

犬の難治性胸腔内腫瘍に対する
新規実験モデルの開発

2023 年

東京農工大学大学院農学府共同獣医学専攻

塩田 よもぎ

目次

目次.....	1
序論.....	3
第 1 章.....	7
緒言.....	8
実験材料および方法.....	10
材料.....	10
結果.....	15
考察.....	17
小括.....	20
第 2 章.....	21
緒言.....	22
実験材料および方法.....	24
結果.....	31
考察.....	35
小括.....	39
第 3 章.....	40
緒言.....	41
実験材料および方法.....	42
材料.....	42
結果.....	46
考察.....	49
小括.....	52
総合考察.....	53
結論.....	56

謝辞.....	57
引用文献.....	58
図表.....	72

序論

近年，獣医療の発展とともに伴侶動物の寿命が延長してきた (Teng et al., 2022)。同様に死亡原因の推移も見られ，従来は慢性疾患や感染症などが主な死亡原因となっていたが，現在は腫瘍関連死が上位を占めるようになってきた。伴侶動物，とくに犬や猫で見られる腫瘍の種類は，人で見られるものと類似しているという報告も多く，人医療の前臨床モデルとして犬や猫の腫瘍研究にも注目が集まっている (Paoloni and Khanna, 2008; LeBlanc and Mazcko, 2020)。一方で，犬や猫の腫瘍治療には治療薬剤やプロトコルが確立されていないものも多く，その研究は発展途上である。

伴侶動物と人の腫瘍治療が異なる点は，治療の際に被治療動物の同意ではなく飼い主の同意が必要となることや医療費がより高額になること，放射線治療や高度画像検査に伴い麻酔が必要となることなどが挙げられる (Paoloni and Khanna, 2008; LeBlanc and Mazcko, 2020)。こうした種々のハードルのために，腫瘍治療を実施せずに支持療法へ移行する場合も少なくない。特に症例数の少ない難治性希少腫瘍においては，ますます研究材料となる症例数が少なくなり，適切な実験モデルなども乏しいことが研究促進の障壁となっていると考えられる。そこで研究に利用可能な症例モデルや培養モデルが充実すれば，こうした難治性腫瘍の研究促進の一助になると思ひ，新たな実験モデルの開発が必要であると考えた。

犬の難治性希少腫瘍としては種々挙げられるが，本研究では中でも胸腔内腫瘍として知られる犬の原発性肺腫瘍と悪性中皮腫に焦点を当てた。犬の原発性肺腫瘍は，発症率が少ないものの病態初期の臨床症状が乏しいことから，診断時にはすでに進行していることの多い腫瘍である。根治的治療として肺葉切除術が行われるが，切除不能あるいは転移性の場合の予後は非常に悪く，有効な内科療法も確立されていない。一方の犬悪性中皮腫はさらにまれな腫瘍として知られている。主に胸膜や腹膜，心膜などの中皮から発生し，総鞘膜における発生も認められている (Moberg et al., 2022)。中年齢から高齢の犬が罹患するが，若年齢での発生も報告されており (Kim et al., 2002; Vural et al., 2007; Abugomaa et al., 2020a)，主な臨床症状は胸水や腹水の貯留に伴う頻呼吸や呼吸困難である (Moberg et al., 2022)。治療法として，

体腔内または静脈内へのプラチナ製剤の投与や 5-FU, カルボプラチンの単独療法またはミトキサントロンとの併用療法が用いられているが (Moore et al., 1991; Seo et al., 2007; Spugnini et al., 2008; Moberg et al., 2022), 現在のところ最適な治療法はなく, 症例は数か月で斃死することが多い (Moberg et al., 2022)。

腫瘍研究モデルとしては, 二次元細胞株や腫瘍モデルマウスなどが知られている。特に二次元細胞株は, 細胞の分子学的特徴や薬剤に対する感受性の評価, 遺伝子のノックイン・ノックアウトによる細胞生物学的な変化の検証等を実施する上で非常に扱いやすく, また遺伝子変異の有無や分子的特徴が明らかにされているものを多いため, 用途に応じて種々の同じ腫瘍の異なる細胞株を使い分けることも可能である (Gazdar et al., 2010; Colin et al., 2018; Peng et al., 2021; Vijayakumar et al., 2023)。腫瘍モデルマウスでは, 培養ディッシュ上では再現できない, 生理学的な相互作用を考慮した腫瘍動態の研究に有利であり, 実際の生体に対する薬剤投与や腫瘍転移の有無, 腫瘍原性などの評価が可能となる (Jongsma et al., 2008; Chernova et al., 2017)。一方で, 平面上に培養される二次元細胞は, 生体内に存在する腫瘍細胞同士や細胞間マトリックスとの相互作用などを再現できない可能性が問題視されている (Habanjar et al., 2021; Li et al., 2021)。またモデルマウスでは動物種が異なることによって薬物動態や腫瘍生理学的な挙動に違いが見られる点なども提唱されている (Paoloni and Khanna, 2008; Lawrence et al., 2015)。そこで近年新たな培養モデルとして注目されているのが三次元オルガノイド培養法 (Lancaster and Knoblich, 2014; Clevers, 2016; Bleijs et al., 2019) である。

三次元培養細胞としては, これまで平面ディッシュ内でも細胞が凝集体を形成し, 小さな立体構造を示すスフェロイドなどが知られていた。スフェロイドは薬剤や放射線に対する感受性が同じディッシュ内の二次元細胞と比較して低いことなどから, 元の悪性腫瘍の治療抵抗性をより模倣している可能性が示唆されており (Ho et al., 2010; Clemente-Vicario et al., 2015; Tanabe et al., 2016), 腫瘍マーカー発現率も二次元細胞よりも増加していたという報告もある (Horio et al., 2020)。さらに 2009 年に Sato らが発表した腸管オルガノイドの論文 (Sato et al., 2009) をきっかけに, 急速にオルガノイド研究が発展してきた。オルガノイドとは, 「Organoid」つまり「臓器のような」という意味を指す言葉であり, 主に上皮系由来の自己複

製能に富んだ幹細胞が培養ディッシュ内で分化し、組織のような立体構造の形成を認めるものである (Lancaster and Knoblich, 2014; Clevers, 2016; Bleijs et al., 2019)。これまでも二次元細胞とスフェロイドならびにオルガノイドを比較検討した種々の報告が認められており、薬剤感受性試験や遺伝子・タンパク発現の違いなどが検証されている (Pampaloni et al., 2007; Lancaster and Knoblich, 2014; Clevers, 2016; Bleijs et al., 2019; Elbadawy et al., 2019a; Elbadawy et al., 2021a; Elbadawy et al., 2021c; Blutt and Estes, 2022; Salgueiro et al., 2022; Yoshida et al., 2022; Abugomaa et al., 2023)。オルガノイドも生体内とは異なり、血管や免疫細胞が存在しないため完全な腫瘍環境の再現は困難であるが、腫瘍細胞同士の相互作用や細胞外マトリックスを介した細胞連絡などが維持されていることから、二次元細胞やスフェロイドよりもさらに生体内での腫瘍環境に近い状態が維持されやすいと言われている (Pampaloni et al., 2007; Lancaster and Knoblich, 2014; Clevers, 2016; Bleijs et al., 2019; Elbadawy et al., 2019a; Elbadawy et al., 2021a; Elbadawy et al., 2021c; Blutt and Estes, 2022; Salgueiro et al., 2022; Yoshida et al., 2022; Abugomaa et al., 2023)。こうしたオルガノイド培養法は、再生医療 (Wang et al., 2020)、疾患モデル (Elbadawy et al., 2020b; Elbadawy et al., 2021b)、毒性病理学 (Yoshida et al., 2022)、トランスレーショナルリサーチ (Elbadawy et al., 2020a)、腫瘍研究 (Elbadawy et al., 2018a; Usui et al., 2018; Abugomaa et al., 2020a) の分野で非常に有用な培養モデルとして応用されてきている。また腫瘍に罹患した患者由来の腫瘍オルガノイド培養法は、遺伝子変異や過剰発現などの個体ごとの分子プロファイルが維持されていることも示されており (van de Wetering et al., 2015; Li et al., 2018; Yan et al., 2018; Bleijs et al., 2019)、薬剤スクリーニングなどによる個別化医療や前臨床モデルとしての応用も期待されている (Bleijs et al., 2019; Salgueiro et al., 2022)。一方でこうしたオルガノイド培養法の獣医療における利用例は依然として少ない。そこで本研究ではこの三次元オルガノイド培養法に注目し、胸腔内希少腫瘍に対する新たな実験モデルとして利用可能性を見いだすことを目的とした。

本研究の構成として、第 1 章では犬の原発性肺腫瘍を、第 2 章では犬の悪性中皮腫を取り上げ、それぞれの腫瘍罹患犬由来のオルガノイド培養法の確立を試みた。さらにそれぞれのオルガノイドの特徴解析を通じて、新たな培養モデルとしての有用性を示した。第 3 章では

第 1 章で確立した肺腫瘍オルガノイドを用いて、同時に作出した近接する正常肺オルガノイドとの比較解析を行うことで、肺腫瘍オルガノイドに特徴的な細胞増殖経路や発現分子の違いを見出し、実際に犬の肺腫瘍に対する新規治療の探索に応用できる可能性を示した。

第 1 章

犬原発性肺腫瘍オルガノイド培養法の確立

緒言

人の原発性肺腫瘍は、最も発生頻度が高く、死亡率の高い腫瘍の一つとして知られているが (Sung et al., 2021; Chhoury et al., 2023), 様々な研究や分子標的薬の開発に伴い 5 年生存率の増加も見られている。これまで人の原発性肺腫瘍研究において、多種の研究モデル・手法として細胞株 (Cooper et al., 2013) をはじめ、げっ歯類モデル (Ermolayev et al., 2015) や遺伝子解析 (Reynders et al., 2018; Alexander et al., 2020), 三次元 (3D) オルガノイドモデル (Barkauskas et al., 2017; Sachs et al., 2019; Li et al., 2020; Shi et al., 2020; Yokota et al., 2021) などが利用されてきた。こうした研究の結果、腫瘍原性に関わるドライバー遺伝子の存在やその変異・増幅なども発見されてきた (Cooper et al., 2013; Huang et al., 2013; Alexander et al., 2020; Lin et al., 2020; Chhoury et al., 2023)。人における治療法としては、一般的に腫瘍組織の外科的切除と化学療法 (Nagasaka and Gadgeel, 2018) や放射線治療などが実施され、特に遺伝子変異に応じた分子標的薬も汎用されている。一方で犬の原発性肺腫瘍は、発症率が少ないものの病態初期の臨床症状が乏しいことから、診断時にはすでに進行していることの多い悪性腫瘍とされている。根治的治療として肺葉切除術が行われるが、切除不能あるいは転移性の場合の予後は非常に悪く、有効な内科的治療薬も確立されていない。ある報告によると、肺葉切除術を行った場合の生存期間中央値 (以下 MST) は、化学療法併用の有無やリンパ節転移の有無にかかわらず、160~450 日程度と言われている (Rose and Worley, 2020)。対照的に、肺葉切除を実施しない場合の MST は、化学療法実施の有無にかかわらず、60~180 日程度と短いことも報告された (Rose and Worley, 2020)。内科療法として用いられる化学療法剤に注目すると、シクロホスファミド (Polton et al., 2018) やドキソルビシン、パクリタキセル (Hershey et al., 1999; Chae et al., 2022), ビノレルビン (Poirier et al., 2004; Wouda et al., 2015), トセラニブ (Yamazaki et al., 2020) などが挙げられるが、有効な治療薬やプロトコルはまだ確立されていない。また人医療では遺伝子検査等に基づいて多種の分子標的薬が使用されているにもかかわらず、犬での使用例は限局的であり、一般的に用いられているものとしてはイマチニブやトセラニブなどが挙げられる (Elfadadny et al., 2021)。このような背

景から犬の原発性肺腫瘍に対する有効な治療薬探索や生物学的研究の促進が必要であると考えた。しかしながら、その症例数の少なさや適切な実験モデルが十分ではないことが研究促進の障壁となっている。そこで第1章では、犬の原発性肺腫瘍研究の実験モデルとして肺腫瘍オルガノイドの作出を行い、元の組織との組織学的な比較や薬剤スクリーニングを通してその利用可能性を示すことを目的とした。

実験材料および方法

材料

本研究で用いた培養液は, Advanced Dulbecco's Modified Eagle's Medium (Ad. DMEM, Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA) を基礎として, Wnt 3a や Noggin, R-Spondin を分泌する L-WRN (CRL-3276TM) 細胞 (Waltham, MA, USA) を用いて研究室内で調整した WNR 調整培地に加え, 種々の幹細胞サプリメントと成長因子を添加した。使用した幹細胞サプリメントと成長因子は GlutaMax (Thermo Fisher Scientific), 100 μ g/ml Primocin (Thermo Fisher Scientific), 1 mM N-アセチル-L-システイン (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA), 10 mM ニコチンアミド (Sigma-Aldrich), 500 nM A83-01 (Adooq Bioscience, Irvine, CA, USA), 50 ng/ml Epidermal Growth Factor (以下 EGF) (Pepro Tech, Cranbury, NJ, USA), 5 ng/ml Fibroblast Growth Factor (以下 FGF) -7 (FGF7) (Pepro Tech), 20 ng/ml Transforming Growth Factor - α (以下 TGF α) (Pepro Tech) である。使用した化学療法剤あるいは分子標的薬は, カルボプラチン (富士フイルム和光純薬, 大阪, 日本), シスプラチン (富士フイルム和光純薬), ビノレルビン (Cayman Chemical, Ann Arbor, MI, USA), パクリタキセル (Cayman Chemical), ドキソルビシン (Cayman Chemical), メトトレキサート (東京化成工業, 東京, 日本), シクロホスファミド (東京化成工業), ラパチニブ (Cayman Chemical) およびゲフィチニブ (東京化成工業) である。免疫組織化学染色の際に使用した一次抗体は, 抗 Thyroid transcription factor-1 (TTF1) 抗体 (Novus Biologicals, Centennial, CO, USA), 抗 Chromogranin-A (CGA) 抗体 (Abcam, Cambridge, UK), 抗 total-human epidermal growth factor receptor-2 (HER2) 抗体 (Bio Vision, Waltham, MA, USA) および抗 total-epidermal growth factor receptor (EGFR) 抗体 (Cell Signaling Technology Inc., Danvers, MA, USA) である。二次抗体は EnVision+dual Link System-horseradish peroxidase (HRP) (Agilent Technologies Inc., Santa Clara, CA, USA) を使用した。

