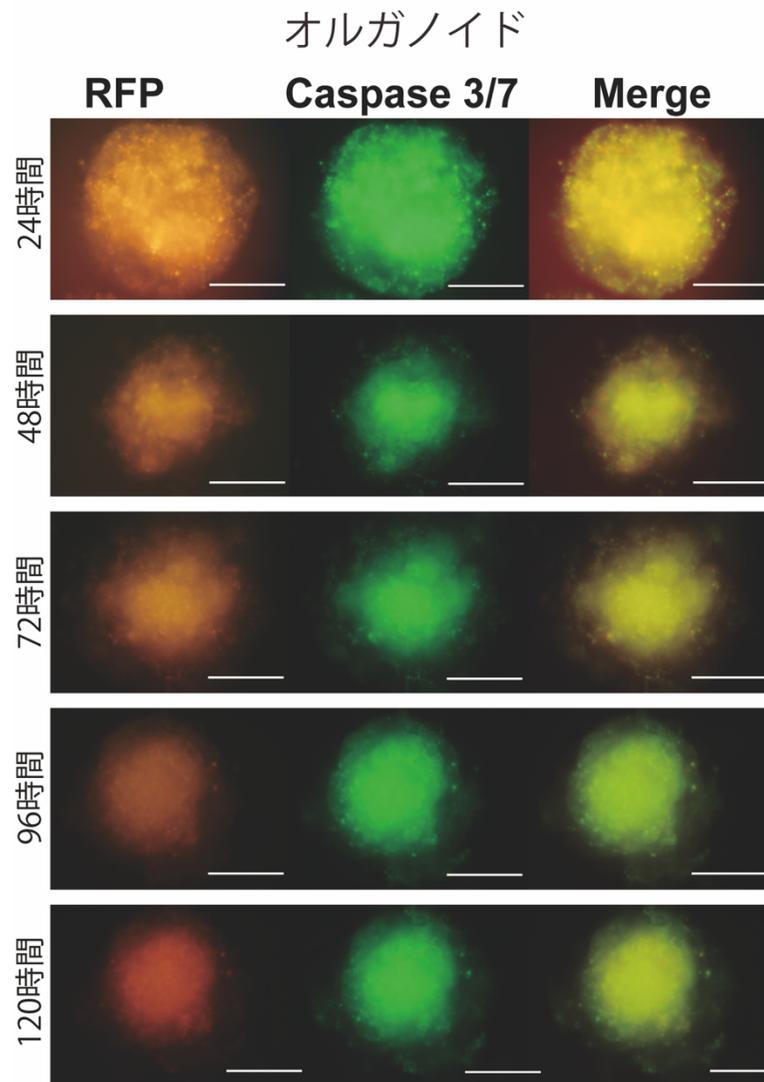
細胞表面を染色し、Hoechst 33258 は細胞核を染色する。(B) 免疫蛍光染色結果。細胞傷害性 T 細胞マーカー CD8、CD4 は細胞表面を染色し、Hoechst 33258 は細胞核を染色する。スケールバーは 200  $\mu\text{m}$  を示している。(C) ELISA を用いて患者胸水上清と健康ドナー末梢血単核細胞から誘導分化した樹状細胞と細胞傷害性 T 細胞を共培養した後の IFN- $\gamma$  産出量 (平均  $\pm$  標準偏差) の検出結果。

## 5. 細胞傷害性アッセイにおけるオルガノイドのアポトーシス評価

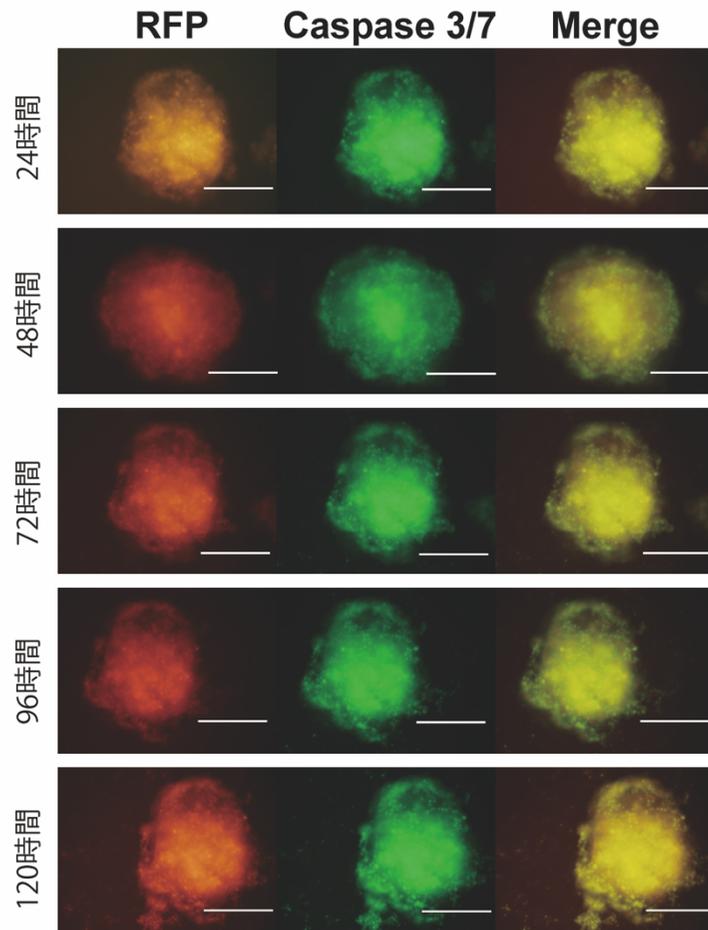
細胞傷害性アッセイにおいてオルガノイドのアポトーシスが引き起こされたことを確認するため、患者胸水上清 (Autologous MPE CTL)、患者末梢血 (Autologous CTL)、健康ドナー末梢血 (Donor CTL) の三種の単核細胞から誘導分化した樹状細胞と細胞傷害性 T 細胞を用いて、オルガノイドとそれぞれ共培養した。さらに、免疫阻害剤 nivolumab (抗 PD-1 抗体) を添加し、細胞傷害効果を検討した。

オルガノイド単体では培養 96 時間から caspase3/7 の染色において緑色の蛍光強度が強くなり、アポトーシスが認められた (図 10A)。樹状細胞と細胞傷害性 T 細胞とオルガノイドを共培養した結果では、オルガノイドはいずれも 24 時間からアポトーシス傾向が認められた (図 10B -10G)

