

## 令和3年度 学内研究助成金 研究報告書

研究種目	<input checked="" type="checkbox"/> 奨励研究助成金	<input type="checkbox"/> 研究成果刊行助成金
	<input type="checkbox"/> 21世紀研究開発奨励金 (共同研究助成金)	<input type="checkbox"/> 国際共同研究推進助成金
研究課題名	膵癌切除検体を用いた真の癌幹細胞の同定、治療抵抗性メカニズムの解明	
研究者所属・氏名	研究代表者： 奈良病院 外科 富原 英生 共同研究者：	

### 1. 研究目的・内容

通常型膵臓癌（以下、膵癌）は部位別予測罹患数が 42700 人と増加傾向にあり、部位別死亡数は 36700 人で第 4 位となった。2030 年には部位別がん死亡第 2 位になると予測されている。膵癌に対する、がんの予防、がん医療の充実は、今後ますます吃近の課題となる。本研究の目的は、膵癌における癌幹細胞マーカーを同定・解析し、治療抵抗性の原因となる癌幹細胞を同定し膵癌治療抵抗性を克服する究極の癌治療を開発することである。

### 2. 研究経過及び成果

悪性腫瘍の根源とされる癌幹細胞は、自己複製能、多分化能、造腫瘍能を有する少数の癌細胞集団で、治療抵抗性を示し、治療抵抗性の原因となり、再発の芽となる癌幹細胞の同定と癌幹細胞を標的とした新たな治療法の開発は急務である。臨床検体を用いた培養技術はここ数年で着実に進歩しているが、一般にスフェロイド培養は極めて困難である。膵癌の手術検体から癌細胞を単離し、マウス皮下移植～培養、継代の過程でほとんどの癌細胞が死滅する中、もしも 1 個～10 個程度の細胞でマウスに腫瘍を形成する能力を有する細胞を見出すことができれば、その細胞は将来再発する細胞である可能性が高く、極めて生存能力に長けた組織由来の癌幹細胞といえる。本研究は、膵癌患者の手術検体を採取し、これを培養することで個々の患者に特異的な癌幹細胞を同定・解析を試みる研究である。初年度は新型コロナ感染症のために患者との接触も長期に渡り制限され、サンプルは得られなかった。免疫染色の条件検討は膵癌細胞株を用いて、EpCAM, CD44, CD133 のカクテル抗体で染色することを予定している。摘出標本をホモジナイズした後、速やかに Oncoquick 細胞分離液を用いて赤血球、白血球、血小板を可及的に除去し、特殊ポリマーをコーティングしたスライド上で培養することによりスライドガラス上から血球成分が遊離して癌細胞が残る。同検体を翌日にカクテル抗体を用いたワンステップ法を用いて免疫染色することにより癌細胞の単離を予定する。その後培養を 7-10 日間継続し、血球細胞が脱落してゆく中、サイズの大きな癌細胞様の球体形成（スフェロイドの形成）を目指す。7-10 日目にシャーレ内残存細胞を集め RNA を抽出し、RNA シークエンスへの提出を考えている。

2021 年は COVID19 の影響で病院への立ち入りが制限され、特に後半はオミクロン株の蔓延で患者と接する研究もストップせざるを得なかった。しかし、今後は細胞株を用い膵癌細胞の検出に適当な抗体の選出やワンステップ法での染色法を確立することを目指している。

### 3. 本研究と関連した今後の研究計画

膵癌患者の手術検体から癌細胞を検出し、初代培養・スフェロイドを作成することで RNA/DNA 変異解析が可能となる。全ゲノム増幅をかけて、膵癌に特異的な遺伝子変異をサンガー法で検出するよう実験を進める。DNA 分析はセルフリーDNA でも可能であるが、スフェロイド作成の利点として細胞を生きのまま回収し RNA レベルの解析ができる点が重要であるので、少数の細胞からいかに高品質の RNA を得ることができるかについてシングルセル解析を導入するなどして検討する予定である。

### 4. 成果の発表等

発表機関名	種類 (著書・雑誌・口頭)	発表年月日(予定を含む)
Surgical Case reports	雑誌	2022 Apr