被検犬および肺腫瘍組織検体の採材

2020年から2022年において東京農工大学動物医療センターおよび近畿動物医療研修センターを受診し、原発性肺腫瘍と診断された犬6頭を被検犬とした。被検犬の症例情報を表1-1に示した。すべての被検犬に対して各センターで肺腫瘍を含む肺葉の外科的切除を実施した。摘出された肺葉から腫瘍部を切り出し、保存用培養液中（表1-2）に浸漬し、速やかに獣医薬理学研究室へ移送し、細胞培養までの間4°Cで保存した。なお摘出した肺組織の利用に関して、被検犬の飼い主に研究内容・目的・手法について十分な説明をし、同意を得た上で「東京農工大学附属動物病院倫理委員会」の承認（承認番号：0020007）を得て適切に実施した。

原発性肺腫瘍組織からのオルガノイドの作出および継代培養

保存用培養液中に4°Cで保存していた肺腫瘍組織を滅菌冷リン酸緩衝液（以下PBS）で3回洗浄後、滅菌した眼科鉗と鑷子を用いて可能な限り細切した。細切組織塊を10%Liberase TH Research Grade（Roche Diagnostics GmbH, Sandhofer Strasse, Mannheim, Germany）を含むprimocin/penicillin-streptomycin 添加 Ad. DMEMを用いてコラゲナーゼ処理を行い、37°Cで振盪することで細胞を分離させた。その後PBSで3回洗浄し、必要に応じてTrypLE（Thermo Fisher Scientific）で追加のトリプシン処理を実施し、100 μmのセルストレーナーに通した後10%ウシ胎児血清（以下FBS）（Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA）を用いて中和させた。得られた細胞塊をマトリゲルと呼ばれる基底膜マトリックスを含むゲル状培地と混合し、40 μlずつ24ウェルプレートへ播種した。37°CのCO₂インキュベータ内で30分間静置し、マトリゲルが固まったことを確認後、オルガノイド培養液（表1-3）を各ウェル500 μlずつ添加して37°CのCO₂インキュベータ内で培養した。その後は1週間に3回培養液を交換し、マトリゲル内のオルガノイドの密度がゲルに対して70%程度に達した時点で継代培養した。継代培養の際はウェルの培養液を吸引し、PBSで1回洗浄後、PBSで希釈した5 mMのエチレンジアミン四酢酸溶液（以下EDTA/PBS）を添加し、氷上で90分静置しマトリゲルを緩徐に溶解した。次いでPBSで洗浄し、TrypLEを用いて37°Cで4分間トリプシン処置を行い、ピペッティングにより細胞同士を分離させた後に10%FBSを用いて中和させた。その後、600 gで3

分間遠心分離を行い、得られた細胞塊を新たなマトリゲルと混合し、40 μ l ずつ 24 ウェルプレートへ播種した。37°Cの CO₂インキュベータ内で 30 分間静置し、マトリゲルが固まったことを確認後、オルガノイド培養液を各ウェル 500 μ l ずつ添加して 37°Cの CO₂インキュベータ内で培養した。

肺腫瘍オルガノイドの免疫不全マウス皮下への異種移植実験

免疫不全マウスに関する実験は、東京農工大学の倫理委員会で合意された「実験動物の飼育と使用の手引き」の推奨に則り、東京農工大学動物実験小委員会の承認を得て、実施した（承認番号：R04-120）。肺腫瘍オルガノイドの腫瘍原性を評価するために、培養した肺腫瘍オルガノイド（LC20001）を EDTA/PBS と TrypLE を用いたトリプシン処置によって遊離させ、回収したペレット量が約 1×10^6 個のオルガノイド細胞となるように目視で確認し、オスの SCID（C.B-17/IcrHsd-Prkdcscid, Japan SLC）マウスの背部皮下へ移植し、8 週間適切な環境下で飼育後、移植組織を摘出した。PBS で洗浄した後、組織の一部をヘマトキシリン・エオジン染色および免疫組織化学染色に供した。

犬原発性肺腫瘍オルガノイドおよび組織検体のヘマトキシリン・エオジン染色ならびに免疫組織化学染色

24 ウェルプレートのマトリゲル内で増殖した肺腫瘍オルガノイドを PBS で 1 度洗浄し、4%パラホルムアルデヒド（以下 PFA）を用いて一晩 4°Cで固定した。被検犬から採材した肺腫瘍組織や免疫不全マウスに異種移植した肺腫瘍オルガノイド組織は、その一部を 2 mm 厚の小さな組織片に切り出し、4%PFA を用いて一晩 4°Cで固定した。その後は常法に則り、アルコールおよびキシレンへの浸漬を経て、パラフィンに包埋した。4 μ m 厚の薄切切片を作製し、オルガノイドの組織学的形態評価のためにヘマトキシリン・エオジン染色を行った。

免疫組織化学染色では、切片の脱パラフィン後、エタノールへ段階的に浸漬・水和させ、10 mM のクエン酸緩衝液（pH6.0）中でオートクレーブによる 121°C・5 分間の賦活化処理を行った。内因性ペルオキシダーゼの失活のために 1% H_2O_2 /methanol 溶液中に室温で 30 分浸漬

させた。10%正常ヤギ血清（以下 NGS）でブロッキングした後、抗 TTF1 抗体（1:100）あるいは抗 CGA 抗体（1:100）、抗 HER2 抗体（1:100）、抗 EGFR 抗体（1:100）を 4°C で一晩反応させた。その後 EnVision+Dual Link System-HRP を用いて二次抗体と室温で 30 分反応させ、3, 3-diaminobenzidine（以下 DAB）（ナカライテスク、日本）を用いて発色させた。すべての切片はヘマトキシリンを用いて対比染色を行った。

肺腫瘍オルガノイドに対する薬剤処置および細胞生存率

各化学療法剤と分子標的薬は一般的な動物病院で用いられる治療濃度や製薬会社のデータ (Gaver et al., 1988; Hershey et al., 1999; McKillop et al., 2004; Poirier et al., 2004; Seo et al., 2007; Polton et al., 2018; Lisowska et al., 2019; Lorch et al., 2019) を基に適切な濃度を算出し、オルガノイドへ曝露した。オルガノイドを PBS で洗浄後、5mM の EDTA/PBS および TrypLE を用いたトリプシン処置を実施し、70 μ m のセルストレーナーに通して FBS で中和した。得られた細胞を顕微鏡下で計数し、96 ウェルプレートの 1 ウェルあたりに 2000 個ずつ播種されるようにマトリゲルと混合した。各薬剤に対して 3~9 ウェルずつ各 8 μ l の細胞懸濁ゲルを播種した。ゲルが固まった後に培養液を 1 ウェルあたり 100 μ l ずつ添加し、37°C の CO₂ インキュベータ内で一晩培養した後、溶媒であるジメチルスルホキシド（以下 DMSO）あるいは以下に示す薬剤を処置して 72 時間培養した。その後、プレストブルーアッセイキット（Thermo Fisher Scientific）とマイクロプレートリーダー（TECAN, Seestrasse, Switzerland）を使用し、585 nm の波長で吸光度を計測した。薬剤は、カルボプラチン（0.1, 1, 10, 100 μ g/ml）、シスプラチン（0.1, 1, 10, 100 μ M）、ビノレルビン（0.001, 0.01, 0.1, 1 μ M）、パクリタキセル（0.01, 0.1, 1, 10 μ M）、ドキソルビシン（0.1, 1, 10, 100 nM）、メトトレキサート（0.1, 1, 10, 100 μ M）、シクロホスファミド（0.1, 1, 10, 100 μ M）、ラパチニブ（0.01, 0.1, 1, 10 μ M）、ゲフィチニブ（0.03, 0.1, 0.3, 1 μ M）を用いた。

免疫組織化学染色を用いた肺腫瘍オルガノイドにおける HER2 および EGFR のタンパク発

現レベルの評価法

肺腫瘍オルガノイドにおける HER2 および EGFR のタンパク発現レベルを定量化するために、免疫組織化学染色を用いて各抗体に対して陽性を示す細胞を次のような 4 群に分類した (Wolff et al., 2013; Wolff et al., 2018)。Complete 群：細胞膜上全体に強く広範囲な染色性を示す、Incomplete 群：細胞膜上に不完全だが中程度に広範な染色性を示す、Faint 群：細胞膜上にかすかなあるいはわずかな染色が確認できる、None 群：全く染色が確認されない。これらの評価方法は the American Society of Clinical Oncology/College of American Pathologists により提案されている手法 (Wolff et al., 2018) に基づいて実施した。さらにこれら 4 群の内 Complete 群のみを HER2 あるいは EGFR の過剰発現細胞としてみなし、10 倍の対物レンズの 4 視野中に含まれる全体の細胞に対して、complete 群の割合を比較し、定量化した。さらに各肺腫瘍オルガノイドの系統において、HER2 あるいは EGFR の過剰発現細胞の割合とラパチニブ (HER2 阻害薬) またはゲフィチニブ (EGFR 阻害薬) 処置に対する IC50 値との相関を可視化するために、Pearson の積率相関係数を用いてグラフに表した。

統計学的解析

得られた定量値は平均値±標準誤差として示した。統計学的評価は、SigmaPlot ソフトウェアを用いて一元配置分散分析 (ANOVA) を行い、Student's *t*-test あるいは Pearson の積率相関係数を用いて統計解析を実施した。両側 P 値が <0.05 の場合、データが統計的に有意であるとみなした。

結果

犬の原発性肺腫瘍組織からの肺腫瘍オルガノイドの培養

原発性肺腫瘍と診断された被検犬6頭(表 1-1)から得られた肺腫瘍組織を細切し、マトリゲルとともに培養することで(図 1-1)、培養後7日以内にすべての検体から球状あるいは突起状のオルガノイドが形成された(図 1-2)。その内1検体(LC21003)は途中でコンタミネーションを生じたため培養を中止したものの、残る5検体の腫瘍オルガノイドは増殖を続け、数継代に渡り増殖を維持していた。オルガノイドと元の腫瘍組織のヘマトキシリン・エオジン染色像を比較すると、組織学的に肺腺癌と診断された3検体由来のオルガノイド(LC20001, LC21004 および LC21007)では、肺腺癌に特徴的な腺腔構造が維持されていることが分かった(図 1-3)。さらに、免疫組織化学染色により腺癌マーカーの1つであるTTF1タンパクの核内発現が認められ、元の組織における局在と類似していた(図 1-4)。また肺原発性神経内分泌腫瘍と診断された症例由来のオルガノイド(LC21001)においても、内分泌腫瘍マーカーの1つであるCGAのタンパク発現が細胞質内で確認された(図 1-4)。

被検犬由来の肺腫瘍オルガノイドが腫瘍原性を有していることを調べるために、免疫不全マウスであるSCIDマウスの背部皮下にLC20001オルガノイドを異種移植し、8週間適切な環境下で飼育した結果、明瞭な腫瘍形成が認められた(図 1-5A)。摘出した移植組織の組織切片を作製し、ヘマトキシリン・エオジン染色と腺癌マーカーである抗TTF1抗体を用いた免疫組織化学染色を実施したところ、元の腫瘍組織と同様の腺腔構造を有し、TTF1タンパクの発現が確認された(図 1-5B)。

肺腫瘍オルガノイドの系統間における化学療法剤感受性の比較

作出した肺腫瘍オルガノイドが薬剤スクリーニングツールとしての有用性を評価するために、先行研究に則って(Usui et al., 2016; Usui et al., 2017; Elbadawy et al., 2019a)各系統のオルガノイドに対して7種類の化学療法剤(カルボプラチン, シスプラチン, ビノレルビン, パクリタキセル, ドキソルビシン, メトトレキサートおよびシクロホスファミド)を処置し、

その薬剤感受性を比較した (図 1-6, 表 1-4)。シクロホスファミド処置は最も細胞増殖抑制効果が低く, 対照的にパクリタキセルやビンレルビン処置は最も効果的に肺腫瘍オルガノイドの細胞生存率を低下させていた。各系統を個別にみると, 概して LC20001 オルガノイドはいずれの薬剤に対しても抵抗性を示す傾向が認められた。

