

第14回 In vivo 実験医学シンポジウム

抗がん剤開発における PDXモデル

オーガナイザー

古賀 宣勝

国立がん研究センター 先端医療開発センター

抄録集

PDXモデルのOverview

PDXモデルの利活用に向けた調査研究

古賀 宣勝 国立がん研究センター 先端医療開発センター 研究企画推進部門

第1部 PDXモデルの頒布

実中研樹立CIEA-PDX

鈴木 雅実 実験動物中央研究所 トランスレーショナルリサーチ部門

福島医薬品関連産業支援拠点化事業で開発した
Patient-derived xenograftモデルであるF-PDX®のご紹介

高木 基樹 福島県立医科大学医療・産業トランスレーショナルリサーチセンター
福島医大トランスレーショナルリサーチ機構

創薬開発研究におけるJ-PDXライブラリーの利活用

柳下 薫寛 国立がん研究センター研究所 分子薬理研究分野

第2部 PDXモデルの使用

がんに対するワクチン・T細胞療法の開発におけるPDXの利用

中面 哲也 国立がん研究センター 先端医療開発センター 免疫療法開発分野

PDX由来細胞株を用いたオルガノイドの特徴とその活用

川合 重人 中外製薬株式会社 トランスレーショナルリサーチ本部 医科学薬理部

PDXを用いたがん — 間質相互作用の標的探索 —

石川 俊平 東京大学 医学部・大学院医学系研究科 衛生学教室

悪性脳腫瘍のprecision medicineの
実現を支援するPDXライブラリー構築

— 関西中枢神経腫瘍分子診断ネットワークの試み —

金村 米博 大阪医療センター 臨床研究センター先進医療研究開発部



2022 **11/24** 木

13:00~17:35 シンポジウム

18:00~19:30 懇親会

会場 学士会館210号室 (千代田区神田錦町3-28)

定員 150名

PDXモデルの利活用に向けた調査研究

古賀 宣勝

国立がん研究センター
先端医療開発センター 研究企画推進部門

がん薬物療法の発展にはがん患者由来のがん細胞（細胞株）と、それらのがん細胞株をヌードマウスなどの免疫不全マウスへ移植したCDX（cell line-derived xenograft）モデルによるものが大きい。しかし、継代数を重ね本来の生物学的特性を失った細胞株が使用されたりCDXモデルはがん細胞が豊富でがん間質細胞が少なかったりするため、臨床試験結果の予測には不向きなモデルと考えられている。一方で、がん組織全体を免疫不全マウスへ移植しヒトのがん微小環境を再現したPDX（patient-derived xenograft）モデルの重要性が増している。多くの期待が寄せられ、メリットがあると思われるPDXモデルは基礎的な論文でも散見され一般化されつつあるが、品質管理や品質保証については一定の基準がなく貴重なPDXモデルが医薬品開発に利活用されるための課題や問題点は明らかとなっていない。そこで日本医療研究開発機構（AMED）の医薬品等規制調和・評価研究事業「Patient-derived xenograft（PDX）モデルの利活用に向けた課題整理に関する調査研究（AMED-PDX調査研究）」の研究プロジェクトの一環として、「Patient-derived xenograft（PDX）モデルに関するアンケート調査」を実施した。アンケート結果を踏まえて抗がん剤開発においてPDXモデルが利活用されるためには、以下の提案を行う。

- a) 免疫不全マウスに未知の微生物感染があるかもしれない患者由来組織を移植したPDXモデルでは、微生物学的にコントロールされたSPF環境下でありながら排気側にHEPAフィルターを設置した陰圧管理の飼育ラックでの管理を推奨する。ただし、感染陰性が確認されれば、ヒトがん細胞を移植したCDXモデルと同程度の管理で構わない。
- b) PDXモデル作製に際し、標準作業手順書を作成し、最低でも記録すべき情報を適切に管理できるような体制が必要である。
- c) 病理組織学的特徴など品質管理が適切に実施されれば一般的には10継代以降のPDXモデルも使用可能である。
- d) PBMCやHSCを移入されたヒト化PDXモデルは、免疫関連抗がん剤の開発など一部の抗がん剤開発においては有望なモデルである。ただし、現状のヒト化PDXモデルだけでは不十分な部分もあり、今後の開発改良を期待したい。
- e) 抗がん剤開発におけるPDXモデルは薬効薬理試験がメインであるが、創薬標的分子の同定や発症メカニズムなど基礎的な研究にも応用可能である。
- f) 研究者が使用可能な日本人由来PDXライブラリが将来に渡って安定的に供給できる体制を構築することが重要であり、樹立や頒布に係わる資金のサポートが必須である。