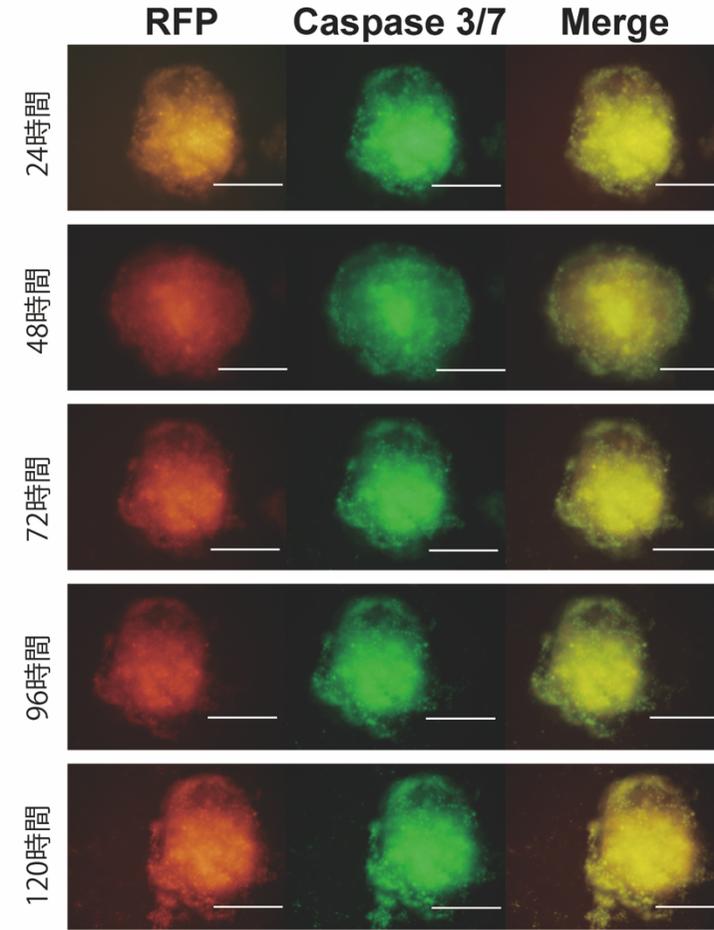
A



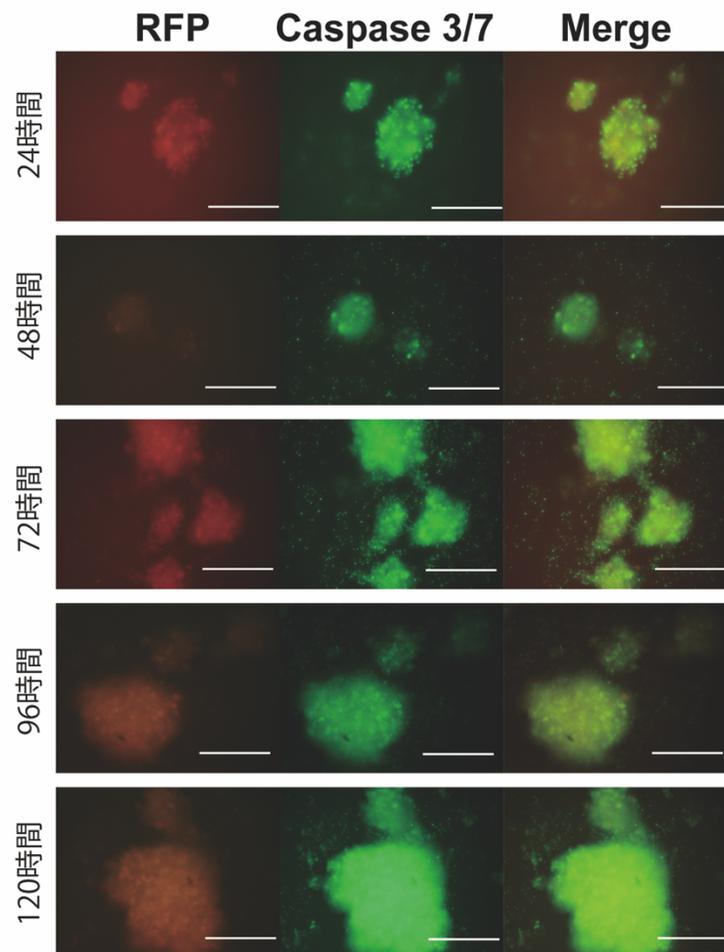
B

オルガノイド +  
胸水上清細胞傷害性アッセイ

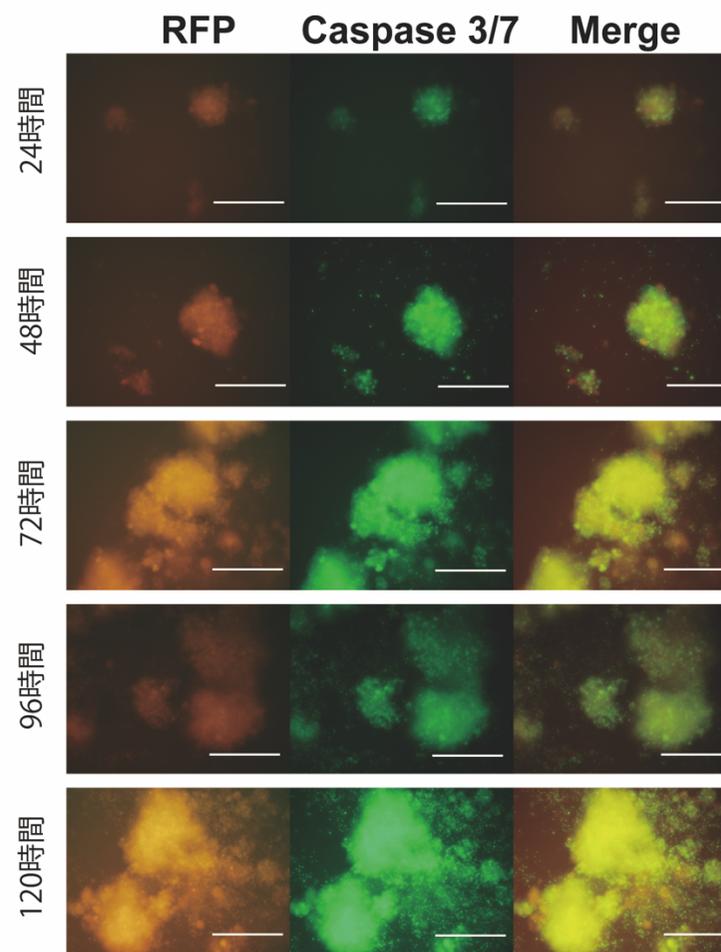
C

オルガノイド +  
胸水上清細胞傷害性アッセイ +  
Nivolumab

D

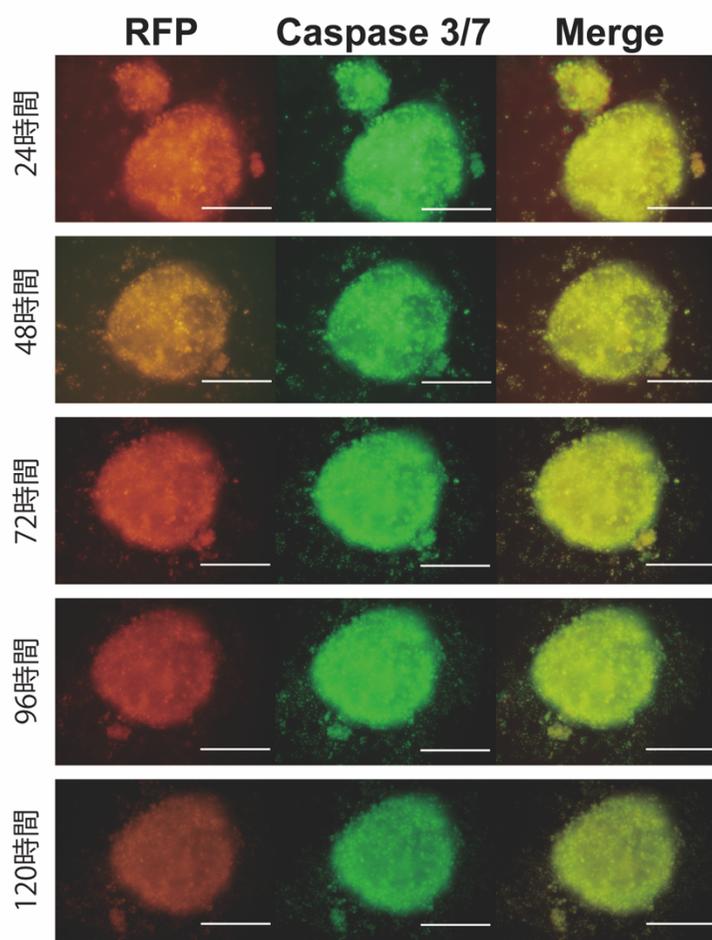
オルガノイド +  
患者末梢血細胞傷害性アッセイ

E

オルガノイド +  
末梢血細胞傷害性アッセイ +  
Nivolumab

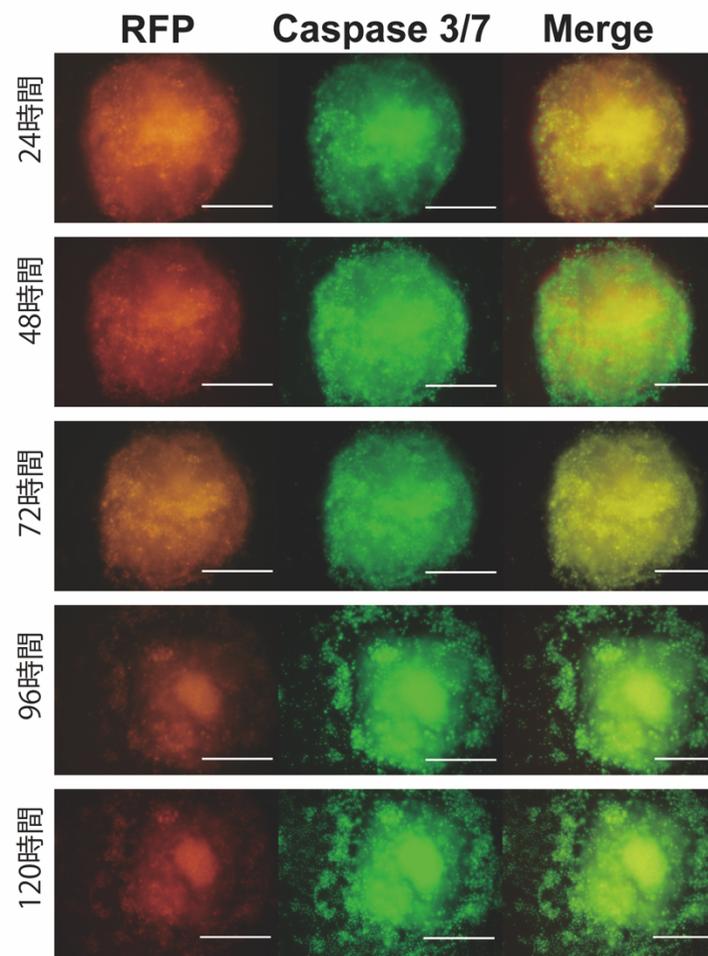
F

オルガノイド +  
健康ドナー末梢血細胞傷害性アッセイ



G

オルガノイド +  
健康ドナー末梢血細胞傷害性アッセイ +  
Nivolumab



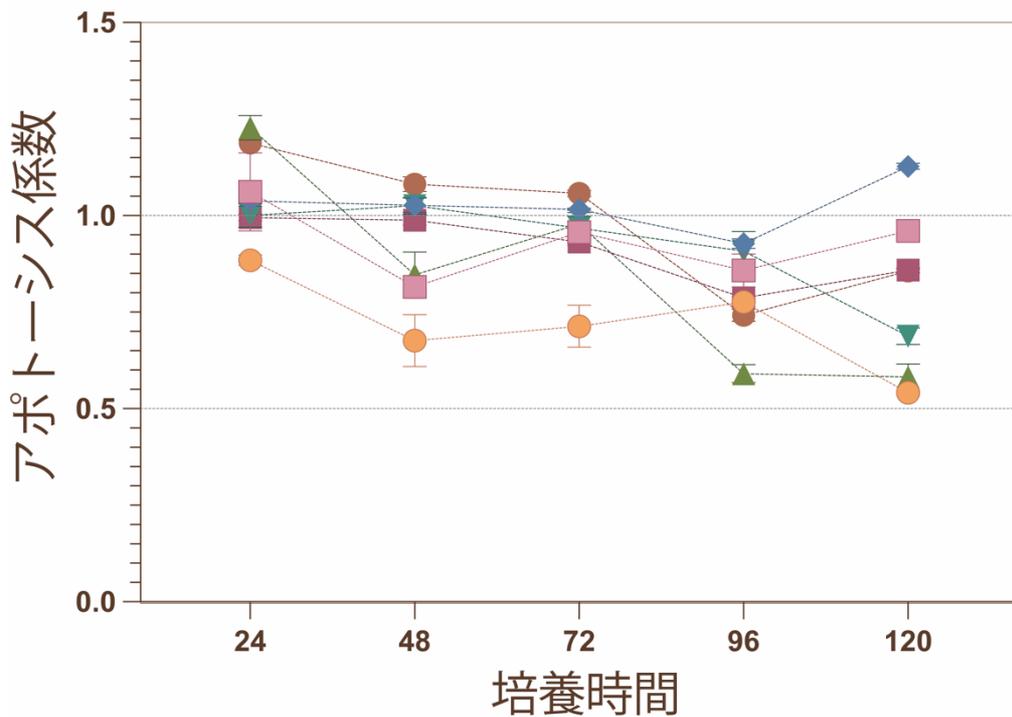