肺腫瘍オルガノイドにおける分子標的薬に対する感受性および標的タンパク発現の比較

これまでの研究には, 犬の肺腫瘍組織において HER2 発現や EGFR 発現が高くなっているという報告がある (Sabattini et al., 2014; Yoshimoto et al., 2020)。そこで本研究においても肺腫瘍オルガノイドのラパチニブ (HER2 阻害薬) およびゲフィチニブ (EGFR 阻害薬) の感受性 (図 1-7, 表 1-5) と薬剤の標的タンパク (HER2 および EGFR) 発現 (図 1-8) の関連性について検証した (図 1-9, 表 1-6, 1-7)。肺腫瘍オルガノイドにおいて HER2 あるいは EGFR タンパク発現が高いほど各阻害薬であるラパチニブあるいはゲフィチニブに対する感受性が高い傾向が見られ, 一方で LC20001 のようにそれぞれのタンパク発現が低いほどそれらの阻害薬に対する抵抗性が高い傾向が見られた。なお肺腫瘍オルガノイドにおける HER2 または EGFR タンパクの発現レベルは元の組織における発現レベルと類似している傾向も確認された (図 1-10)。

考察

本研究では、原発性肺腫瘍に罹患した犬から摘出した腫瘍組織を用いて犬原発性肺腫瘍オルガノイドの作出に成功した。今回得られた主な結果は以下の通りである。1) 犬原発性肺腫瘍オルガノイドは元の腫瘍組織と構造的あるいはマーカータンパクの局在などが類似した特徴を維持しており、免疫不全マウス皮下における腫瘍形成能を有していることが認められた(図 1-1,2,3,4,5)。2) 犬原発性肺腫瘍オルガノイドの薬剤感受性は化学療法剤やオルガノイドの系統ごとに異なっていた(図 1-6)。3) 分子標的薬であるラパチニブやゲフィチニブに対して、犬原発性肺腫瘍オルガノイドの細胞生存率とそれらの標的分子(HER2 および EGFR)の発現量との間には一定の相関が見られた(図 1-7,8,9)。これらの結果を総合すると、肺腫瘍罹患犬の腫瘍組織に由来した肺腫瘍オルガノイドは元の被検犬における腫瘍の特徴を模倣し、薬剤スクリーニングや新たな実験モデルとして利用可能であることが示唆された。

人の肺腫瘍は最も発生頻度が高く死亡率の高い腫瘍の一つとして知られているため、細胞株 (Cooper et al., 2013), モデル動物 (Ermolayev et al., 2015), オルガノイドモデル (Barkauskas et al., 2017; Sachs et al., 2019; Li et al., 2020; Shi et al., 2020; Yokota et al., 2021) などの実験モデルやツールが数多く存在する。一方、犬原発性肺腫瘍は予後不良の稀な腫瘍として知られており、臨床例が少なく、実験モデルも不足しているため、有効な治療プロトコルが確立されていない (Hershey et al., 1999; Polton et al., 2018; Rose and Worley, 2020)。今回知り得るかぎり、犬の肺腫瘍組織由来の肺腫瘍オルガノイドに関する報告は本研究が初めてである。腫瘍由来オルガノイドモデルに関する多くの研究 (Usui et al., 2017; Nanki et al., 2018; Elbadawy et al., 2019a; Mullenders et al., 2019; Sachs et al., 2019) と同様に、今回樹立した犬の肺腫瘍オルガノイドは、組織学的形態や腫瘍マーカー発現などの分子的特徴において元の腫瘍組織を再現していた(図 1-3,4)。さらに、犬の肺腫瘍オルガノイドは免疫不全マウスの異種移植実験から腫瘍形成能が示され、その組織学的構造やマーカー発現においても元の組織やオルガノイドとの類似性を示していた(図 1-5A, B)。こうした結果は、犬の肺腫瘍オルガノイドモデルが犬原発性肺腫瘍研究を発展させるための新しいオプションになり得ることを

示唆している。

現在までのところ、切除不能または転移性の犬原発性肺腫瘍に対して有効な薬剤は確立されていない (Hershey et al., 1999; Polton et al., 2018; Rose and Worley, 2020)。本研究における薬剤感受性試験の結果を見ると、肺腫瘍オルガノイドの系統や処置する薬剤によってその感受性が異なることがわかった (図 1-6)。これは元の被検犬における薬剤感受性も個々によって異なる可能性を示唆している。ビノレルビンとパクリタキセルに関しては、比較的低濃度で各系統の肺腫瘍オルガノイド、特に LC21001 や LC21007, LC22001 の細胞生存率を抑制することが明らかとなった (図 1-6)。ビノレルビンは、ビンカアルカロイドであるビンブラスチンの半合成誘導体であり、人の原発性肺腫瘍に対して汎用されており (Greco and Hainsworth, 1999; Camerini et al., 2021; Chae et al., 2022)、一定の有効性が報告されている。また抗腫瘍活性を有する天然物質の一つであるパクリタキセルも人の原発性肺腫瘍の治療にしばしば使用されているが (Greco and Hainsworth, 1999; Camerini et al., 2021; Chae et al., 2022)、犬原発性肺腫瘍に対してはほとんど使用されておらず (Hershey et al., 1999; Chae et al., 2022)、犬の肺腫瘍の治療にパクリタキセルがより有用である可能性を示唆している。こうしたことを考慮すると、肺腫瘍罹患犬の個別医療につながる有用な薬剤スクリーニングツールとしても肺腫瘍オルガノイドの利用可能性が示された。

分子標的薬に焦点を当てると、多種の薬剤が人医療において活躍している一方で、獣医療での臨床応用はイマチニブやマシチニブ、トセラニブ (London, 2009; Arita et al., 2013) などに限られている。しかしながら研究レベルではこうした分子標的薬の応用も活発になってきており、ラパチニブ (Sakai et al., 2018; Maeda et al., 2022) やゲフィチニブ (Fukuoka et al., 2011; Noguchi et al., 2021) を利用した犬の研究報告なども認められる。特に HER2 や EGFR の過剰発現や変異が見られる腫瘍では、それらの阻害薬であるラパチニブやゲフィチニブの抗腫瘍効果と相関が見られるという報告もされている (Sakai et al., 2018; Maeda et al., 2022)。本研究においても、犬の肺腫瘍オルガノイドを用いてラパチニブおよびゲフィチニブの抗腫瘍効果を検討した (図 1-7)。結果として、両薬剤処置による細胞生存率と HER2 あるいは EGFR の高発現レベルとの間には一定の相関が認められた (図 1-8, 9, 10)。しかしながら必ずしも一

概には言及できず, 例えばHER2やEGFRの発現レベルがそれほど高くないにもかかわらず, LC21001 オルガノイドはラパチニブとゲフィチニブに対して高い感受性を示していた (図 1-7,9)。これはLC21001 が他の系統と異なり, 肺原発性神経内分泌腫瘍に由来していることも関与しているかもしれない。一般的に肺原発性の神経内分泌腫瘍は, 最も一般的な肺腫瘍サブタイプである肺腺癌や肺扁平上皮癌などとは異なり, 生存期間がより長いことも報告されている (McPhetridge et al., 2021)。このことが今回の結果と関連している可能性が考えられる。対照的に, LC22001 オルガノイドはHER2 およびEGFRの発現量が高いにもかかわらず, 両阻害薬に対する感受性が比較的低い結果となっていた。(図 1-7,9,10)。本研究内ではデータとして示していないが, LC22001 オルガノイドにおける extracellular signal-regulated kinase (ERK) や serine/threonine-specific protein kinase として知られるAKTのリン酸化レベルが他の系統よりも明らかに高かったことが分かっている。ERK や AKT は EGFR/HER2 シグナル経路のより下流に位置するため, これらの分子の活性化が高いことがゲフィチニブやラパチニブに対する耐性を引き起こしている可能性が考えられた。

今回の結果を総合すると, 犬の原発性肺腫瘍組織を用いることで良好な肺腫瘍オルガノイドの培養が可能であることが分かった。作出した肺腫瘍オルガノイドは元の組織の分子的特徴や被検犬の個体ごとの薬剤感受性の違いを反映している可能性があり, 今後新たな研究ツールとして有用な肺腫瘍オルガノイドモデルとして期待される。

小括

犬の原発性肺腫瘍の発症率は低いものの、病態初期における臨床症状が乏しいことから早期発見が難しい腫瘍と言われている。現在のところ外科的肺葉切除が根治的な治療法として知られているものの、切除不能あるいは転移性の場合には有効な内科療法は確立されていないため難治性腫瘍に分類される。原発性肺腫瘍に対する新たな内科療法の研究が求められるが、症例数の少なさや適切な研究モデルの乏しさが問題となっている。そこで本研究では新たな実験モデルの開拓を目指し、肺腫瘍罹患犬由来の腫瘍組織を用いた肺腫瘍オルガノイド培養法に着目した。オルガノイド培養法は、特に上皮系細胞を培養ディッシュ上で立体培養を行うことで、平面培養よりも生体内での挙動や分子的特徴が維持されると言われていることから (Pampaloni et al., 2007; Clevers, 2016; Elbadawy et al., 2019a; Blutt and Estes, 2022; Salgueiro et al., 2022; Yoshida et al., 2022; Abugomaa et al., 2023), 人医療では様々な腫瘍オルガノイドの作出が試みられている。一方で、獣医療での応用は依然として少ない。そこで本研究では、肺葉切除により摘出した犬の肺腫瘍組織を利用して新たな実験モデルとしての肺腫瘍オルガノイド培養法の確立を試みた。各腫瘍組織は総じて良好なオルガノイドを形成し、コンタミネーションなどがない限り、凍結保存や再培養などを経て数継代に渡り増殖が維持されていた。元の腫瘍組織と肺腫瘍オルガノイドの組織学的構造を比較すると、肺腺癌に特徴的な腺腔構造の維持やマーカータンパクの発現の維持などが確認され、さらに細胞増殖シグナル経路の代表的な遺伝子である HER2 や EGFR 発現に関しても組織と類似した発現レベルが維持されていた。化学療法剤や分子標的薬に対する薬剤感受性についても、肺腫瘍オルガノイドの系統ごとや薬剤の種類によって異なる様子が見られていたため、元の被検犬の個別の特徴や遺伝子発現などを反映している可能性が示唆された。これらのことを総括すると、原発性肺腫瘍罹患犬由来の肺腫瘍オルガノイドは *in vivo* での特性を模倣した新たな実験モデルとして有用であることが示された。

第 2 章

犬悪性中皮腫オルガノイド培養法の確立
および二次元培養細胞との比較解析

緒言

中皮は上皮細胞と間葉系細胞の両方の性質を持つ中皮細胞から構成される漿膜上皮であり、体腔や臓器の表面を覆っている (Kawanishi, 2016)。中皮細胞は、通常は1枚のシート状の層で存在するが、炎症や腫瘍形成によって増殖が活性化されると体腔内滲出液中で重層化し、遊離する (Hiriart et al., 2019)。悪性中皮腫は、人をはじめ犬や猫、牛、マウスなど多種の哺乳動物における漿膜腔で発生することが知られている。人では胸膜中皮腫が最も一般的であり、特にアスベスト曝露との関連が指摘されている (Tranchant et al., 2018) が、犬における正確な原因は不明である。WHO の分類 (Dacic, 2022; Sauter et al., 2022) によると、中皮腫は組織学的に3つの主要な亜型（上皮腫型、肉腫型、二相性）に分類され、犬は人と同様に自然発症することから治療研究におけるモデル動物としても注目されている (Elbadawy et al., 2019a; Abugomaa et al., 2020b; Yamamoto et al., 2021; Abugomaa et al., 2022; Elbadawy et al., 2022)。

犬における悪性中皮腫の発生はまれだが、主に胸膜や腹膜、心膜などの中皮から発生し、総鞘膜における発生も報告されている (Moberg et al., 2022)。中年齢から高齢の犬が罹患するが、若年齢での発生も見られ (Kim et al., 2002; Vural et al., 2007; Abugomaa et al., 2020a)、主な臨床症状は胸水や腹水の貯留に伴う頻呼吸や呼吸困難である (Moberg et al., 2022)。治療法として、体腔内または静脈内へのプラチナ製剤の投与や5-FU、カルボプラチンの単独療法またはミトキサントロンとの併用療法が用いられているが (Moore et al., 1991; Seo et al., 2007; Spugnini et al., 2008; Moberg et al., 2022)、現在のところ最適な治療法はなく、治療抵抗性の難治性腫瘍である (Moberg et al., 2022)。

人の悪性中皮腫研究では、マウスモデル (Colin et al., 2018; Seastedt et al., 2021)、細胞株 (Chernova et al., 2016; Cramer et al., 2019)、スフェロイド (Kim et al., 2005; Xiang et al., 2011; Barbone et al., 2016) などが用いられてきた。一方で、犬の悪性中皮腫は症例数が非常に少なく病態進行が早いため、なかなか研究が進んでいない。その多くは症例報告 (Hudson et al., 2014; Zeira et al., 2020; Moberg et al., 2022) に基づいており、利用可能な悪性中皮腫モデル細胞はほとんどない (Closa et al., 1999; Seo et al., 2007; Spugnini et al., 2008; Lapp et al.,

2014; Zeira et al., 2020)。こうした背景から犬悪性中皮腫の治療や動態研究を促進するための新たな実験モデルの確立が必要であると考え、近年人医療で注目されている三次元オルガノイド培養法に着目した。これまで、オルガノイド培養法の多くは上皮系幹細胞に由来していたが、非上皮系細胞である悪性中皮腫のオルガノイド培養法は未だ確立されておらず、本章での研究が初めての試みである。犬の悪性中皮腫オルガノイドが確立されれば、悪性中皮腫の生物学研究や治療戦略を改善するための有用な実験モデルとなり得ることが期待される。

そこで第2章では、中皮腫罹患犬の胸水検体を利用した悪性中皮腫オルガノイドの培養法を確立し、二次元細胞との比較解析を通じて、培養モデルとしての有用性を検討することを目的とした。