実中研樹立CIEA-PDX

鈴木 雅実

実験動物中央研究所
トランスレーショナルリサーチ部門

公益財団法人実験動物研究所（実中研、CIEA）のCIEA-PDXの樹立は、SPF/無菌動物の飼育・生産方法の確立に基づくヌードマウスの導入と量産化に成功した1970年代に開始された。さまざまながん種について多数の臨床材料をヌードマウスに移植し、現在、人を対象とする生命科学・医学系研究に関する倫理指針（2022年3月改訂）に適応し、アカデミア、企業などで創薬研究を含む腫瘍研究領域に活用できる頒布可能な株として205株をライブラリー化している。

CIEA-PDXライブラリーは、呼吸器系、消化器系、泌尿器系、中枢神経系、生殖器系、内分泌系、皮膚・外表系、造血器系、骨・筋肉系、軟部組織、ならびに、小児腫瘍など多岐に渡るがん種で構成されている。また、各がん種においてもさまざまな組織型を保有しており、例えば肺癌では、小細胞肺癌、ならびに、非小細胞肺癌として腺癌、扁平上皮癌、大細胞癌・巨細胞癌などを保有している。

近年、腫瘍研究は遺伝学的・分子生物学的な視点から進められており、抗がん剤研究開発においても腫瘍の分子生物学的解析に基づく分子標的創薬が主体となり、創薬モダリティ、作用機序も多様化している。一方、CIEA-PDXライブラリーはPDX研究黎明期に収集されたため、ゲノミクス解析、トランスクリプトミクス解析など遺伝学的・分子生物学的な情報などが十分に整備されていない状況であった。現在、この状況を改善するために、CIEA-PDXのレシピエントをヒト化マウスでの研究が可能なNOGマウスに変更し、移植腫瘍での各種ゲノミクス解析情報を取得するとともに、病理組織型、増殖曲線などについてデータを再取得し、データベース化を進めている。

抗がん剤創薬研究では、細胞障害性抗がん剤から分子標的抗がん剤への移行に伴い、腫瘍細胞が恒常的・均一に増殖するモデルから、腫瘍の多様性・複雑性を反映し、標的分子を発現するモデルへと、腫瘍モデルに求められる要件が変化してきている。PDXは、腫瘍の多様性・複雑性を反映するモデルと位置付けられ、創薬研究に有用かつ重要なツールと位置付けられている。CIEA-PDXの創薬研究へのさらなる活用に向け、CIEA-PDXと次世代NOGマウスを組み合わせた免疫チェックポイント阻害薬評価系の構築を試みており、これらの取り組みについても紹介する。

福島医薬品関連産業支援拠点化事業で開発した Patient-derived xenograftモデルである F-PDX[®]のご紹介

高木 基樹

福島県立医科大学

医療-産業トランスレーショナルリサーチセンター

福島医大トランスレーショナルリサーチ機構

医療-産業トランスレーショナルリサーチセンターで実施している福島医薬品関連産業支援拠点化事業は、生体試料を収集・保存し、それらをそのまま研究機関等に提供する「バイオバンク事業」とは異なり、希少かつ微量な生体試料を、1) 情報に変換する、2) 加工して増やす、3) 極微量試料の解析技術を開発する、ことにより最大限に活用してきた。さらに、これらの情報、生体由来加工試料、解析技術等を利用し、化合物の薬効・毒性評価システム開発や疾患マーカー探索にも取り組んでいる。

本事業の一環として、患者のがん組織を活用し、がん組織の状態を反映した抗がん剤評価モデルの開発を目指したpatient-derived tumor xenograft (PDX) モデル、さらには長期培養が可能なpatient-derived tumor organoid (PDO) の作製を行ってきた。本事業におけるPDXの“樹立”とは、生着や維持が可能であることに加えて、網羅的遺伝子発現解析により元のがん組織と作製したモデルの遺伝子発現プロファイルの類似性の高さを指標に、樹立の可否を判断している。現在までに、PDXモデルは200系統以上の樹立している。本事業で樹立したPDXを、F-PDX[®]と名付けた。本講演では、F-PDX[®]の樹立方法と特性解析、F-PDX[®]を用いた抗がん剤の評価、提供方法等について紹介する。