**図 10** 細胞傷害性アッセイの評価。(A) - (G) 20 倍蛍光顕微鏡で観察した 24 時間毎の写真。RFP はオルガノイドの細胞核を示し、Caspase-3/7 は細胞アポトーシス中に活性化されたカスパーゼ-3/7 を示す。スケールは 200  $\mu\text{m}$  を示す。

我々は各細胞傷害性アッセイのアポトーシス係数を比較した (図 11A)。培養 120 時間のアポトーシス係数には差があり、患者末梢血細胞傷害性アッセイと nivolumab を添加した健康ドナー末梢血細胞傷害性アッセイ (Donor CTL) において、アポトーシスが最も誘発された (図 11B)。樹状細胞が腫瘍関連抗原を認識すると、細胞傷害性 T 細胞が働き、オルガノイドのアポトーシスが促進されると示唆し、オルガノイドは腫瘍関連抗原を保有していると考えた<sup>38,39</sup>。



A

- オルガノイド
- オルガノイド+健康ドナー末梢血細胞傷害性アッセイ
- ▲ オルガノイド+健康ドナー末梢血細胞傷害性アッセイ+Nivolumab
- ▼ オルガノイド+胸水上清細胞傷害性アッセイ
- ◆ オルガノイド+胸水上清細胞傷害性アッセイ+Nivolumab
- オルガノイド+患者末梢血細胞傷害性アッセイ
- オルガノイド+患者末梢血細胞傷害性アッセイ+Nivolumab