実験材料および方法

材料

本研究で用いた培養液は、Advanced Dulbecco's Modified Eagle's Medium (Ad. DMEM) を基礎として、Wnt3a や Noggin, R-Spondin を分泌する L-WRN (CRL-3276TM) 細胞 (Waltham, MA, USA) を用いて研究室内で調整した WNR 調整培地に加え、種々の幹細胞サプリメントと成長因子を添加した。使用した幹細胞サプリメントと成長因子は GlutaMax, 100 µg/ml Primocin, 1 mM N-アセチル-L-システイン, 10 mM ニコチンアミド, 500 nM A83-01, 50 ng/ml EGF, 5 ng/ml FGF2 (R&D Systems Inc. Minneapolis, MN, USA), 5 ng/ml FGF7, 25 ng/ml FGF10 (Pepro Tech), 100 ng/ml Insulin-like Growth Factor (以下 IGF) (Novus Biologicals), Hydrocortisone (東京化成工業) および Heparin (東京化成工業) である。使用した化学療法剤は、カルボプラチン, ドキソルビシン, シスプラチンおよびゲムシタビン (Cayman Chemical) である。免疫化学染色に用いた一次抗体は、抗 cytokeratin pan (AE1/AE3) 抗体 (Novus Biologicals), 抗 Mesothelin 抗体 (Abcam), 抗 Wilms' tumor-1 (WT-1) 抗体 (Dako-Agilent, Technologies Inc., Santa Clara, CA, USA), 抗 Vimentin 抗体 (Santa Cruz Biotechnology, Dallas, TX, USA) および抗 E-Cadherin 抗体 (BD Bioscience, San Jose, CA, USA) である。二次抗体は EnVision+Dual Link System-HRP を使用した。

被検犬および胸水検体の採材

2019 年から 2021 年において東京農工大学動物医療センターを受診し、胸水と心嚢水貯留を主症状として、心膜切除と病理組織学検査から心膜中皮腫と診断された犬 3 頭を被検犬とした。被検犬は定期的な胸水貯留を呈し、カルボプラチンの胸腔内投与により治療を受けた。胸水検体は治療前後の異なる時期に採取し、採取後すぐに保存用培養液 (表 2-1) と混合後、獣医薬理学研究室へ移送した。次いで、保存用培養液に入れたまま一晩 4°C で転倒混和した。その後 600 g で 3 分間遠心分離し、得られた沈渣細胞塊を PBS で 3 回洗浄し、悪性中皮腫オルガノイド培養あるいは二次元培養へ供した。得られた細胞塊に血液成分が多い場合は、室

温で RBClysis buffer (pluriSelect, Leipzig, Germany) と 3 分反応させた後、再度 PBS で洗浄した。被検犬および胸水検体に関する詳細情報を表 2-2 に示した。なお各胸水検体の利用に関して、被検犬の飼い主に研究内容・目的・手法について十分な説明をし、同意を得た上で「東京農工大学付属動物病院倫理委員会」の承認（承認番号：0016012）を得て適切に実施した。

悪性中皮腫オルガノイドの作出および継代培養

PBS で 3 回洗浄した胸水検体から得られた細胞塊をマトリゲルと混合し、40 μ l ずつ 24 ウェルプレートへ播種した。37°C の CO₂ インキュベータ内で 30 分間静置し、マトリゲルが固まったことを確認後、オルガノイド培養液（表 2-3）を各ウェル 500 μ l ずつ添加して 37°C の CO₂ インキュベータ内で培養した。その後は 1 週間に 3 回培養液を交換し、マトリゲル内のオルガノイドの密度がゲルに対して 70%程度に達した時点で継代培養した。継代培養の際はウェルの培養液を吸引し、PBS で 1 回洗浄後、PBS で希釈した 5mM の EDTA/PBS を添加し、氷上で 90 分静置しマトリゲルを緩徐に溶解した。次いで PBS で洗浄し、TrypLE を用いて 37°C で 4 分間トリプシン処置を行い、ピペッティングにより細胞同士を分離させた後に 10% FBS を用いて中和させた。その後、600g で 3 分間遠心分離を行い、得られた細胞塊を新たなマトリゲルと混合し、40 μ l ずつ 24 ウェルプレートへ播種した。37°C の CO₂ インキュベータ内で 30 分間静置し、マトリゲルが固まったことを確認後、オルガノイド培養液（表 2-3）を各ウェル 500 μ l ずつ添加して 37°C の CO₂ インキュベータ内で培養した。なお表 2-3 のオルガノイド培養液成分に含まれる Hydrocortisone と Heparin は MC20001 の初代培養時のみ添加し、培養液の最適化以降は培養液に添加していない。

悪性中皮腫二次元培養細胞の作出および継代培養

PBS で 3 回洗浄した胸水検体から得られた細胞塊を 3 ml の二次元培養液（表 2-4）と混合した後、6 cm ディッシュへ播種し、37°C の CO₂ インキュベータ内で培養した。その後は 1 週間に 3 回培養液を交換し、細胞が 70%程度コンフルエントに達した時点で継代培養した。継

代培養の際はディッシュの培養液を回収し、PBS で 1 回洗浄後、5 mM の EDTA/PBS を添加し、37°C で 10 分反応させた。次いで TrypLE を用いて 37°C で 4 分間トリプシン処置を行い、ピペッティングにより細胞を回収後、10%FBS で中和させた。600 g で 3 分間の遠心分離により細胞塊を回収し、PBS で洗浄後、新たに 3 ml の二次元培養液と混合し、6 cm ディッシュへと播種することで継代培養を行った。なお表 2-4 の二次元細胞培養液成分に含まれる Hydrocortisone と Heparin は初代培養時のみ添加し、オルガノイド培養液の最適化以降は条件をそろえるために二次元培養液にも添加していない。

最適なオルガノイド培養液の成分検討

作出した MC20001 の初代培養オルガノイドが直径 100 μ m 程度に成長したことを確認後、継代培養と同様に 5 mM の EDTA/PBS を用いて氷上で 90 分反応させ、37°C で 3 分 TrypLE と反応させることでトリプシン処置を行った。その後 70 μ m のセルストレーナー (Falcon, Cary, NC, USA) を通し、10%FBS でトリプシンの反応を中和させた。細胞数を計数後、600 g で 3 分間遠心分離し、得られた細胞塊とマトリゲルを混合し、8 μ l 中に 2000 個ずつオルガノイド細胞が含まれるように 96 ウェルプレートへ播種させた。37°C で 20 分間、CO₂ インキュベータで静置し、ゲルが固まった後に異なる成分のオルガノイド培養液を 100 μ l ずつ添加し、7 日間培養することで悪性中皮腫オルガノイド培養に最適な培養成分の検討を実施した。各培養液は 3 日目に 1 度交換し、7 日目にプレストブルーアッセイキットとマイクロプレートリーダーを使用し、585 nm の波長で吸光度を計測した。各培養液の内容は次の通りである。(1) コントロール培養液：Ad. DMEM に 1% Gibco GlutaMax と 100 μ g/ml Primocin を添加、(2) WNR 培養液：コントロール培養液と WNR 調整培地を 1:1 で混合、(3) から (7) の培養液はコントロール培養液にそれぞれ (3) 50 ng/ml の EGF, (4) 5 ng/ml の FGF2, (5) 5 ng/ml の FGF7, (6) 25 ng/ml の FGF10, (7) 100 ng/ml の IGF を含んだ培養液とした。

悪性中皮腫オルガノイドのヘマトキシリン・エオジン染色および免疫組織化学染色

24 ウェルプレートのマトリゲル内で増殖した悪性中皮腫オルガノイドを PBS で 1 度洗浄

し、4%PFA を用いて1晩4°Cで固定した。その後常法に則り、アルコールおよびキシレンへの浸漬を経て、パラフィンに包埋した。4 μ m 厚の薄切切片を作製し、オルガノイドの組織学的形態評価のためにヘマトキシリン・エオジン染色を行った。

免疫組織化学染色では、切片の脱パラフィン後、エタノールへ段階的に浸漬・水和させ、10mM のクエン酸緩衝液 (pH6.0) 中でオートクレーブによる 121°C・5 分間の賦活化処理を行った。内因性ペルオキシダーゼの失活のために 1%H₂O₂/methanol 溶液中に室温で 30 分浸漬させた。10% NGS でブロッキングした後、抗 AE1/AE3 抗体 (1:100) あるいは抗 Mesothelin 抗体 (1:100)、抗 WT-1 抗体 (Ready-to-use)、抗 Vimentin 抗体 (1:200)、抗 E-Cadherin 抗体 (1:200) を 4°Cで一晩反応させた。その後 EnVision+Dual Link System-HRP を用いて二次抗体と室温で 30 分反応させ、DAB を用いて発色させた。すべての切片はヘマトキシリンを用いて対比染色を行った。

悪性中皮腫二次元細胞の免疫細胞化学染色

悪性中皮腫二次元細胞をマイクロカバーガラス上へ播種・培養し、適当に増殖した後、PBS で洗浄した。マイナス 20°Cで保存していたメタノールを用いて 4°Cで 5 分固定した。その後 10mM のクエン酸緩衝液 (pH6.0) 中でオートクレーブによる 121°C・5 分間の賦活化処理を行った。内因性ペルオキシダーゼの失活のために 1%H₂O₂/methanol 溶液中に室温で 20 分浸漬させた。10% NGS でブロッキングした後、抗 AE1/AE3 抗体 (1:100) あるいは抗 Mesothelin 抗体 (1:100)、抗 WT-1 抗体 (Ready-to-use)、抗 Vimentin 抗体 (1:200)、抗 E-Cadherin 抗体 (1:200) を 4°Cで一晩反応させた。その後 EnVision+Dual Link System-HRP を用いて二次抗体と室温で 30 分反応させ、DAB を用いて発色させた。すべての切片はヘマトキシリンを用いて対比染色を行った。

悪性中皮腫オルガノイドの電子顕微鏡解析

悪性中皮腫オルガノイドをマトリゲルごと 15 ml チューブに回収し、2.5%グルタルアルデヒド (pH7.4) を用いて1晩4°Cで固定した。その後 0.1 M リン酸緩衝液 (pH7.4) で洗浄し、

アプライドメディカルリサーチ（大阪・日本）へ電子顕微鏡解析を依頼した。得られた電子顕微鏡像の組織学的特徴に関して、同機関の病理診断医によって評価された。

悪性中皮腫オルガノイドおよび二次元培養細胞に対する薬剤処置ならびに細胞生存率

各化学療法剤（カルボプラチン，ドキソルビシン，シスプラチン，ゲムシタビン）は一般的な動物病院で用いられる治療濃度や製薬会社のデータを基に (Moore et al., 2008; Relan et al., 2013; Husain et al., 2018; Moberg et al., 2022) 適切な濃度を算出し，オルガノイドと二次元培養細胞へ曝露した。薬剤はカルボプラチン (0.1, 1, 10, 100 µg/ml) ならびにドキソルビシン (0.1, 1, 10, 100 nM)，シスプラチン (0.1, 1, 10, 100 µM)，ゲムシタビン (0.1, 1, 10, 100 µM) を用いた。

オルガノイドは PBS で洗浄後，5mM の EDTA/PBS および TrypLE を用いたトリプシン処置を実施し，70 µm のセルストレーナーに通して FBS で中和した。得られた細胞を顕微鏡下で計数し，96 ウェルプレートの 1 ウェルあたりに 2000 個ずつ播種されるようにマトリゲルと混合した。各薬剤に対して 3 ウェルずつ各 8 µl の細胞懸濁ゲルを播種した。ゲルが固まった後にオルガノイド培養液（表 2-3）を 1 ウェルあたり 100 µl ずつ添加し，37°C の CO₂ インキュベータ内で 1 晩培養した後，溶媒である DMSO (1mg/ml) あるいは以下に示す薬剤を処置して 72 時間培養した。その後，プレストブルーアッセイキットとマイクロプレートリーダー使用し，585 nm の波長で吸光度を計測した。

二次元細胞はオルガノイドと同様に PBS で洗浄後，5mM の EDTA/PBS および TrypLE を用いたトリプシン処置を行い FBS で中和した。その後細胞数を計数し，96 ウェルプレートの 1 ウェルあたり 100 µl の培養液中に 2000 個ずつ細胞が播種されるように二次元細胞培養液（表 2-4）と混合し，各薬剤に対して 3 ウェルずつ細胞を播種した。37°C の CO₂ インキュベータ内で 1 晩培養した後，溶媒である DMSO (1mg/ml) あるいは上述の薬剤を処置して 72 時間培養した。その後，プレストブルーアッセイキットとマイクロプレートリーダー使用し，585 nm の波長で吸光度を計測した。

RNA シークエンス解析

NucleoSpin kit (タカラバイオ, 日本) を用いて悪性中皮腫オルガノイドおよび二次元培養細胞からトータル RNA (以下 tRNA) を抽出し, さらに RiboMinus Eukaryote System v2 (Thermo Fisher Scientific Inc., Waltham, MA, USA) を用いてリボソーム RNA (以下 rRNA) を除去後, メッセンジャー RNA (以下 mRNA) を得た。mRNA のライブラリ調整は NEBNext Ultra RNA Library Prep Kit (Illumina Inc., Tokyo, Japan) を用いて行い, RNA シークエンス解析をアゼンタ株式会社 (東京・日本) へ依頼した。2×150 bp で 3.5×10^8 フラグメントの RNA シークエンス解析は Illumina NovaSeq instrument (Illumina Inc.) を用いて実施された。Fastaq データから得られたリードは STAR (Version 2.5.1b) を用いてリファレンスゲノム (CanFam3.1) へマッピングされた。各検体のフラグメント数は RSEM (Version 1.3.3) を用いて取得され, M-value 法を用いて一般化された。最終的に得られたデータを基にボルケーノプロットやヒートマップ, 遺伝子セットエンリッチメント解析 (以下 GSEA) を実施した。差次的発現遺伝子は, <0.05 の偽発見率 q 値閾値に基づいて認識され, 2 倍以上の変化を示し, q-value が <0.05 の遺伝子を差次的発現とみなした。GSEA は Java コマンドラインプログラム GSEA (version 4.1.0) と Molecular Signatures Database v7.4 を用いて行った (Subramanian et al., 2005)。