[参考文献]

1. Tamura H, *et al.* Evaluation of anticancer agents using patient-derived tumor organoids characteristically similar to source tissues. *Oncol Rep.* 40, 635-646 (2018)
2. 土橋 悠ら、複合型免疫不全マウスを用いたPDXモデルの作製、*実験動物技術* 54、55-62 (2019)
3. 片平 清昭ら、PDX (Patient-derived xenograft)モデル作製のための実験施設、*実験動物技術* 54、63-70 (2019)
4. 土橋 悠、片平 清昭、福島PDXコレクション、*実験医学別冊「患者由来がんモデルを用いたがん研究実践ガイド」*、236-243 (2019)
5. Takahashi N, *et al.* Construction of in vitro patient-derived tumor models to evaluate anticancer agents and cancer immunotherapy. *Oncol Lett.* 406. (2021)

創薬開発研究における J-PDXライブラリーの利活用

柳下 薫寛

国立がん研究センター研究所
分子薬理研究分野

抗がん薬の開発成功率は5%程度と低く、前臨床段階でのProof of conceptの取得の難しさが一因である。近年、患者由来の腫瘍組織を免疫不全マウスへ移植する患者腫瘍移植 (PDX) モデルが新たな薬効評価基盤として注目を浴びている。PDXモデルは患者腫瘍の不均一性や腫瘍微小環境、遺伝子情報が維持され、元患者とPDXの薬効の一致率が50~80%と非常に高いことが報告されており、既に抗がん薬開発ではPDXモデルを用いた評価が主流となりつつある。

国立がん研究センターでは、国立研究開発法人日本医療研究開発機構 (AMED) の支援のもと、進行・再発期で抗がん薬耐性となったがん患者を中心に、がん種横断的な日本人由来のPDXライブラリー (J-PDXライブラリー) を構築した (「がん医療推進のための日本人がん患者由来PDXライブラリー整備事業」)。2022年10月現在、1,678件の登録と515株の生着が確認されており、生検検体からの作成が約3割、何らかの抗がん剤治療歴を有する患者からの検体が約4割を占める。

J-PDXライブラリーでは創薬開発研究への利活用を念頭に、臨床情報と紐付けた利用を進めており、患者さんの情報とPDXにおける結果の対比、臨床情報に基づくPDXを選択したPDXバスケット試験、治験や臨床試験に並行したCo-clinical studyなどの方法を提案している。一方で、PDXが必ずしも臨床効果と一致するわけではないことも認識しており、PDXの創薬開発研究への利活用のためには非臨床試験の実施方法の標準化が必要と考えられる。

本シンポジウムではJ-PDXライブラリーのご紹介と、創薬開発研究への利活用の方法や現状、課題について取りまとめる。

がんに対するワクチン・T細胞療法の開発におけるPDXの利用

中面 哲也

国立がん研究センター
先端医療開発センター 免疫療法開発分野

我々の研究室では、がんの再発予防や予防を目指したペプチドワクチン、mRNAワクチン、ペプチドパルス樹状細胞ワクチンといったがんワクチンの開発、及び、進行・再発がんの治療を目指したCAR-T、TCR-T、個別化T細胞療法といったT細胞療法の開発を行っている。これらのT細胞、あるいは、ワクチンで誘導された細胞傷害性T細胞(CTL)、またはそれらのTCRを遺伝子導入したTCR-T細胞のがん細胞傷害性の有効性を腫瘍縮小などの見た目でもわかりやすく示すためには、PDXモデルに対する治療実験は極めて有効な手段である。ただ、実際は、免疫がないマウスなので、ヒトにワクチンやT細胞を投与した場合のがん細胞傷害による二次免疫応答の効果が期待できず、ヒトに投与するよりも不利な状況であり、単にin vitroでの細胞傷害性試験をマウスの体を借りてやっている実験であるということは考慮しておかないといけない。