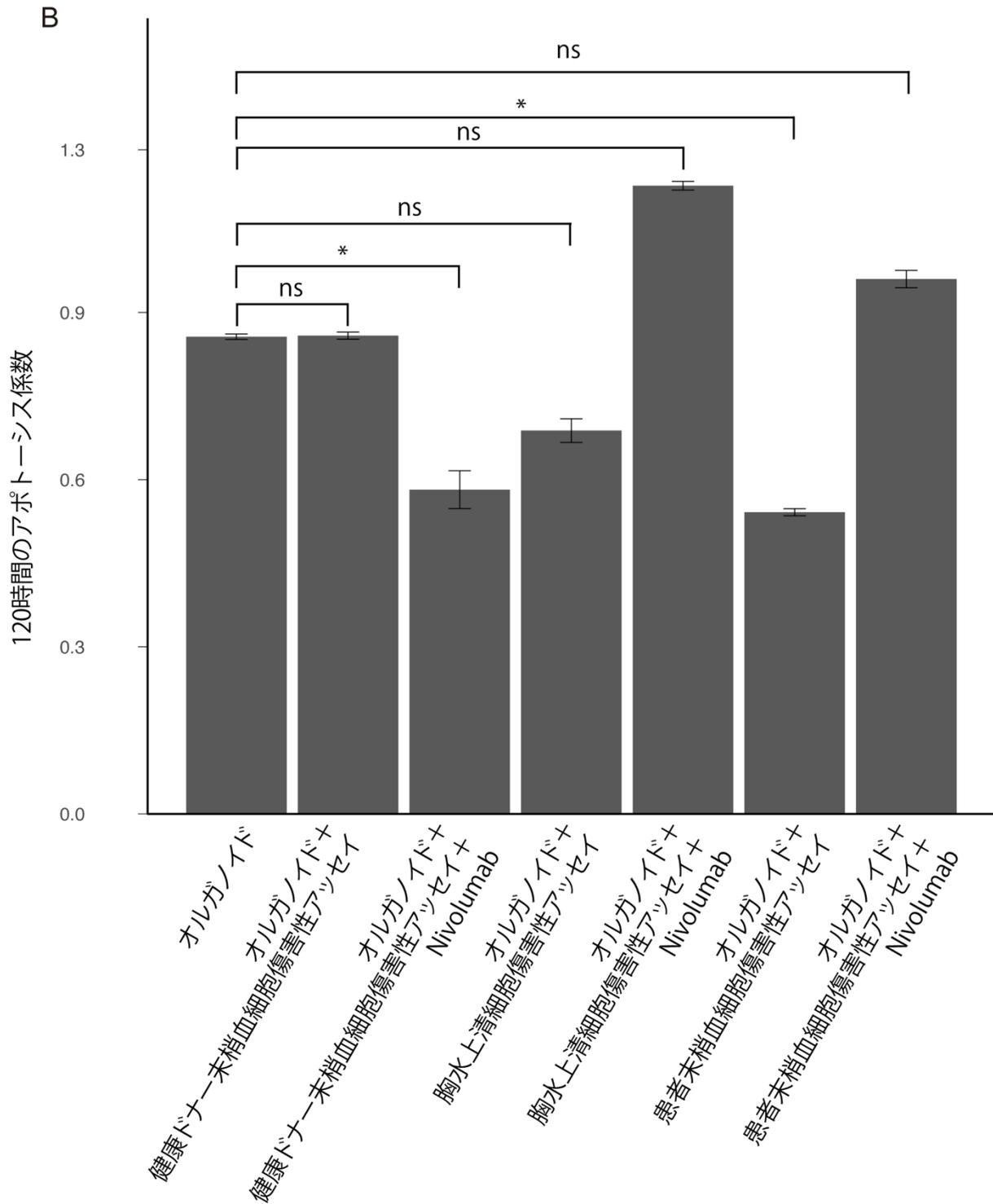


図 11 アポトーシス係数を比較した結果。(A) RFP と Caspase-3/7 のピクセルの割合を 24 時間ごとに換算した結果の比較である。(B) 120 時間のオルガノイドアポトーシス係数 (平均 ± 標準偏差) を比較した結果。\*  $P < 0.05$ 。 ns: not significant。

## 6. オルガノイド全長 cDNA を用いた mRNA ワクチンの作成と細胞への投与

オルガノイド mRNA による mRNA ワクチンの可能性を *in vitro* で検討した。オルガノイド mRNA を異なる長鎖の cDNA 断片に合成し、Gibson assembly を用いて緑色蛍光を含有するプラスミドライブラリーを構築した (図 12)。

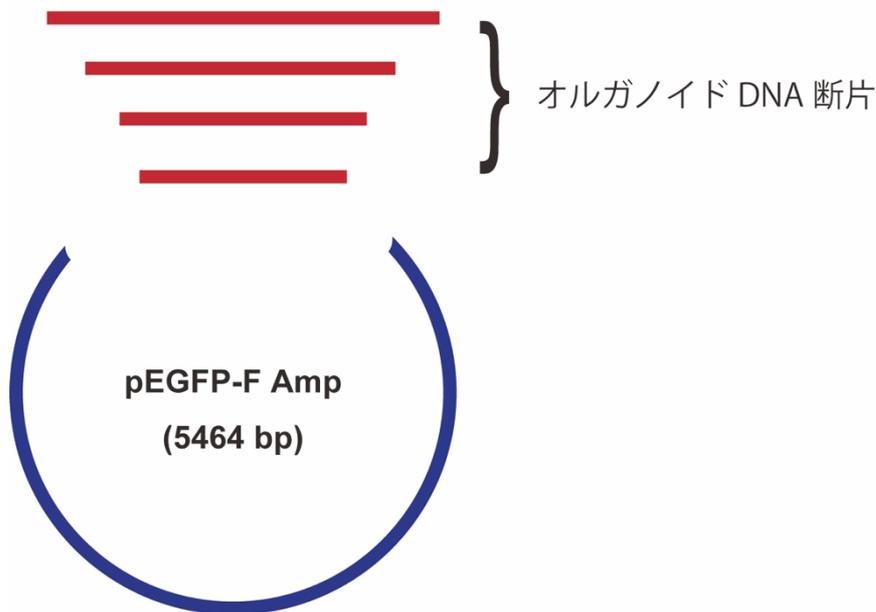


図 12 オルガノイド全長 cDNA を含有するプラスミドライブラリー構築の概念図。

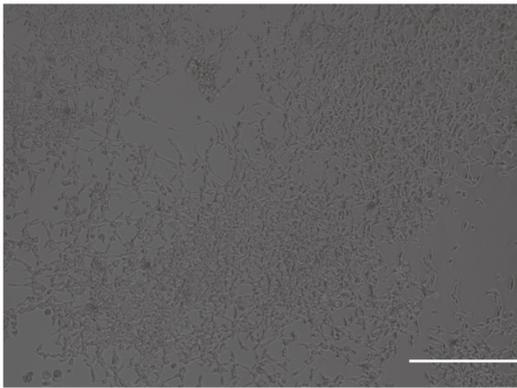
これらのプラスミドを HEK293 と 3T3-J2 細胞にトランスファクションし、蛍光顕微鏡を用いて観察した。48 時間後、大量のオルガノイド mRNA が HEK293 細胞内にトランスフェクトされ、HEK293 内に移入できることを明確した (図 13A – 13B)。微量のオルガノイド mRNA が 3T3-J2 細胞内にトランスフェクトされ、96 時間まで緑色蛍光持続的に観察で、3T3-J2 細胞内にオルガノイド mRNA が発現されていると考えた (図 13C – 13H)。オルガノイド mRNA を他細胞に導入することで腫