定量的リアルタイム PCR 解析

悪性中皮腫オルガノイドおよび二次元培養細胞から tRNA を抽出後, QuantiTect Reverse Transcription Kit (Qiagen Hilden, Germany) を用いて First-strand cDNA を合成し, QuantiTect SYBRI Kit (Qiagen Hilden) と StepOnePlus Real-Time PCR System (Applied Biosystems, Waltham, MA, USA) により, 定量的リアルタイム PCR 解析を実施した。2- $\Delta\Delta$ Cq 法と, 定量により得られたサイクル閾値 (Ct 値) を用いて, mRNA 存在量の倍数変化を算出した。設計したプライマー配列を表 2-5 に示した。

統計学的解析

得られた定量値は平均値±標準誤差として示した。統計学的評価は, SigmaPlot ソフトウエ

アを用いて一元配置分散分析（ANOVA）を行い，Student's *t*-test を用いて統計解析を実施した。両側 P 値が<0.05 の場合，データが統計的に有意であるとみなした。

結果

悪性中皮腫罹患犬の胸水検体からの悪性中皮腫オルガノイドの培養

心膜中皮腫と診断された犬（表 2-2）の胸水検体からマトリゲルとともに三次元培養を実施したところ、すべての検体から球状のオルガノイドの形成が認められた（図 2-1, 2）。各検体は培養後 7 日以内に球状のオルガノイドを形成し（図 2-2A）、管腔状から充実性の形態を示していた（図 2-2B）。形成されたオルガノイドの形態を電子顕微鏡下で確認し、その代表的な写真を図 2-3 に示した。オルガノイドの内腔側に位置する細胞頂端面では、表面に多数の発達した微絨毛（図 2-3c）が認められ、細胞質内には飲作用胞（図 2-3d）やグリコーゲン顆粒（図 2-3d）、ミクロフィラメント（図 2-3e）、発達したゴルジ装置などが確認されたことから、生体における中皮細胞の特徴を有していることが示された。さらに非常に大きな核小体やユークロマチン（図 2-3a, b）、ミクロフィラメントのランダムな配列（図 2-3e）と言った正常細胞からやや逸脱した所見から、悪性所見を併せ持っていることが示唆された。これらの結果から胸水検体から作出したオルガノイドが悪性中皮腫の特徴を反映していることが示された。しかしながら、大部分の悪性中皮腫オルガノイドは継代培養とともに増殖速度が低下し、最終的には 5 から 6 継代目に増殖の停止が認められた。

一方で同被検犬の胸水検体から二次元培養を実施したところ、大部分の検体は間葉系のような形態を示し（図 2-4）、悪性中皮腫オルガノイドと比較して 10 継代以上の長期培養が可能であった。検体 MC21001 においては、培養当初は他の検体と同様に間葉系のような形態を示していたが、長期継代を経て形質転換を起こし、上皮系のような敷石状の細胞形態を示していた（図 2-1E）。さらに、これら胸水検体由来の悪性中皮腫二次元細胞を 2~3 継代した後、EDTA/PBS および TrypLE を用いてディッシュから遊離・回収し、細胞塊をマトリゲルへ包埋して三次元培養を試みたが、胸水検体由来の三次元培養と異なりオルガノイドの形成は認められなかった（図 2-5）。

悪性中皮腫オルガノイドに対する最適な培養成分の検討

先行文献によると人の悪性中皮腫二次元培養において Roswell Park Memorial Institute - 1640 (以下 RPMI-1640) (Sigma-Aldrich) や DMEM が使用されてきたが (Thurneysen et al., 2009; Relan et al., 2013; Horio et al., 2020; Mierzejewski et al., 2021), これまでに悪性中皮腫オルガノイドに対する適切な培養液成分の検討はされてこなかった。そこで今回作出した悪性中皮腫オルガノイドを用いて, 培養に最適な条件検討を実施した。約 2000 個の悪性中皮腫オルガノイドを 1 つの培養液に対して 3 ウェルずつ 96 ウェルプレートへ播種し, 7 日間培養後にマイクロプレートリーダーを用いて細胞増殖率を比較した (図 2-6)。7 日目の細胞増殖率は, WNR 培養液あるいはコントロール培地に EGF または FGF2 を添加した場合において顕著に増加していた (図 2-7A,B)。一方で FGF7 または FGF10, IGF を添加した培養液では, コントロールに対する顕著な増殖効果は得られなかった。これらの結果から本研究では悪性中皮腫オルガノイドの培養液として WNR 調整培地, EGF, FGF2 を最適な培養成分として選択・使用した (図 2-7B, 表 2-3)。

悪性中皮腫オルガノイドおよび二次元培養細胞における中皮腫マーカー発現の比較

免疫組織化学染色および免疫細胞化学染色を用いて悪性中皮腫オルガノイドおよび二次元細胞におけるマーカータンパク発現を比較した。上皮系マーカーである AE1/AE3 や中皮腫マーカーとして知られる WT-1 ならびに Mesothelin, さらに間葉系マーカーである Vimentin の発現が悪性中皮腫オルガノイドにおいて確認された (図 2-8A)。抗 AE1/AE3 抗体および抗 Vimentin 抗体に対する陽性細胞数は他の 2 つの抗体よりも高く, 各抗体に対する陽性率はオルガノイドと二次元細胞間で異なる様子が認められた (表 2-6)。抗 AE1/AE3 抗体および抗 Vimentin 抗体に対する陽性細胞は, いずれの検体におけるオルガノイドおよび二次元培養細胞の両者において確認された一方で, 抗 WT-1 抗体や抗 Mesothelin 抗体に対する陽性細胞の比率は検体によって異なり, 中にはほとんど検出されないものも認められた (図 2-8, 表 2-6)。

悪性中皮腫オルガノイドおよび二次元培養細胞における薬剤感受性の比較

作出した悪性中皮腫オルガノイドの前臨床モデルとしての有用性を評価することを目的として、4種類の化学療法剤（カルボプラチン、シスプラチン、ドキソルビシン、ゲムシタビン）をオルガノイドへ処置し、その薬剤感受性を二次元培養細胞と比較した。各薬剤処置下におけるオルガノイドの代表的な写真（MC21009）と細胞生存率の推移（MC21001, MC21009）を図 2-9 に示した。MC21001 オルガノイドを見ると、低濃度のカルボプラチンあるいはシスプラチン、ドキソルビシン処置下において二次元培養細胞よりも抵抗性を示す傾向が見られた一方で、最高濃度のカルボプラチンやシスプラチン、ドキソルビシンに対しては類似した感受性が認められた（図 2-9B）。MC21009 オルガノイドでは、高濃度のシスプラチン処置により細胞生存率が大幅に減少したが、他の3剤の処置では抵抗性を示した（図 2-9B）。さらに低濃度のドキソルビシンおよび高濃度のゲムシタビン処置下においてオルガノイドの方が二次元培養細胞と比較してやや抵抗性を示す傾向が認められ、カルボプラチンやシスプラチン処置に対しては類似した感受性を示していた（図 2-9B）。別の検体である各薬剤に対するオルガノイドおよび二次元培養細胞における IC50 値を表 2-7 に示した。

悪性中皮腫オルガノイドおよび二次元培養細胞における遺伝子発現プロファイルの比較

悪性中皮腫オルガノイドおよび二次元培養細胞における遺伝子発現の違いを探索するために、RNA シークエンス解析を実施した。その結果、両者間で 987 遺伝子の発現レベルが異なることが示され、内 536 遺伝子の発現がオルガノイドにおいて亢進していることが示唆された（図 2-10A）。特に差が認められた上位 50 遺伝子をヒートマップで表した（図 2-10B）。また RNA シークエンス解析から得られたデータを基に GSEA 解析を実施したところ、悪性中皮腫オルガノイドでは二次元培養細胞と比較して、**cell adhesion molecule binding** や **integrin binding**, **cadherin binding** パスウェイといった細胞接着に関する遺伝子セットが顕著に濃縮されていることが示唆された（図 2-11）。興味深いことに、**Mesothelin** の mRNA 発現レベルは二次元培養細胞よりもオルガノイドの方が高い傾向が認められ、一方で **WT-1** の mRNA 発現レベルは検体間で異なる様子が見られた（図 2-12）。

悪性中皮腫オルガノイドおよび二次元培養細胞における細胞接着関連分子発現の比較

RNA シークエンス解析および GSEA 解析の結果を基に、細胞間接着に関連した分子の発現レベルについて定量的リアルタイム PCR を用いて解析した (図 2-13)。各遺伝子発現レベルはそれぞれの検体における GAPDH の発現レベルに対する相対値として算出され、4 回分のデータの平均値を比較解析した。CDH1 (E-Cadherin) は細胞間接着に関連した上皮マーカーとして細胞膜上に発現することが知られており、一方で CDH2 (N-Cadherin) や VIM (Vimentin) は間葉系細胞や上皮間葉転換に関連して発現が上昇することが知られている。インテグリンサブユニット α (以下 ITGA) は大きなサブタイプファミリーであり、ITGAE や ITGAV, ITGA2, 3, 6 などの存在が知られている。これらは細胞間接着や腫瘍浸潤などに関与している。定量的リアルタイム PCR では、悪性中皮腫オルガノイドでは二次元培養細胞と比較して、CDH2 および VIM 発現レベルの減少傾向が認められ、CDH1 の有意な増加が認められた (図 2-6A)。この結果を受け、免疫化学染色を用いて E-Cadherin のタンパク発現を確認すると、定量的リアルタイム PCR の結果と同様にオルガノイドでは顕著に E-Cadherin 陽性細胞が検出されたのに対して二次元培養細胞ではほとんど検出されなかった (図 2-14)。

考察

本研究では、胸水検体を用いることで犬悪性中皮腫オルガノイドの作出に成功し、二次元細胞との比較解析により、細胞接着に関する特性の違いを明らかにした。本研究の主な結果は以下の通りである。1) 胸水由来の犬悪性中皮腫オルガノイドは球状または管腔状の形態を示し、中皮腫マーカーや中皮細胞の性質さらに悪性腫瘍の特徴を再現した (図 2-2, 3, 8, 表 2-6)。2) EGF, FGF2, WNR 調整培地が犬悪性中皮腫オルガノイドの増殖に最適な培養成分であることがわかった (図 2-6, 7)。3) 犬悪性中皮腫オルガノイドは二次元細胞と比較して、低濃度における各化学療法剤に対して抵抗性を示したが、高濃度の化学療法剤投与下ではオルガノイドと二次元細胞との間にほとんど差は認められなかった (図 2-9, 表 2-7)。4) 犬悪性中皮腫二次元細胞と比較して、胸水由来の犬悪性中皮腫オルガノイドは E-Cadherin などの細胞接着分子において異なる特徴を有していた (図 2-10, 11, 13, 14)。これらのデータを総合すると、犬悪性中皮腫オルガノイドは二次元細胞とは異なる特徴を示し、悪性中皮腫治療の新たな知見を提供する新しい実験モデルとして利用できる可能性がある。

WHO の分類による人の悪性中皮腫と同様に、犬の悪性中皮腫も「上皮腫型」と「肉腫型」あるいは「二相性」の亜型があることが知られている (Schramm et al., 2010; Fassina et al., 2012; D'Angelo and Di Francesco, 2014; Travis et al., 2015; Son et al., 2018; Zauderer et al., 2021)。これまでに人の悪性中皮腫では胸水や組織検体などから細胞株が樹立されており、新たな治療標的の探索や遺伝子解析なども実施されてきた (Manning et al., 1991; Philippeaux et al., 2004; Usami et al., 2006; Relan et al., 2013; Colin et al., 2018; Su et al., 2020)。さらに、アスベストへの曝露 (Suzui et al., 2016; Chernova et al., 2017; Shamseddin et al., 2021) やベクターウイルスを用いた遺伝子操作 (Jongsma et al., 2008; Sementino et al., 2018; Kukuyan et al., 2019; Badhai et al., 2020; Shamseddin et al., 2021) によって誘発された悪性中皮腫のマウスモデルも開発されている。しかし、これらのモデルは動物種の違いや免疫系の欠如により、本来の腫瘍の挙動を完全には反映できていないことも指摘されている (Kalra et al., 2015; Wu et al., 2017; Shamseddin et al., 2021)。従って、新たな患者細胞由来の培養モデルを開発すること