我々の研究室では、国立がん研究センター東病院の外科や病理の先生方と連携して、2014年11月から肺がんのPDX、2016年8月から肝がん・胆道がん・大腸がん肝転移のPDX、2021年1月からは口腔がん・胃がんのPDXの作製に取り組んできた。マウスはNSGマウス、SCID-Beigeマウスを使用、手技としては皮下移植と腎被膜下移植を使用してきたが、マウス間、手技間に成功率の差はないように思われる。一方で、がん種によって、成功確率は明らかに異なり、口腔がん（扁平上皮がん）は5割と高率に成功し、大腸がん肝転移や肝内胆管がんを含む胆道がん、肉腫様肝がん、胃がん、肺扁平上皮がんでは3割程度で成功するものの、肝細胞がんは1割未満、肺腺がんはすべて失敗というこれまでの成績である。また、胃がん2例、口腔がん1例、B細胞リンパ腫ができた例も経験した。今後、移植前にマウスに全身照射することも検討しているが、本シンポジウムに参加している皆様に教を乞うて、今後成功確率を上げていきたいと考えている。

現在、CAR-T細胞療法の有効性を見る実験を実施しているが、今後は、TCR-T細胞療法や、がんワクチンで誘導されたCTL、またはそれらのTCRを遺伝子導入したTCR-T細胞の有効性を見る実験を行っていく予定である。

PDX由来細胞株を用いた オルガノイドの特徴とその活用

川合 重人

中外製薬株式会社

トランスレーショナルリサーチ本部 医科学薬理部

PDXモデルは臨床癌のヘテロジェネイティを保持するin vivoモデルであり、in vitro 3D培養モデルも同様にヘテロジェネイティを再現する有効なツールと考えられている。癌のヘテロジェネイティや治療抵抗性の一因として、癌幹細胞と呼ばれる未分化な癌細胞を起点とした分化階層性の存在が知られている。この分化階層性は癌微小環境により制御されている。そこで癌微小環境が癌細胞の分化に及ぼす影響について詳細に解析することは、癌のバイオロジーを理解するとともに、新たな創薬標的分子を探索するために有効と考えられる。癌微小環境には間質細胞や細胞外マトリクス、酸素分圧や栄養供給など様々な要因が関与するため、in vivo癌組織の解析が有効である。一方、in vitro培養モデルはメカニスティックな解析や化合物の薬効評価に活用しやすい。そこで我々はPDXモデルからin vitro細胞株を樹立、この細胞株から作製した分化階層性を再現するxenograftモデルとin vitro 3D培養モデルを組み合わせることで、癌微小環境による癌細胞の分化制御について解析を行った。解析対象には分化型の大腸癌ならびに肺扁平上皮癌を選択した。大腸癌モデルでは、xenograftの腫瘍形成過程を詳細に病理解析し、癌幹細胞マーカーLGR5陽性細胞からなるsmall cluster構造 (sCL) を見出した。sCLは癌-宿主境界面に多く存在し、その形成には線維芽細胞が関わっていることがin vitroモデルから明らかとなった。次にxenograftの肺、肝転移巣を指標にし、培養環境を調節することで、未分化な細胞からなるstem cancer organoid (stemCO)、ならびに分化した管腔構造を有するdiff cancer organoid (diffCO) の二つのin vitroモデルを樹立した。これらのモデルの創薬利用のモデルケースとして、管腔形成におけるNotchシグナルの寄与を示した。次に肺扁平上皮癌ではin vitroモデルで角化像を再現した。細胞周期をイメージングできるFUCCIシステムを用い、細胞分裂の停止に引き続いて分化が誘導されることを確認した。最後にNotchシグナル阻害により分化階層性が変化し、未分化層と分化層の間の中間層が顕著に減少することが見出された。以上の結果から、PDXモデルからin vitro細胞株を樹立し、xenograftモデルとin vitro 3D培養モデルを組み合わせることで、癌組織の分化階層性を理解し、創薬標的探索に応用できる可能性が示された。現在我々はこれらのモデルを用い、癌の治療抵抗性を克服するための研究を進めている。