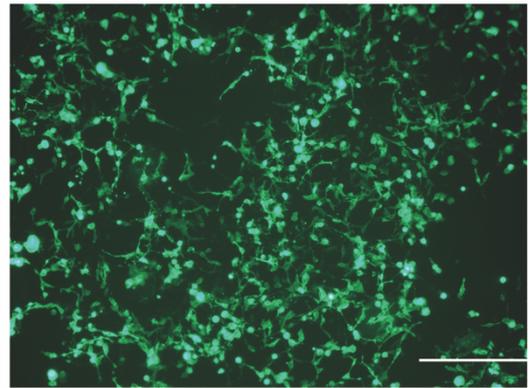
瘍関連抗原を免疫系に認識させることが可能かもしれない。



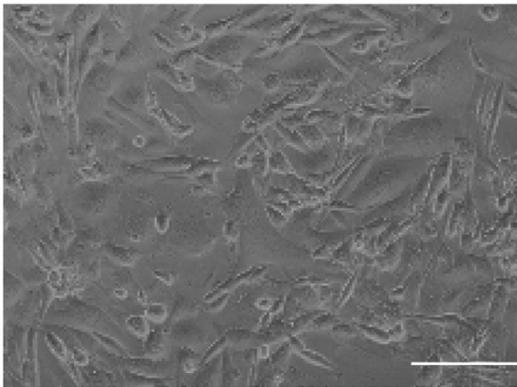
A



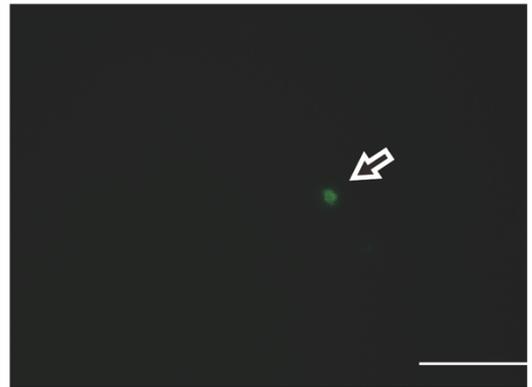
B



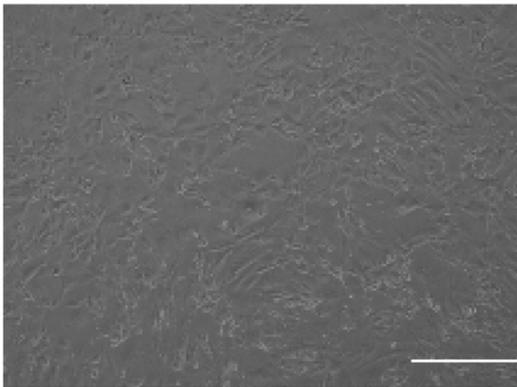
C



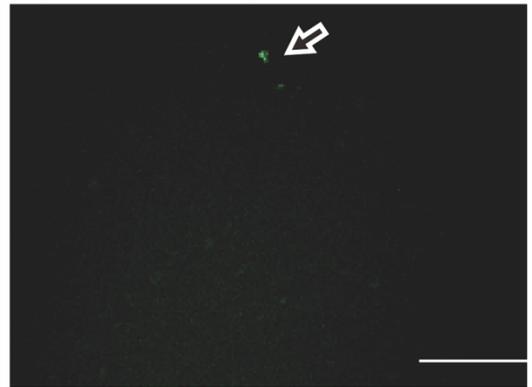
D



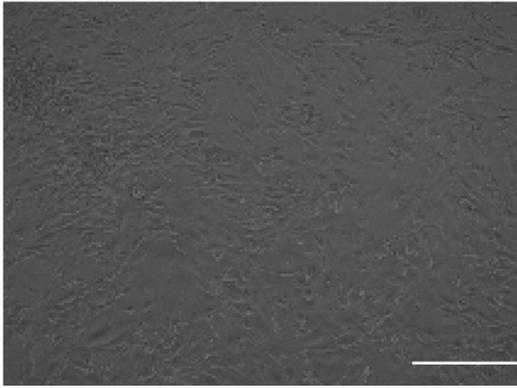
E



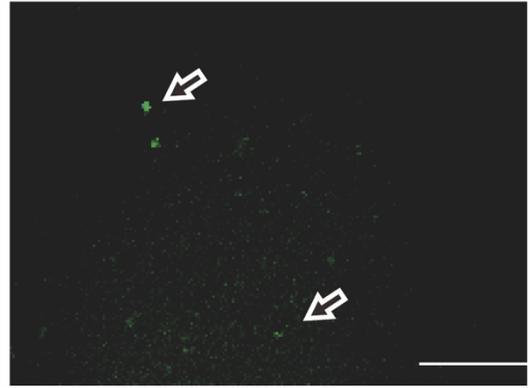
F



G



H





**図 13** オルガノイド全長 cDNA を HEK-293 と 3T3-J2 にトランスフェクトした結果。(A-B) HEK-293 にトランスフェクト 48 時間後の結果。(A) 20 倍位相差顕微鏡像、(B) 20 倍蛍光顕微鏡像、スケールバーは 100  $\mu\text{m}$  を示す。(C-F) 3T3-J2 にトランスフェクトされた 48 時間後の結果。(C) 40 倍位相差顕微鏡像、(D) 40 倍蛍光顕微鏡像、スケールバーは 200  $\mu\text{m}$  を示す。(E) 20 倍位相差顕微鏡像、(F) 20 倍蛍光顕微鏡像、スケールバーは 100  $\mu\text{m}$  を示す。(G-H) 3T3-J2 にトランスフェクトされた 96 時間後の結果。(G) 20 倍位相差顕微鏡像、(H) 20 倍蛍光顕微鏡像、スケールバーは 100  $\mu\text{m}$  を示す。矢印はトランスフェクトされたオルガノイド全長 cDNA を細胞内の位置を示す。

## 考察

近年、患者癌細胞を直接用いた癌研究が行われるようになってきた<sup>40</sup>。患者癌細胞は、生体内の状況をより近い状態で観察でき、癌に共通の変化だけでなく、個々の癌の異なる性質を検討できる優れた生体材料である<sup>41</sup>。我々は癌性胸膜炎胸水を収集、胸水癌細胞を単離し、共培養法と三次元培養法を用いた体外培養法を確立した。Feeder cell は胸膜・胸壁の機能を模倣し、癌細胞に足場を提供すると考えられる<sup>42</sup>、Matrigel matrix は、癌細胞に細胞外基質を提供すると考えられる<sup>43,44</sup>。これらを用いた培養を試みた結果、スフェロイドとオルガノイドが作成できた。スフェロイドは生体内で未分化や低分化の癌形質が見られる癌進展のモデルとして機能する可能性があり、オルガノイドは生体内で内部構造を形成しながら癌を進展する形質が見られる癌進展のモデルとして機能する可能性がある<sup>45</sup>。スフェロイドとオルガノイドはいずれも肺癌の進展、増悪、転移を *ex vivo* で検討するためのモデルになると考えられる。

作成したスフェロイドとオルガノイドを用いて RNA-sequencing を行い、患者癌細胞、スフェロイド、オルガノイドにおける遺伝子発現、シグナル伝達経路、関与する生物学的反応過程の相違を検討した。スフェロイドとオルガノイドに共通して認められた変化は細胞外基質に関与していた。細胞外基質に対する反応性は、癌細胞の局所増殖、栄養血管の形成、転移に密接に関連する<sup>46-48</sup>。細胞集団を形成するためには、細胞外基質との適切な反応が必要と考えられた。

発現が変化した遺伝子について検討した結果、スフェロイドでは炎症反応と上皮間葉系転換が減弱していたが、オルガノイドでは両者とも増強していた。これらの所見は、スフェロイドとオルガノイドは、形態、遺伝子発現、関与する生物学的反応過程が異なることを示している。Feeder cell で増殖しやすい遺伝子発現プロファイルを有する患者癌細胞ではスフェロイドが形成され、Matrigel matrix の中で増殖しやすい遺伝子発現プロファイルを有する患者癌細胞ではオルガノイドが形成されると考えられる。スフェロイドとオルガノイドの形成が相互排他的であり、両者の遺伝子発現量の変化、細胞機能、生物学的過程にも相互排他的関係であったことから、スフェロイドとオルガノイドのいずれを形成するかは、患者体内ですでに決定されている可能性がある。

本研究で使用された患者癌細胞は、非小細胞肺癌と小細胞肺癌の両方を含んでいる。非小細胞肺癌と小細胞肺癌は組織学的に異なるが、相互変換する可能性がある。一つの癌腫の中に非小細胞肺癌と小細胞肺癌両者の組織型を有する混合型小細胞癌は稀な病型ではない<sup>49</sup>。この癌腫の小細胞肺癌と非小細胞肺癌は、同じ起源となる細胞から派生している可能性がある<sup>50</sup>。したがって、我々はスフェロイド形成の元となった患者癌細胞を区別せずに、遺伝子発現プロファイルを分析した。これにより、組織学固有の特徴に影響を受けることなく、スフェロイドの形成中に共通して変化する遺伝子セットを抽出することができた。