に大きな関心が集まっている。患者由来の腫瘍オルガノイドモデルは、組織幹細胞に由来し、培養ディッシュ内で立体的に元の組織を模倣することができる三次元培養モデルであり、元の組織の特徴 (Clevers, 2016; Bleijs et al., 2019) や個体間の腫瘍内外の不均一性 (Huang et al., 2015; van de Wetering et al., 2015) を反映している。人においては中皮腫モデルとしてのオルガノイドの利用可能性 (Mazzocchi et al., 2018; Shamseddin et al., 2021; Gao et al., 2022) やスフェロイド (Kim et al., 2005; Kim et al., 2012; Barbone et al., 2016) としての三次元培養に関する報告もされているが、実際にオルガノイド培養法を樹立した報告はほとんどない。今回、本研究において心膜中皮腫と診断された被検犬の胸水から初めて犬の悪性中皮腫オルガノイド培養を試み、電子顕微鏡画像所見から作出したオルガノイドが悪性中皮腫細胞の微細な構造を反映していることを示した (図 2-3)。さらに免疫組織化学染色により中皮腫オルガノイドがサイトケラチンや Vimentin, 中皮腫マーカー (WT-1 と Mesothelin) を発現していることも確認された (図 2-8A, 表 2-6)。これらの結果は樹立した胸水検体由来のオルガノイドが犬悪性中皮腫の特徴を再現可能であることを示しており、中皮腫オルガノイド培養法を樹立できたと考えられた。一方で依然として長期継代を行う点に課題が残る結果となった。

犬悪性中皮腫オルガノイドの培養に適した培養サプリメントの検討も実施することで、培養効率や長期継代に適した培養法を考察した。人における報告では、悪性中皮腫の二次元細胞 (Relan et al., 2013; Horio et al., 2020; Su et al., 2020; Mierzejewski et al., 2021) および三次元細胞 (Mazzocchi et al., 2018; Su et al., 2020; Gao et al., 2022) のために RPMI-1640 または DMEM を用いて培養を行ったと報告されている。Kim らの報告によると、中皮腫特異的培地である LHC-MM (Lechner and LaVeck 培地; Biosource International, Camarillo, CA) を用いて中皮腫細胞を培養しても、中皮腫のスフェロイド形成は観察されなかった (Kim et al., 2005)。Tsugeno らは、EGFR 過剰発現で知られる中皮腫細胞株 MSTO を STK1 および STK2 (DS ファーマバイオメディカル株式会社, 大阪, 日本) などの無血清培地で培養すると、DMEM 培地と比較して細胞増殖率が有意に低下することを報告している (Tsugeno et al., 2014)。一方で、特に三次元培養に対して適切なサプリメント内容を検討した論文はほとんど認められない。そこで本研究においても適切な培養液条件の検討を行った結果、犬悪性中皮腫オルガノイド

の増殖には Wnt 3a や Noggin, R-Spondin を添加した Ad. DMEM に増殖因子である EGF と FGF2 の添加が必要であることが初めて示された (図 2-7, 表 2-3)。このことは, おそらく Wnt 3a や EGFR, FGFR シグナルが犬悪性中皮腫オルガノイドの増殖に重要な役割を果たしている可能性を示唆している。これまでの報告でも EGFR は, 人の悪性中皮腫患者の大部分で過剰発現していることが指摘されており (Destro et al., 2006; Okuda et al., 2008; Rena et al., 2011), 治療標的としても注目されていた (Dubey et al., 2010; Chia et al., 2020)。その上, FGFR の発現が人の悪性中皮腫と薬剤耐性に関与していることを示唆する研究もあった (Blackwell et al., 2016; Vlacic et al., 2019)。実際に人の悪性中皮腫株の中には FGF 受容体 1 (FGFR1) と FGF2 がともに過剰発現しているものも存在しており (Marek et al., 2014; Blackwell et al., 2016), 悪性中皮腫の増殖促進シグナル分子としても同定されていた。現に FGF2-FGFR を標的とした治療法についてもいくつか研究がなされている (Marek et al., 2014; Blackwell et al., 2016; Schelch et al., 2018; Vlacic et al., 2019)。したがって, 今回確立した犬の悪性中皮腫オルガノイド培地は, 犬だけでなく人の悪性中皮腫オルガノイド培養にも応用できる可能性が期待され, 新たな治療戦略や生物学的研究にも役立てられると思われる。今後はさらなる培養法の検討を試み, より長期継代が実施できるように改善することが課題である。

悪性中皮腫の薬剤感受性試験を行ったところ, 中皮腫オルガノイドも二次元細胞も今回用いた薬剤に対しては比較的抵抗性を示す結果となった (図 2-9, 表 2-7)。過去数十年間における腫瘍治療の進歩にもかかわらず, 悪性中皮腫の化学療法剤や分子標的薬に対する抵抗性は依然として重要な課題である (Elbadawy et al., 2018b; Elbadawy et al., 2019b; Elfadadny et al., 2021)。ある研究では, 三次元培養した人の悪性中皮腫細胞が multicellular resistance と呼ばれる性質を獲得することが報告されている。これは, スフェロイドやオルガノイドがアポトーシスや薬剤に対して二次元細胞よりも抵抗性を示す傾向があることを意味し, *in vivo* で観察される化学療法抵抗性を模倣し, 固形腫瘍の生体における複雑さをより詳細に再現することを示唆している (Barbone et al., 2008; Barbone et al., 2011; Barbone et al., 2016)。本研究における薬剤感受性試験の結果から, 中皮腫オルガノイドと二次元細胞は高濃度のシスプラチンに対しては同程度に感受性が高かったものの, 両者を比較して有意差が見られた薬剤につい

では、オルガノイドの方が二次元細胞よりも比較的抵抗性を示す傾向が認められた(図 2-9B)。このことは先ほど挙げた先行論文の報告と類似しており (Barbone et al., 2008; Barbone et al., 2011; Barbone et al., 2016), 今後さらに多種の薬剤に対して感受性を試験する際には生体をより模した薬剤スクリーニングモデルとして有用である可能性を示している。

また今回、中皮腫オルガノイドと二次元細胞の RNA シークエンス解析から細胞接着に関する遺伝子発現に差が認められた(図 2-11)。特に細胞間接着分子である E-Cadherin 発現はオルガノイドにおいて有意に高く、二次元細胞での発現はほとんど認められなかった(図 2-13, 14)。また、胸水検体から二次元細胞として培養・増殖させた細胞をマトリゲルに包埋培養してもオルガノイドの形成は認められなかった(図 2-5)。過去の研究において、血清および胸水中での soluble cell adhesion molecules や E-Cadherin, intercellular adhesion molecule-1 のといった接着因子の発現レベルは、健常対照と比較して人悪性中皮腫患者で有意に上昇し (Ito et al., 2008; Piazzini et al., 2021), 効率的な接着と疾患の進行に関連していることが示されている (Ito et al., 2008; Tsagkouli et al., 2022)。また、人悪性中皮腫における E-Cadherin の高発現は治療抵抗性と相関することも報告されている (Yuen et al., 2021)。さらに人の悪性中皮腫に関する報告で、胸水中には遊離した中皮腫細胞が集合し細胞塊を成す「遊離球状凝集体」が存在しているといわれており、これも腫瘍の悪性度との相関が示唆されている (Davidson, 2007; Daubriac et al., 2009)。これらのデータと本研究結果を統合すると、悪性中皮腫罹患犬の胸水中には間葉系の性質が強い細胞と上皮系の性質が強い細胞あるいは「遊離球状凝集体」を形成するような細胞といった性質の異なる中皮腫細胞が混在し、初代培養の条件によって異なる性質を持った中皮腫細胞が選択されやすいことが推測される。その結果、犬悪性中皮腫オルガノイドは二次元細胞よりも胸水中に存在する悪性度の高い中皮腫細胞の挙動と性質を高く模倣している可能性が示唆された(図 2-15)。

小括

心膜中皮腫と診断された被検犬の胸水検体から犬悪性中皮腫オルガノイドを初めて作出した。犬悪性中皮腫オルガノイドは球状または内腔状の形態を示し、悪性中皮腫にみられる微細構造やタンパク発現、さらに高い細胞接着性を示していた。これまで言及されてこなかった悪性中皮腫オルガノイドに最適な培養サプリメントとして、Wnt 3a や Noggin, R-Spondin に加え EGF や FGF2 などの増殖因子が必要であることが明らかになった。犬の悪性中皮腫オルガノイドは同時に作出した二次元細胞と比較して、いくつかの化学療法剤に対してやや抵抗性を示し、遺伝子発現プロファイルも異なっていた。過去の研究報告と本研究結果を総合すると、今回樹立した犬悪性中皮腫オルガノイドが本来の腫瘍組織像をより強く反映している可能性が示唆され、人ならびに犬の悪性中皮腫治療に新たな知見を与える実験モデルとして応用できる可能性を見出した。本研究の犬悪性中皮腫オルガノイドモデルは、間葉と上皮の二面性を有した中皮腫細胞の二次元的あるいは三次元的な挙動における特異的な差異を比較や、接着分子の発現能や腫瘍動態を研究するための新たな実験ツールとしての活用が期待できる。

第3章

オルガノイド培養法を利用した 犬原発性肺腫瘍に対する新規治療薬の探索

緒言

本研究の第 1 章では、原発性肺腫瘍罹患犬の組織検体を用いて肺腫瘍オルガノイド培養法を確立した。作出した肺腫瘍オルガノイドは元の組織の構造やタンパク発現を維持しており、さらに免疫不全マウスの皮下背部において腫瘍の再現性も確認されていた。多種の薬剤に対する感受性もオルガノイドの系統ごと異なる様子が見られたことから、元の被検犬や腫瘍組織の分子プロファイルを反映していることが示唆された。これらの結果から作出した肺腫瘍オルガノイドを犬の原発性肺腫瘍研究に応用できる可能性が示された。

そこで第 3 章では、作出した肺腫瘍オルガノイドを用いて犬肺腫瘍の新規治療標的を同定することを目的とした。肺腫瘍オルガノイドと同時に作出した正常肺オルガノイドとの比較解析を行うことで、腫瘍オルガノイドに特徴的な分子学的プロファイルを評価し、犬の肺腫瘍治療に利用可能な治療薬候補の探索を行った。

実験材料および方法

材料

本研究では分子標的薬としてトラメチニブ (Cayman Chemical) を使用した。ウェスタンブロッティングあるいは免疫組織化学染色の際に使用した一次抗体は、抗 Ki-67 抗体 (Novus Biologicals), 抗 total-extracellular signal-regulated kinase (tERK) 抗体 (Cell Signaling Technology Inc.), 抗 phosphor-ERK (pERK) 抗体 (Cell Signaling Technology Inc.), 抗 valosin-containing protein (VCP) 抗体 (GeneTex, Inc., Irvine, CA, USA) である。ウェスタンブロッティングに対する二次抗体は HRP-conjugated anti-rabbit IgG (Cayman Chemical) を、免疫組織化学染色に対する二次抗体は EnVision+dual Link System-HRP を使用した。

原発性肺腫瘍組織および近接する正常肺組織からのオルガノイド作出および継代培養

肺組織検体は第 1 章で言及した原発性肺腫瘍と診断された犬 6 頭から採材し、内 4 頭の正常肺組織と 6 頭の肺腫瘍組織を実験に供した (表 3-1)。肺腫瘍組織の取り扱いは第 1 章で既述した。また肺葉切除時に摘出した肺組織に含まれる正常部の組織を正常肺として扱い、腫瘍と同様の手順で正常肺オルガノイド培養および継代培養を行った。

肺腫瘍オルガノイドに対するトラメチニブ処置および細胞生存率

トラメチニブは先行文献 (Gilmartin et al., 2011; Elbadawy et al., 2021c) や製薬会社のデータを基に適切な濃度を算出し、オルガノイドへ曝露した。オルガノイドを PBS で洗浄後、5 mM の EDTA/PBS および TrypLE を用いたトリプシン処置を実施し、70 μ m のセルストレーナーに通して FBS で中和した。その後細胞数を計数し、96 ウェルプレートの 1 ウェルあたり 2000 個ずつ播種されるようにマトリゲルと混合した。各薬剤に対して 3 ウェルずつ各 8 μ l の細胞懸濁ゲルを播種した。ゲルが固まった後に培養液を 1 ウェルあたり 100 μ l ずつ添加し、37 $^{\circ}$ C の CO₂ インキュベータ内で一晩培養した後、溶媒である DMSO (1mg/ml) あるいはトラメチニブ (0.001, 0.01, 0.1, 1, 10 μ M) を処置して 72 時間培養した。その後、プレストブル

ーアッセイキットとマイクロプレートリーダーを使用し、585 nm の波長で吸光度を計測した。

肺腫瘍オルガノイドの免疫不全マウス皮下への異種移植実験

免疫不全マウスに関する実験は、東京農工大学の倫理委員会で合意された「実験動物の飼育と使用の手引き」の推奨に則り、東京農工大学動物実験小委員会の承認を得て、実施した（承認番号：R04-120）。培養した肺腫瘍オルガノイド（検体 LC22001）を EDTA/PBS と TrypLE を用いたトリプシン処置によって遊離させ、一度平面ディッシュ上へ播種し、先行論文に従って 2.5 次元オルガノイド細胞として拡大培養した (Abugomaa et al., 2020a; Elbadawy et al., 2021c; Abugomaa et al., 2022)。次いでオスの SCID (C.B-17/IcrHsd-Prkdcscid, Japan SLC) マウス 10 匹の背部皮下へそれぞれ 5×10^6 個のオルガノイド細胞を移植し、2 週間適切な環境下で飼育後、移植組織が同程度に目視可能なサイズへ増大したことを確認し、マウスを無作為に 5 匹ずつ 2 群へ分けた。一方はトラメチニブ群としてトラメチニブ (1mg/kg) を、他方はコントロール群として等量の溶媒のみを 1 週間に 6 日間連続で 23 日間腹腔内投与する群とした。1 週間ごとに各マウスの移植腫瘍の最長径 (L mm) と最短径 (W mm) を計測し、腫瘍体積 (V mm³) を以下の式で算出し、各群の平均腫瘍体積としてその推移を記録した。

$$\text{腫瘍体積 (V)} = 1/2 \quad (L \times W^2)$$

各群は処置開始から 23 日時点でイソフルランを用いた吸入麻酔と頸椎脱臼による安楽死を行い、背部腫瘍を摘出し、その重量を計量した後、3 つの組織片に分けた。1 つは PBS で洗浄後に 4%PFA にて固定し、パラフィン包埋を経てヘマトキシリン・エオジン染色および免疫組織化学染色に供した。残る組織片 2 つは液体窒素で瞬間凍結させ、タンパク抽出あるいは RNA 抽出を行うまでマイナス 80°C で保存した。