PDXを用いたがん -間質相互作用の標的探索-

石川 俊平

東京大学 医学部・大学院医学系研究科
衛生学教室

患者由来のPDXモデルは、癌細胞の組織構築や腫瘍微小環境をよく再現し、薬物介入実験が可能であることから、がん-間質相互作用の治療標的探索に適した研究ツールと考えられる。我々は、神奈川県立がんセンターおよび実験動物中央研究所の協力のもと、多様ながん種からなる70検体由来のPDXモデルを樹立しトランスクリプトームシーケンスを行った。ヒトとマウスのタンパクをコードする領域のオーソログ配列の差は平均15%とされ、がん細胞（ヒト）と間質細胞（マウス）由来のシーケンスリードを配列の差に基づいてインシリコで分離し、がん細胞や間質細胞ごとに発現プロファイルを作成することが可能である。このデータを用いて、がん-間質相互作用における重要な標的分子を同定するため様々な解析を行った。PDX組織が臨床がん組織の腫瘍と間質細胞の比率を反映していることが確認できた。また、多様ながん種の腫瘍と間質の発現プロファイルを比較した結果、がん細胞だけでなく間質細胞のシグナルもがん種によって多様であることが明らかになりました。特に、腎細胞癌の間質は、線維性間質を生成する大腸癌、肺癌、膵臓癌と比較して特徴的であり、癌細胞の低酸素シグナルが明瞭で血管内皮が増加することが明らかになった。腎細胞癌間質の特徴的な遺伝子発現を支配する上流制御因子シグナル伝達経路と、それを誘導するがん細胞側からのシグナルの統合解析により血管新生に関わる可溶性因子としてAPELINを同定した。腎細胞癌のPDXマウスと特異的阻害剤を用いてAPELINシグナルに介入することで、この可溶性因子が腎臓癌の生着に関与し治療標的となりえることを確認した。これら一連の解析と実験から、PDXモデルのトランスクリプトーム解析は、がん-間質相互作用の解析において、分子標的を特定する有望なアプローチであることが示唆された。

悪性脳腫瘍のprecision medicineの 実現を支援するPDXライブラリー構築： 関西中枢神経腫瘍分子診断ネットワークの試み

金村 米博

大阪医療センター 臨床研究センター
先進医療研究開発部

頭蓋内原発性の悪性脳腫瘍は希少癌の一つであり、その代表であるglioblastomaを含む高悪性度グリオーマは、中間生存期間12-15ヶ月程度の予後不良の難治性疾患である。診断および治療法の進歩によって、その予後に一定の改善は認められているが、脳実質内に広範囲に浸潤する生物学的特性を有する腫瘍であり、神経症状悪化を回避しての外科的全摘出には限度があり、その予後向上のためには、新たな治療戦略の開発が強く求められている。

近年のゲノム科学に基づく大規模研究の結果から、悪性脳腫瘍の分子遺伝学的特性に関する数多くの知見が報告され、これら特徴に基づく新たな分子分類の概念が提唱されている。最新のWHO脳腫瘍分類第5版（2021）では、従来までの病理組織学的所見に加えて、様々な分子遺伝学的指標が診断基準に組み込まれる大きな改定がなされた。今後はこれら分子遺伝学的特性に基づき、precision medicineを実現するための研究開発が精力的に進められると予測される。

悪性脳腫瘍の研究開発における一つの課題として、適切なモデル系構築の重要性が挙げられる。現在に至るまで悪性脳腫瘍モデル細胞として汎用されてきた各種株化細胞は、各腫瘍のin vivoにおけるナイーブな特性を十分に反映していないという問題点が認識されている。よりオリジナルに近い特性を保持し得る病態モデル系として、無血清培養系で樹立された初代培養細胞やPatient-derived xenograft (PDX) モデルの利活用が強く推奨されており、その樹立と研究リソースとしての標準化の必要性が指摘されている。

一方で、希少癌である悪性脳腫瘍のPDXモデルの樹立とその標準リソース化は単一施設で実施することは容易ではなく、私たちは関西地区を中心とした約70施設の医療機関で関西中枢神経腫瘍分子診断ネットワークを構築し、脳腫瘍分子診断の中央化と患者由来腫瘍組織検体ライブラリー構築、それを活用した初代細胞株とPDXモデル樹立を試みている。本発表では、関西中枢神経腫瘍分子診断ネットワークのPDXライブラリー構築に向けた活動を紹介し、悪性脳腫瘍のprecision medicineの実現におけるPDXモデルの重要性を考察する。