癌細胞は、免疫系との相互作用により、生体内で変化している<sup>51</sup>。免疫反応は、

癌細胞の増殖を抑制するだけでなく、免疫応答に関与するケモカインやサイトカインによって癌細胞の増殖を促進することもある。また、癌細胞は TGF- $\beta$  を分泌して免疫細胞と相互作用することで腫瘍の成長を促進することがある<sup>52,53</sup>。TGF- $\beta$  は多彩な機能を有する増殖因子である。TGF- $\beta$  シグナル伝達系に関与することで、癌細胞は免疫環境を修飾することができ、癌細胞が容易に増殖できる細胞外環境を保持していると考えられる<sup>36,54</sup>。スフェロイド、オルガノイドと免疫細胞の相互作用を検討することで腫瘍の局所拡大と遠隔転移に関する遺伝子および遺伝子セットを調節するシグナル伝達経路を解明できる可能性がある。

現在、オルガノイドは腫瘍の体外モデルとして、多くの研究で使用されている<sup>55,56</sup>。多くのオルガノイドは切除された組織や liquid biopsy から作成されている。我々の培養法を用いれば、胸腔内に浮遊増殖している癌細胞からオルガノイドが作成可能であり、他の体腔液の癌細胞にも応用できると考えられる。オルガノイドを用いて移植腫を速やかに作成すれば、マウスモデルによる検討も行える<sup>57</sup>。さらに、biosensor や microfluidic に使用するなど、広い範囲の応用も期待できる<sup>58,59</sup>。

我々は、同一患者由来の末梢血も同時採取し、末梢血単核細胞を単離した。これらの単核細胞を用いて細胞傷害性アッセイを作成し、癌細胞と免疫細胞の相互作用を再現することで、抗腫瘍治療法を検討できると考えられる。オルガノイドが免疫細胞から攻撃を受けたことは、オルガノイドが腫瘍特異的突然変異を保有していることを示唆している。その場合、腫瘍 neoantigen 負荷を有すると推定でき、腫瘍関



連抗原を含有することが想定される<sup>39</sup>。mRNA ワクチン技術を応用し、オルガノイド mRNA を細胞に移入することで、細胞性免疫を増強できるかもしれない。さらに、この方法を用いることによって、腫瘍特異的な遺伝子変異を標的とした腫瘍の個別化ワクチン治療を確立することが期待できる。本研究は、癌性胸膜炎を起点とし、新たな癌治療につながる新たな研究を開く基礎となるかもしれない。



## 引用文献

1. Asciak, R. & Rahman, N. M. Malignant Pleural Effusion: From Diagnostics to Therapeutics. *Clin. Chest Med.* **39**, 181–193 (2018).
2. Skok, K., Hladnik, G., Grm, A. & Crnjac, A. Malignant Pleural Effusion and Its Current Management: A Review. *Medicina (Mex.)* **55**, 490 (2019).
3. Tissot, C., Gay, P., Brun, C. & Froudarakis, M. E. Novel insights into the systemic treatment of lung cancer malignant pleural effusion. *Clin. Respir. J.* **13**, 131–138 (2019).
4. Zarogoulidis, P., Chatzaki, E., Hohenforst-Schmidt, W., Goldberg, E. P., Galaktidou, G., Kontakiotis, T., Karamanos, N. & Zarogoulidis, K. Management of malignant pleural effusion by suicide gene therapy in advanced stage lung cancer: a case series and literature review. *Cancer Gene Ther.* **19**, 593–600 (2012).
5. Ben-David, U., Siranosian, B., Ha, G., Tang, H., Oren, Y., Hinohara, K., Strathdee, C. A., Dempster, J., Lyons, N. J., Burns, R., Nag, A., Kugener, G., Cimini, B., Tsvetkov, P., Maruvka, Y. E., O'Rourke, R., Garrity, A., Tubelli, A. A., Bandopadhyay, P., Tsherniak, A., Vazquez, F., Wong, B., Birger, C., Ghandi, M., Thorner, A. R., Bittker, J. A., Meyerson, M., Getz, G., Beroukhi, R. & Golub, T. R. Genetic and transcriptional evolution alters cancer cell line drug response. *Nature* **560**, 325–330 (2018).
6. Gazdar, A. F., Gao, B. & Minna, J. D. Lung cancer cell lines: Useless artifacts or invaluable tools for medical science? *Lung Cancer Amst. Neth.* **68**, 309–318 (2010).



7. Koshkin, S., Danilova, A., Raskin, G., Petrov, N., Bajenova, O., O'Brien, S. J., Tomilin, A. & Tolkunova, E. Primary cultures of human colon cancer as a model to study cancer stem cells. *Tumour Biol. J. Int. Soc. Oncodevelopmental Biol. Med.* **37**, 12833–12842 (2016).
  8. Namekawa, T., Ikeda, K., Horie-Inoue, K. & Inoue, S. Application of Prostate Cancer Models for Preclinical Study: Advantages and Limitations of Cell Lines, Patient-Derived Xenografts, and Three-Dimensional Culture of Patient-Derived Cells. *Cells* **8**, 74 (2019).
  9. Tsai, S., McOlash, L., Palen, K., Johnson, B., Duris, C., Yang, Q., Dwinell, M. B., Hunt, B., Evans, D. B., Gershan, J. & James, M. A. Development of primary human pancreatic cancer organoids, matched stromal and immune cells and 3D tumor microenvironment models. *BMC Cancer* **18**, 335 (2018).
  10. Surina, Sata, M., Tanggis, Fujiwara, S., Hisata, S., Suzuki, T., Mato, N. & Hagiwara, K. Cultivation of cancer cells in malignant pleural effusion and their use in a vascular endothelial growth factor study. *Ann. Cancer Res. Ther.* **28**, 111–117 (2020).
  11. Gao, J., Song, T., Che, D., Li, C., Jiang, J., Pang, J., Yang, Y., Goma, null & Li, P. The effect of bisphenol a exposure onto endothelial and decidualized stromal cells on regulation of the invasion ability of trophoblastic spheroids in in vitro co-culture model. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **516**, 506–514 (2019).
-



12. Haridas, P., Penington, C. J., McGovern, J. A., McElwain, D. L. S. & Simpson, M. J. Quantifying rates of cell migration and cell proliferation in co-culture barrier assays reveals how skin and melanoma cells interact during melanoma spreading and invasion. *J. Theor. Biol.* **423**, 13–25 (2017).
13. Kim, S.-A., Lee, E. K. & Kuh, H.-J. Co-culture of 3D tumor spheroids with fibroblasts as a model for epithelial-mesenchymal transition in vitro. *Exp. Cell Res.* **335**, 187–196 (2015).
14. Dost, A. F. M., Moye, A. L., Vedaie, M., Tran, L. M., Fung, E., Heinze, D., Villacorta-Martin, C., Huang, J., Hekman, R., Kwan, J. H., Blum, B. C., Louie, S. M., Rowbotham, S. P., Sainz de Aja, J., Piper, M. E., Bhetariya, P. J., Bronson, R. T., Emili, A., Mostoslavsky, G., Fishbein, G. A., Wallace, W. D., Krysan, K., Dubinett, S. M., Yanagawa, J., Kotton, D. N. & Kim, C. F. Organoids Model Transcriptional Hallmarks of Oncogenic KRAS Activation in Lung Epithelial Progenitor Cells. *Cell Stem Cell* **27**, 663-678.e8 (2020).
15. Tan, Q., Choi, K. M., Sicard, D. & Tschumperlin, D. J. Human airway organoid engineering as a step toward lung regeneration and disease modeling. *Biomaterials* **113**, 118–132 (2017).
16. Yan, H. H. N., Siu, H. C., Law, S., Ho, S. L., Yue, S. S. K., Tsui, W. Y., Chan, D., Chan, A. S., Ma, S., Lam, K. O., Bartfeld, S., Man, A. H. Y., Lee, B. C. H., Chan, A. S. Y., Wong, J. W. H., Cheng, P. S. W., Chan, A. K. W., Zhang, J., Shi, J., Fan, X., Kwong, D. L.