免疫不全マウス皮下移植組織のヘマトキシリン・エオジン染色ならびに免疫組織化学染色

免疫不全マウスに異種移植した肺腫瘍オルガノイド組織は、摘出後、一部を 2 mm 厚の小さな組織片に切り出し、4%PFA を用いて一晩 4°C で固定した。その後は常法に則り、アルコールおよびキシレンへの浸漬を経て、パラフィンに包埋した。4 μm 厚の薄切切片を作出し、

オルガノイドの組織学的形態評価のためにヘマトキシリン・エオジン染色を行った。

免疫組織化学染色では、切片の脱パラフィン後、エタノールへ段階的に浸漬・水和させ、10 mM のクエン酸緩衝液 (pH6.0) 中でオートクレーブによる 121°C・5 分間の賦活化処理を行った。内因性ペルオキシダーゼの失活のために 1% H_2O_2 /methanol 溶液中に室温で 30 分浸漬させた。10%NGS でブロッキングした後、抗 Ki-67 抗体 (1:50) を 4°Cで一晩反応させた。その後 EnVision+Dual Link System-HRP を用いて二次抗体と室温で 30 分反応させ、DAB を用いて発色させた。すべての切片はヘマトキシリンを用いて対比染色を行った。

ウェスタンブロッティング

肺腫瘍オルガノイドあるいは肺腫瘍オルガノイドを免疫不全マウスの背部皮下に移植した腫瘍組織に対して、トラメチニブ処置の有無によるタンパク発現レベルの変化を評価するためにウェスタンブロッティングを実施した。オルガノイドにおいては、EDTA/PBS および TrypLE のトリプシン処置を経て、細胞塊を採取し、CellLytic™ M (Cell lysis Reagent C2987, Sigma-Aldrich, Darmstadt, Germany) を用いてタンパクを抽出した。異種移植した組織片においては、液体窒素で瞬間凍結後に圧迫粉碎し、CellLytic™ M を用いてタンパクを抽出した。その後は常法に従い、各検体の等量 (5 または 10 μ g) のタンパクを sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis (SDS-PAGE) (7.5%, ATTO Co. Ltd., 東京, 日本) を用いてローディングすることで分離させ、ニトロセルロースメンブレン (富士フイルム和光純薬) に転写した。次いで 5%スキムミルクによるブロッキング後、tERK (1:250) あるいは pERK (1:500), VCP (1:500) を一晩 4°Cで反応させた。その後 HRP-conjugated anti-rabbit IgG (1:5000) を用いて二次抗体と室温で 1 時間反応させ、ECL Prime (GE Healthcare, Pittsburgh, PA, USA) と LAS-3000 image analyzer (富士フイルム, 東京, 日本) を用いて可視化した。得られたタンパクのバンドはそれぞれ ImageJ software を用いて定量化した。

RNA シークエンス解析

NucleoSpinKit を用いて肺腫瘍オルガノイド (LC20001, LC21001, LC21004, LC22001) お

よび正常肺オルガノイド (LN21001, LN21003, LN21004, LN21007) から tRNA を抽出し、さらに RiboMinus Eukaryote System v2 を用いて rRNA を除去後、mRNA を得た。mRNA のライブラリ調整は NEB Next Ultra RNA Library Prep Kit を用いて行い、RNA シークエンス解析をアゼンタ株式会社へ依頼した。2×150 bp で 3.5×10⁸ フラグメントの RNA シークエンス解析は Illumina NovaSeq instrument を用いて実施された。Fastq データから得られたリードは STAR (Version 2.5.1b) を用いてリファレンスゲノム (CanFam3.1) へマッピングされた。各検体のフラグメント数は RSEM (Version 1.3.3) を用いて取得され、M-value 法を用いて一般化された。最終的に得られたデータを基にボルケーノプロットやヒートマップ、遺伝子セットエンリッチメント解析 (以下 GSEA) を実施した。差次的発現遺伝子は、 $p < 0.05$ の偽発見率 q 値閾値に基づいて認識され、2 倍以上の変化を示し、 q -value が < 0.05 の遺伝子を差次的発現とみなした。GSEA は Java コマンドラインプログラム GSEA (version 4.1.0) と Molecular Signatures Database v7.4 を用いて行った (Subramanian et al., 2005)。なお今回用いた検体には肺腺癌だけでなく肺原発性神経内分泌腫瘍が含まれているが、本章では原発性肺腫瘍という枠組みで腫瘍オルガノイドと正常オルガノイドを比較した。

定量的リアルタイム PCR 解析

トラメチニブ処置群およびコントロール群の肺腫瘍オルガノイドから tRNA を抽出後、QuantiTect Reverse Transcription Kit を用いて First-strand cDNA を合成し、QuantiTect SYBR I Kit と StepOnePlus Real-Time PCR System により定量的リアルタイム PCR 解析を実施した。2- $\Delta\Delta C_q$ 法と、定量により得られたサイクル閾値 (Ct 値) を用いて、mRNA 存在量の倍数変化を算出した。定量的リアルタイム PCR に使用したプライマー配列は表 3-4 に示した。

統計学的解析

得られた定量値は平均値±標準誤差として示した。統計学的評価は、SigmaPlot ソフトウェアを用いて一元配置分散分析 (ANOVA) を行い、Student's *t*-test を用いて統計解析を実施した。両側 P 値が < 0.05 の場合、データが統計的に有意であるとみなした。

結果

犬原発性肺腫瘍に近接する正常肺オルガノイドの作出

第 1 章で作出した肺腫瘍オルガノイドと同様に、肺腫瘍罹患犬（表 3-1）から摘出した肺葉内の正常組織を用いて正常肺オルガノイドを培養した（図 3-1）。4 頭の犬から正常肺オルガノイドの作出を試み、それぞれ順調に培養が可能であった。肺腫瘍オルガノイドではどの系統も凍結保存後 10 継代以上の長期培養が可能であったが、正常肺オルガノイドでは一部の系統（LN21004）を除き、凍結保存後に再度培養に供した際に発育が著しく低下する様子も見られた。各オルガノイドの明視野顕微鏡像（図 3-2）では、正常肺オルガノイド（LN21001, LN21003, LN21004, LN21007）が球状の構造を示す傾向が見られたのに対し、肺腫瘍オルガノイド（LC20001, LC21001, LC21003, LC21004, LC21007, LC22001）は増大に伴いより複雑な構造を示す傾向も見られた。

肺腫瘍オルガノイドおよび近接する正常肺オルガノイドの遺伝子プロファイルの比較解析

4 系統の肺腫瘍オルガノイド（LC20001, LC21001, LC21004, LC22001）と 4 系統の正常肺オルガノイド（LN21001, LN21003, LN21004, LN21007）からそれぞれ RNA を抽出し、RNA シークエンス解析を実施した。図 3-3A には両オルガノイド間における遺伝子発現の違いをボルケーノプロットで示している。グラフ右の赤いプロットで示した 11 個の遺伝子は肺腫瘍オルガノイドにおいて有意に発現が亢進していた遺伝子であり、さらにヒートマップにより各系統のオルガノイドにおける発現量の違いを示した（図 3-3B）。RNA シークエンス解析結果を基に GSEA 解析を実施したところ、主な細胞増殖経路の 1 つである MEK シグナル経路下流の遺伝子群が腫瘍オルガノイドにおいて発現が上昇している傾向が示された（図 3-4）。

In vitro におけるトラメチニブの肺腫瘍オルガノイドに対する影響

GSEA 解析結果（図 3-4）を受け、MEK シグナル経路（図 3-5）に関わる分子と犬の肺腫瘍との関連性が示唆された。そこで MEK の阻害薬である分子標的薬のトラメチニブを犬の肺

腫瘍に対する新たな治療薬剤として注目した。4 系統の肺腫瘍オルガノイド (LC20001, LC21004, LC21007, LC22001) をそれぞれ 2000 個ずつ 96 ウェルプレートへ播種し、トラメチニブ (0.001~10 μ M) を各濃度 3 ウェルずつ処置した細胞生存率を比較した。コントロールである DMSO (1mg/ml) を処置した際の平均生存率を 100%として、各濃度の細胞生存率の平均値を相対値 (%) としてグラフに表した (図 3-6, 表 3-5)。各系統の肺腫瘍オルガノイドのうち、LC21004 および LC21007 はトラメチニブに対して感受性を示しており、LC20001 および LC22001 はやや抵抗性が見られた。トラメチニブ処置による抗腫瘍効果について検討するために、MEK シグナル経路下流の分子に対する影響を調べた。肺腫瘍オルガノイドに対して 1 μ M のトラメチニブあるいはコントロールとして DMSO (1mg/ml) を 3 時間処置した後、タンパクと RNA を抽出した。ウェスタンブロッティング法を用いて ERK タンパク発現を、リアルタイム PCR 解析を用いて ETS transcription factor ETS Like-1 protein (*ELK1*), *c-Myc*, phospholipase A2 group 4 A (*PLA2G4A*), Salt-Inducible Kinase 1 (*SIK1*) の mRNA 発現を解析した。コントロールと比較してトラメチニブ処置により ERK のリン酸化レベル (pERK) が顕著に抑制されていることが分かり (図 3-7, 表 3-6), さらに細胞の核内における細胞増殖因子である *c-Myc* の mRNA 発現レベルも有意に抑制されていることが示された (図 3-8, 表 3-7)。

***In vivo* におけるトラメチニブの肺腫瘍オルガノイドに対する影響**

MEK 阻害薬であるトラメチニブの *in vivo* における影響を検証するために、肺腫瘍オルガノイドの免疫不全マウスへの異種移植実験を実施した (図 3-9)。トラメチニブ処置群とコントロール群のマウスに対して、それぞれ 7 日毎に腫瘍サイズを計測し、23 日目に腫瘍組織を摘出した。次いで腫瘍重量やサイズ、組織学的変化や分子学的変化について両群の比較解析を行った。コントロール群と比較してトラメチニブ投与群では、マウスの背部皮下に移植した腫瘍組織のサイズおよび摘出した腫瘍重量が有意に減少することが示された (図 3-10A, B, C, 表 3-8)。さらに摘出した腫瘍の組織切片を作出し、ヘマトキシリン・エオジン染色を実施したところ、コントロール群では明瞭な腺腔構造を示す腫瘍領域が認められた一方で、トラメチニブ投与群では腫瘍の変性・壊死が認められた (図 3-11A 上段)。また細胞増殖マーカー

として知られている Ki-67 発現陽性細胞率について免疫組織化学染色を用いて評価したところ、コントロール群と比較してトラメチニブ投与群で陽性細胞率が低下している傾向が認められた（図 3-11B 下段，表 3-9）。

考察

本研究では第1章に続いて、原発性肺腫瘍に罹患した犬から摘出した肺葉を用いて、腫瘍に隣接する正常組織から正常肺オルガノイドを作出することに成功した。また犬の原発性肺腫瘍オルガノイドと正常肺オルガノイドの遺伝子プロファイルや分子発現の違いを比較することで、初めて両者の違いを明らかにした。今回得られた主な結果は以下の通りである。

1) 肺腫瘍を発生した肺葉を起源とした正常肺組織を用いることで、肺腫瘍オルガノイドと特徴の異なるオルガノイドの培養に成功した (図3-1, 2)。2) 犬原発性肺腫瘍オルガノイドは正常肺オルガノイドと比較して、11個の遺伝子発現が有意に上昇していること示され、MEKシグナル経路に関する遺伝子セットの発現亢進が示唆された (図3-3, 4)。3) MEK阻害薬であるトラメチニブは、*in vitro*においてMEKシグナル経路の下流に位置するERKのリン酸化レベルを低下させ、さらに下流にある*c-Myc*発現を顕著に抑制することで肺腫瘍オルガノイドの増殖抑制効果を示した (図3-5, 6, 7, 8)。4) トラメチニブは*in vivo*においても腫瘍重量や腫瘍サイズの抑制、腫瘍組織における細胞変性・壊死などを誘導し、肺腫瘍オルガノイドの増殖を抑制した (図3-9, 10, 11)。これらの結果から、犬の原発性肺腫瘍に対する新規治療薬としてトラメチニブの利用可能性が示された。