- W., Mak, T. W., Yuen, S. T., Clevers, H. & Leung, S. Y. A Comprehensive Human Gastric Cancer Organoid Biobank Captures Tumor Subtype Heterogeneity and Enables Therapeutic Screening. *Cell Stem Cell* **23**, 882-897.e11 (2018).
17. Surina, Tanggis, Suzuki, T., Hisata, S., Fujita, K., Fujiwara, S., Liu, F., Fukushima, N., Suzuki, T., Mato, N. & Hagiwara, K. Patient-derived spheroids and patient-derived organoids simulate evolutions of lung cancer. *Heliyon* e13829 (2023).  
doi:10.1016/j.heliyon.2023.e13829
18. Sureda, M., Mata, J. J., Catalán, A., Escudero, V., Martínez-Navarro, E. & Rebollo, J. Therapeutic drug monitoring of nivolumab in routine clinical practice. A pilot study. *Farm. Hosp.* **44**, 81–86 (2020).
19. Basil, M. C., Cardenas-Diaz, F. L., Kathiriya, J. J., Morley, M. P., Carl, J., Brumwell, A. N., Katzen, J., Slovik, K. J., Babu, A., Zhou, S., Kremp, M. M., McCauley, K. B., Li, S., Planer, J. D., Hussain, S. S., Liu, X., Windmueller, R., Ying, Y., Stewart, K. M., Oyster, M., Christie, J. D., Diamond, J. M., Engelhardt, J. F., Cantu, E., Rowe, S. M., Kotton, D. N., Chapman, H. A. & Morrissey, E. E. Human distal airways contain a multipotent secretory cell that can regenerate alveoli. *Nature* **604**, 120–126 (2022).
20. Reynolds, S. D., Reynolds, P. R., Pryhuber, G. S., Finder, J. D. & Stripp, B. R. Secretoglobins SCGB3A1 and SCGB3A2 define secretory cell subsets in mouse and human airways. *Am. J. Respir. Crit. Care Med.* **166**, 1498–1509 (2002).
-



21. Chen, L.-H., Liu, J.-F., Lu, Y.-, He, X.-Y., Zhang, C.- & Zhou, H.-H. Complement C1q (C1qA, C1qB, and C1qC) May Be a Potential Prognostic Factor and an Index of Tumor Microenvironment Remodeling in Osteosarcoma. *Front. Oncol.* **11**, 642144 (2021).
  22. Lakshmanan, I., Rachagani, S., Hauke, R., Krishn, S. R., Paknikar, S., Seshacharyulu, P., Karmakar, S., Nimmakayala, R. K., Kaushik, G., Johansson, S. L., Carey, G. B., Ponnusamy, M. P., Kaur, S., Batra, S. K. & Ganti, A. K. MUC5AC interactions with integrin  $\beta$ 4 enhances the migration of lung cancer cells through FAK signaling. *Oncogene* **35**, 4112–4121 (2016).
  23. Rico, S. D., Mahnken, M., Büscheck, F., Dum, D., Luebke, A. M., Kluth, M., Hube-Magg, C., Hinsch, A., Höflmayer, D., Möller-Koop, C., Fraune, C., Möller, K., Menz, A., Bernreuther, C., Jacobsen, F., Lebok, P., Clauditz, T. S., Sauter, G., Uhlig, R., Wilczak, W., Simon, R., Steurer, S., Minner, S., Burandt, E., Krech, T. & Marx, A. H. MUC5AC Expression in Various Tumor Types and Nonneoplastic Tissue: A Tissue Microarray Study on 10 399 Tissue Samples. *Technol. Cancer Res. Treat.* **20**, 15330338211043328 (2021).
  24. Hollmén, M., Figueiredo, C. R. & Jalkanen, S. New tools to prevent cancer growth and spread: a ‘Clever’ approach. *Br. J. Cancer* **123**, 501–509 (2020).
  25. Kawasaki, T. & Kawai, T. Toll-like receptor signaling pathways. *Front. Immunol.* **5**, 461 (2014).
  26. Wu, Z., Zhang, Z., Lei, Z. & Lei, P. CD14: Biology and role in the pathogenesis of
-



- disease. *Cytokine Growth Factor Rev.* **48**, 24–31 (2019).
27. Esteves, P., Dard, L., Brillac, A., Hubert, C., Sarlak, S., Rousseau, B., Dumon, E., Izotte, J., Bonneu, M., Lacombe, D., Dupuy, J.-W., Amoedo, N. & Rossignol, R. Nuclear control of lung cancer cells migration, invasion and bioenergetics by eukaryotic translation initiation factor 3F. *Oncogene* **39**, 617–636 (2020).
28. Yuan, L., Wu, X., Zhang, L., Yang, M., Wang, X., Huang, W., Pan, H., Wu, Y., Huang, J., Liang, W., Li, J., Zhu, X., Wang, S., Guan, J. & Liu, L. SFTPA1 is a potential prognostic biomarker correlated with immune cell infiltration and response to immunotherapy in lung adenocarcinoma. *Cancer Immunol. Immunother. CII* **71**, 399–415 (2022).
29. Smits, M., Wurdinger, T., van het Hof, B., Drexhage, J. A. R., Geerts, D., Wesseling, P., Noske, D. P., Vandertop, W. P., de Vries, H. E. & Reijerkerk, A. Myc-associated zinc finger protein (MAZ) is regulated by miR-125b and mediates VEGF-induced angiogenesis in glioblastoma. *FASEB J. Off. Publ. Fed. Am. Soc. Exp. Biol.* **26**, 2639–2647 (2012).
30. Fang, Y.-J., Lu, Z.-H., Wang, F., Wu, X.-J., Li, L.-R., Zhang, L.-Y., Pan, Z.-Z. & Wan, D.-S. Prognostic impact of ER $\beta$  and MMP7 expression on overall survival in colon cancer. *Tumour Biol. J. Int. Soc. Oncodevelopmental Biol. Med.* **31**, 651–658 (2010).
31. Zhang, Q., Liu, S., Parajuli, K. R., Zhang, W., Zhang, K., Mo, Z., Liu, J., Chen, Z.,
-



- Yang, S., Wang, A. R., Myers, L. & You, Z. Interleukin-17 promotes prostate cancer via MMP7-induced epithelial-to-mesenchymal transition. *Oncogene* **36**, 687–699 (2017).
32. Neagu, M., Zipeto, D. & Popescu, I. D. Inflammation in Cancer: Part of the Problem or Part of the Solution? *J. Immunol. Res.* **2019**, 5403910 (2019).
33. Nishida, N., Yano, H., Nishida, T., Kamura, T. & Kojiro, M. Angiogenesis in Cancer. *Vasc. Health Risk Manag.* **2**, 213–219 (2006).
34. Roche, J. The Epithelial-to-Mesenchymal Transition in Cancer. *Cancers* **10**, 52 (2018).
35. Hänzelmann, S., Castelo, R. & Guinney, J. GSEA: gene set variation analysis for microarray and RNA-seq data. *BMC Bioinformatics* **14**, 7 (2013).
36. Yang, L., Pang, Y. & Moses, H. L. TGF-beta and immune cells: an important regulatory axis in the tumor microenvironment and progression. *Trends Immunol.* **31**, 220–227 (2010).
37. Luo, L., Deng, S., Tang, W., Hu, X., Yin, F., Ge, H., Tang, J., Liao, Z., Feng, J., Li, X. & Mo, B. Monocytes subtypes from pleural effusion reveal biomarker candidates for the diagnosis of tuberculosis and malignancy. *J. Clin. Lab. Anal.* **36**, e24579 (2022).
38. Fiedler, K., Lazzaro, S., Lutz, J., Rauch, S. & Heidenreich, R. mRNA Cancer Vaccines. *Recent Results Cancer Res. Fortschritte Krebsforsch. Progres Dans Rech. Sur Cancer* **209**, 61–85 (2016).
-



39. Wang, P., Chen, Y. & Wang, C. Beyond Tumor Mutation Burden: Tumor Neoantigen Burden as a Biomarker for Immunotherapy and Other Types of Therapy. *Front. Oncol.* **11**, 672677 (2021).
40. Amini, L., Silbert, S. K., Maude, S. L., Nastoupil, L. J., Ramos, C. A., Brentjens, R. J., Sauter, C. S., Shah, N. N. & Abou-El-Enain, M. Preparing for CAR T cell therapy: patient selection, bridging therapies and lymphodepletion. *Nat. Rev. Clin. Oncol.* **19**, 342–355 (2022).
41. Yu, L., Li, Z., Mei, H., Li, W., Chen, D., Liu, L., Zhang, Z., Sun, Y., Song, F., Chen, W. & Huang, W. Patient-derived organoids of bladder cancer recapitulate antigen expression profiles and serve as a personal evaluation model for CAR-T cells in vitro. *Clin. Transl. Immunol.* **10**, e1248 (2021).
42. Hong, H. K., Pyo, D. H., Kim, T. W., Yun, N. H., Lee, Y. S., Song, S. J., Lee, W. Y. & Cho, Y. B. Efficient primary culture model of patient-derived tumor cells from colorectal cancer using a Rho-associated protein kinase inhibitor and feeder cells. *Oncol. Rep.* **42**, 2029–2038 (2019).
43. Anguiano, M., Morales, X., Castilla, C., Pena, A. R., Ederra, C., Martínez, M., Ariz, M., Esparza, M., Amaveda, H., Mora, M., Movilla, N., Aznar, J. M. G., Cortés-Domínguez, I. & Ortiz-de-Solorzano, C. The use of mixed collagen-Matrigel matrices of increasing complexity recapitulates the biphasic role of cell adhesion in cancer cell migration: ECM
-



sensing, remodeling and forces at the leading edge of cancer invasion. *PloS One* **15**, e0220019 (2020).

44. Ruud, K. F., Hiscox, W. C., Yu, I., Chen, R. K. & Li, W. Distinct phenotypes of cancer cells on tissue matrix gel. *Breast Cancer Res.* **22**, 82 (2020).

45. Hart, I. R. & Easty, D. Tumor cell progression and differentiation in metastasis. *Semin. Cancer Biol.* **2**, 87–95 (1991).

46. Jiang, Y., Zhang, H., Wang, J., Liu, Y., Luo, T. & Hua, H. Targeting extracellular matrix stiffness and mechanotransducers to improve cancer therapy. *J. Hematol. Oncol. J Hematol Oncol* **15**, 34 (2022).

47. Najafi, M., Farhood, B. & Mortezaee, K. Extracellular matrix (ECM) stiffness and degradation as cancer drivers. *J. Cell. Biochem.* **120**, 2782–2790 (2019).

48. Pickup, M. W., Mouw, J. K. & Weaver, V. M. The extracellular matrix modulates the hallmarks of cancer. *EMBO Rep.* **15**, 1243–1253 (2014).

49. Wagner, P. L., Kitabayashi, N., Chen, Y.-T. & Saqi, A. Combined small cell lung carcinomas: genotypic and immunophenotypic analysis of the separate morphologic components. *Am. J. Clin. Pathol.* **131**, 376–382 (2009).

50. Leonetti, A., Minari, R., Mazzaschi, G., Gnetti, L., La Monica, S., Alfieri, R., Campanini, N., Verzè, M., Olivani, A., Ventura, L. & Tiseo, M. Small Cell Lung Cancer Transformation as a Resistance Mechanism to Osimertinib in Epidermal Growth Factor



Receptor-Mutated Lung Adenocarcinoma: Case Report and Literature Review. *Front. Oncol.*

**11**, 642190 (2021).

51. Liu, Y. & Cao, X. Immunosuppressive cells in tumor immune escape and metastasis.

*J. Mol. Med. Berl. Ger.* **94**, 509–522 (2016).

52. Gajewski, T. F., Schreiber, H. & Fu, Y.-X. Innate and adaptive immune cells in the

tumor microenvironment. *Nat. Immunol.* **14**, 1014–1022 (2013).

53. Quatromoni, J. G. & Eruslanov, E. Tumor-associated macrophages: function,

phenotype, and link to prognosis in human lung cancer. *Am. J. Transl. Res.* **4**, 376–389

(2012).

54. Hao, Y., Baker, D. & Ten Dijke, P. TGF- $\beta$ -Mediated Epithelial-Mesenchymal

Transition and Cancer Metastasis. *Int. J. Mol. Sci.* **20**, 2767 (2019).

55. Guillen, K. P., Fujita, M., Butterfield, A. J., Scherer, S. D., Bailey, M. H., Chu, Z.,

DeRose, Y. S., Zhao, L., Cortes-Sanchez, E., Yang, C.-H., Toner, J., Wang, G., Qiao, Y.,

Huang, X., Greenland, J. A., Vahrenkamp, J. M., Lum, D. H., Factor, R. E., Nelson, E. W.,

Matsen, C. B., Poretta, J. M., Rosenthal, R., Beck, A. C., Buys, S. S., Vaklavas, C., Ward, J.

H., Jensen, R. L., Jones, K. B., Li, Z., Oesterreich, S., Dobrolecki, L. E., Pathi, S. S., Woo, X.

Y., Berrett, K. C., Wadsworth, M. E., Chuang, J. H., Lewis, M. T., Marth, G. T., Gertz, J.,

Varley, K. E., Welm, B. E. & Welm, A. L. A human breast cancer-derived xenograft and

organoid platform for drug discovery and precision oncology. *Nat. Cancer* **3**, 232–250



(2022).

56. LeSavage, B. L., Suhar, R. A., Broguiere, N., Lutolf, M. P. & Heilshorn, S. C. Next-generation cancer organoids. *Nat. Mater.* **21**, 143–159 (2022).

57. Bleijs, M., van de Wetering, M., Clevers, H. & Drost, J. Xenograft and organoid model systems in cancer research. *EMBO J.* **38**, e101654 (2019).

58. Calejo, I., Heinrich, M. A., Zambito, G., Mezzanotte, L., Prakash, J. & Moreira Teixeira, L. Advancing Tumor Microenvironment Research by Combining Organs-on-Chips and Biosensors. *Adv. Exp. Med. Biol.* **1379**, 171–203 (2022).

59. Liu, S., Wang, T., Li, S. & Wang, X. Application Status of Sacrificial Biomaterials in 3D Bioprinting. *Polymers* **14**, 2182 (2022).



## 謝辞

本研究の遂行にあたり、終始暖かく見守って下さり、ご指導ご鞭撻をいただきました自治医科大学大学院医学研究科循環器・呼吸器疾患学呼吸器内科学 萩原弘一教授に心より感謝します。

基礎実験手法を終始温かく指導していただいた自治医科大学呼吸器内科 藤原智美 技官、タンギス 博士に感謝の意を表します。

免疫染色にご協力いただきました自治医科大学附属病院病理診断部 福嶋敬宜教授と鈴木智子 主任 技師に謹んで感謝の意を表します。免疫蛍光にご協力いただきました自治医科大学組織学 幸喜富 先生に深く感謝いたします。

次世代シーケンサーによる遺伝子解析において大変お世話になりました内モンゴル医科大学附属病院臨床研究センター Fangyuan Liu 先生に深く感謝申し上げます。

プラスミド構築実験にご指導をいただいた自治医科大学医学部感染・免疫学講座細菌学部門 崔龍洙 教授、相羽由詞 講師、そしてサポートしていただいた同研究室の Li Fengyu 氏に感謝いたします。

最後になりましたが、研究室での生活において様々なご助言、ご協力を賜りました自治医科大学大学院医学研究科循環器・呼吸器疾患学呼吸器内科学に所属している全ての方々に深く感謝致します。