犬原発性肺腫瘍オルガノイドと正常肺オルガノイドを比較した RNA シークエンス解析の結果から、11個の遺伝子 (*CTSD*, *AHNAK2*, *PCLO*, *EDN1*, *PKIA*, *KCNQ4*, *HOXA13*, *TMEM130*, *TFAP2B*, *PODXL*, *LOC6611455*) が肺腫瘍オルガノイドにおいて顕著に発現が上昇していることが明らかになった (図 3-3)。これらの遺伝子の多くは人の腫瘍において悪性度や予後と関連しているという報告がある。*Cathepsin-D* (*CTSD*) の mRNA 発現レベルが高いこととトリプルネガティブ乳癌腫瘍患者の生存率の減少に相関があることや (Ashraf et al., 2019), *AHNAK Nucleoprotein 2* (*AHNAK2*) が肺腺癌や子宮頸部腺癌といった多種の腫瘍患者の予後不良因子となると言われている (Cui et al., 2022; Xu et al., 2022; Zardab et al., 2022)。さらに食道扁平上皮腫瘍では *Piccolo* (*PCLO*) が腫瘍の悪性度に寄与しているという報告がある (Zhang et al., 2017)。さらにこれらの遺伝子と腫瘍の増殖、腫瘍形成、または血管新生に関する

る報告もみられた (Ashraf et al., 2019; Liu et al., 2020; Pulido et al., 2020; Xu et al., 2022; Zardab et al., 2022)。特に人の原発性肺腫瘍腫瘍バイオマーカーならびに腫瘍進行の指標と関連することが示唆されているものとして、*CTSD* (Liu et al., 2020) や *AHNAK2* (Cui et al., 2022), Endothelin 1 (*EDN1*) (Pulido et al., 2020), Homeobox A13 (*HOXA13*) (Sang et al., 2016), 転写因子 AP-2 ベータ (*TFAP2B*) (Fu et al., 2014), Podocalyxin Like (*PODXL*) (Kusumoto et al., 2017) などが挙げられる。さらに、*HOXA13* はいくつかの犬の腫瘍との関連性も報告されている (Palmieri and Riccardi, 2013; DeInnocentes et al., 2015)。しかしながら、これらの遺伝子と犬の原発性肺腫瘍との関連性は明らかにされておらず、知る限りでは本研究が最初の報告である。人の原発性肺腫瘍と同様に、犬原発性肺腫瘍オルガノイドにおけるこれらの遺伝子も腫瘍形成や細胞増殖または悪性腫瘍に関連する何らかの役割を担っている可能性が推測されるが、今後さらなる研究が必要である。

肺腫瘍と正常肺のオルガノイドに対して実施した GSEA 解析では、肺腫瘍オルガノイドにおいて主要な細胞増殖経路の一つである MEK シグナル経路がアップレギュレートされていることが示された (図 3-4)。これまでに HER2 や EGFR の過剰発現と犬の肺腫瘍の関連性を報告する研究 (Sabattini et al., 2014; Yoshimoto et al., 2020) はいくつか見られたが、MEK シグナル経路との関連性を示唆する報告は知られていない。人の原発性肺腫瘍では、MEK シグナルの活性化は主に B-Raf Proto-Oncogene Serine/Threonine-Protein Kinase (BRAF) 変異に起因するという報告があり、実際に人の原発性肺腫瘍に対して MEK 阻害薬と BRAF 阻害薬の併用療法も用いられている (Ambrogio et al., 2018; Subbiah et al., 2020; Han et al., 2021)。一方犬の肺腫瘍に対して MEK 阻害薬の有効性はほとんど報告されていない (Wei et al., 2016; Cronise et al., 2019; Elbadawy et al., 2021c)。本研究では MEK 阻害薬の一つであるトラメチニブの犬原発性肺腫瘍オルガノイドに対する効果を評価した結果、*in vitro* および *in vivo* の両方において犬原発性肺腫瘍オルガノイドの増殖を効果的に阻害することに成功した (図 3-6, 7, 8, 10, 11)。犬の膀胱腫瘍を用いた先行研究においても、トラメチニブにより犬膀胱腫瘍オルガノイドの ERK のリン酸化を完全に阻害し、ERK カスケードの下流シグナル(*c-Myc*, *ELK1*, *SIK1*, *PLA2G4A*) を抑制することが示されていた (Elbadawy et al., 2021c)。またトラメチニブ

による組織学的な変化としてはアポトーシスやネクローシスの誘導が報告されている (Elbadawy et al., 2021c; Parekh et al., 2022)。本研究においても *In vitro* におけるトラメチニブ処置群の肺腫瘍オルガノイドでは、ERK の活性化が顕著に抑制され (図 3-7)、さらに *c-Myc* の mRNA レベルのダウンレギュレーションを誘導した (図 3-8)。また *in vivo* におけるトラメチニブ群では、異種移植した腫瘍組織の変性・壊死が認められ (図 3-11A)、増殖マーカーである Ki-67 の発現率も低下していた (図 3-11A,B)。これらのことから、トラメチニブは肺腫瘍オルガノイドにおいて MEK-ERK シグナル経路を介してその下流因子の *c-Myc* の発現を抑制することで抗腫瘍効果を示すことが示唆された。

これらの結果から、犬の原発性肺腫瘍オルガノイドと正常肺オルガノイドを用いてその比較解析を行うことで、肺腫瘍オルガノイドに特異的な分子学的特徴を捉えることができた。とくに細胞増殖経路に関する違いに注目することで、犬の肺腫瘍に対する新規治療薬として MEK 阻害薬であるトラメチニブの有用性を提案することが可能であった。今後、犬の原発性肺腫瘍に対する新規診断マーカーや治療標的を同定するためのモデル細胞として、さらに人の肺腫瘍研究のトランスレーショナルな実験モデルとして、肺腫瘍オルガノイドの応用が期待される。

小括

犬の原発性肺腫瘍は、早期発見が難しく有効な内科療法が確立されていない難治性腫瘍である。根治的治療としての外科的肺葉切除が実施可能な場合は比較的穏やかな挙動をとるものの、切除不能あるいは転移性の場合、内科療法を実施しても延命効果が乏しい腫瘍である。本研究の第1章では、こうした原発性肺腫瘍に対する新たな実験モデルの開発を掲げ、肺腫瘍罹患犬由来の原発性肺腫瘍オルガノイド培養法を確立させることに成功した。作出したオルガノイドと元の組織との類似性や腫瘍再現性を確認し、薬剤感受性試験の結果からも由来する被検犬や腫瘍自体の特徴を反映していると考えられたことから、犬の肺腫瘍研究の実験モデルとして有用であることが示された。そこで第3章では、肺腫瘍オルガノイドと同時に作出した近接する正常肺オルガノイドとの比較解析を通じて、治療薬の探索研究に利用可能であることを検証した。両オルガノイドの比較解析により、肺腫瘍オルガノイドにおいて発現が亢進している11個の遺伝子が認められた。これまでの報告によると、これらの遺伝子が多種の腫瘍における腫瘍原性や腫瘍増殖、予後因子として関与していることが示唆されているものの犬の原発性肺腫瘍での報告は初めてとなるため、新たなバイオマーカー候補としての可能性が示唆された。今後の追加研究によって、詳細追究ができることを期待している。またRNAシーケンス解析に基づいたGSEA解析の結果、肺腫瘍オルガノイドにおいて主な細胞増殖経路の一つであるMEKシグナル経路に関する遺伝子群の活性化が示唆された。そこでMEK阻害薬であるトラメチニブに着目し、肺腫瘍オルガノイドに対して*in vitro*および*in vivo*での抗腫瘍効果を検証し、効率的に細胞生存率や腫瘍増殖を抑制することが可能であることを示した。これらの結果から、被検犬由来の肺腫瘍オルガノイドは、個々の被検犬の特徴に合わせた治療選択を提示できる可能性があるのみならず、肺腫瘍に特異的な腫瘍学的特徴を捉えることで外科不応症例に対する汎用的な治療薬の開発につなげられることが示唆された。

総合考察

近年、伴侶動物の寿命の延長に伴い腫瘍罹患率も増加しており、主な死亡原因としても重要視されている。一方で確立された治療プロトコルが存在する腫瘍ばかりではなく、新たな治療法探究が必要とされている腫瘍も依然として多い。獣医療における腫瘍研究の位置づけは、獣医療向上のための直接的な意義のみならず人医療に対するトランスレーショナルな研究モデルとしても注目されている。中でも希少腫瘍の研究は動物種を超えて、総合的な解析・評価を行うことで、相互の医療発展につながる可能性を秘めている。そこで本研究では犬の希少腫瘍、特に胸腔内の難治性腫瘍に焦点を当て、原発性肺腫瘍ならびに中皮腫研究を促進すべく新たな実験モデルの開発を試みた。そこで着目した手法が三次元オルガノイド培養法である。オルガノイドは、主に上皮系由来の自己複製能に富んだ幹細胞からなる三次元培養細胞として広く知られており、生体内での挙動に近い状態が維持されることが特徴である (Pampaloni et al., 2007; Clevers, 2016; Elbadawy et al., 2019a; Elbadawy et al., 2021a; Elbadawy et al., 2021c; Blutt and Estes, 2022; Salgueiro et al., 2022; Yoshida et al., 2022; Abugomaa et al., 2023)。これまでに再生医療 (Wang et al., 2020), 疾患モデル (Elbadawy et al., 2020b; Elbadawy et al., 2021b), 毒性病理学 (Yoshida et al., 2022), トランスレーショナルリサーチ (Elbadawy et al., 2020a), 腫瘍研究 (Elbadawy et al., 2018a; Usui et al., 2018; Abugomaa et al., 2020a) の分野で非常に有用な培養モデルとして応用されてきているものの、獣医療での利用例は依然として少ない。本研究ではオルガノイド培養法を利用して腫瘍研究モデルの開発を試み、その利用可能性と展望を考察することを目的とした。

第 1 章では原発性肺腫瘍に罹患した犬から肺葉切除を実施し、肺腫瘍組織由来のオルガノイド培養を試みた。各被検犬から採取した肺腫瘍組織は良好にオルガノイドを形成し、大部分が長期継代に適していた。さらに元の腫瘍組織の構造やタンパク発現などを模倣し、腫瘍原性も有していることが示された。また多種の薬剤に対する感受性が系統ごとに異なる様子が確認されたことから、薬剤スクリーニングモデルとしての利用も期待できる結果となった。特にラパチニブやゲフィチニブといった人の分子標的薬に対しても感受性を示す系統が認め

られたことを考慮すると、これまで獣医療において限局的に利用されていた分子標的薬も今後の治療選択として拡大され得る可能性が見いだせた。本研究ではこれら2種類の分子標的薬（ラパチニブとゲフィチニブ）の標的分子（HER2とEGFR）の発現レベルと薬剤感受性との相関についても検証した。HER2発現が高い細胞ではHER2阻害薬であるラパチニブに対して感受性が高く、同様にEGFR発現が高い細胞ではEGFR阻害薬であるゲフィチニブに対して感受性が高いといった正の相関がある傾向が見られた。一方でその傾向から漏れる系統（LC22001）も認められ、これに関してはHER2やEGFRが主な細胞増殖シグナル経路の上流に位置する因子であり、より下流に位置する分子やその他の増殖シグナル経路の活性化なども関連している可能性が考えられた。そのため腫瘍組織におけるHER2やEGFR発現レベルを調べるだけでなく、肺腫瘍オルガノイドモデルを利用した薬剤感受性検査結果も加味した治療法の検討が、より良い治療選択となる可能性がある。

第2章では心膜中皮腫と診断された犬の胸水検体を用いて、胸水中の中皮腫細胞からオルガノイド培養法を試みた。初代培養ではいずれの検体からも、球状から管腔状のオルガノイド形成が認められた。電子顕微鏡画像や組織学的探索によって胸水由来オルガノイドが元の中皮細胞と悪性腫瘍の特徴を併せ持っていることが分かり、悪性中皮腫オルガノイドの作出に成功した。一方でこれらのオルガノイドを継代培養した際に、増殖率の低下や退縮といった課題が残った。そこで中皮腫オルガノイドの最適な培養成分の検討を実施した。結果としてWnt3aやNoggin, R-Spondinをはじめ増殖因子であるEGFやFGF2の存在が中皮腫オルガノイドの培養には重要であることが示唆された。この培養液を用いることで、数継代の培養が可能となり、実験開始時点と比べると培養効率が改善された。一方で肺腫瘍オルガノイドと比較すると、依然として長期継代には課題が残るため、今後さらなる培養条件の検討が必要である。しかしながら、これまでのオルガノイド培養が上皮系組織に由来した細胞が主流であり (Pampaloni et al., 2007; Clevers, 2016; Elbadawy et al., 2019a; Elbadawy et al., 2021a; Elbadawy et al., 2021c; Blutt and Estes, 2022; Salgueiro et al., 2022; Yoshida et al., 2022; Abugomaa et al., 2023), 非上皮系のオルガノイド培養はほとんど報告されていなかった。今回、上皮系と間葉系の間接の性質を持つ中皮細胞からのオルガノイド培養に成功したことは、オ

ルガノイドの新たな知見につながると考えられる。また二次元培養細胞との比較解析を通じて、細胞接着に関連した因子、特に E-Cadherin 発現に差があることを発見した。過去の研究においても、中皮腫での細胞接着分子の発現レベルが悪性度や治療抵抗性、転移などに関連していることが示唆されていたため、本研究で樹立した悪性中皮腫オルガノイドが中皮腫の生物学的探求をする上で非常に有用である可能性が示された。こうした培養方法の違いによる悪性中皮腫の特性を把握した上で、実験内容や比較実験を検討することで中皮腫研究の発展につながれると考えている。

第3章では、第1章で樹立した犬の原発性肺腫瘍オルガノイドを用いて、正常肺オルガノイドと比較解析することで研究モデルとしての利用可能性を検証した。正常肺組織からも腫瘍オルガノイドと同様の手技により、良好なオルガノイドが形成され、比較的継代を重ねても増殖力を維持していた。両者の RNA シークエンス解析を実施した結果、人腫瘍やいくつかの犬の腫瘍で報告があり、腫瘍関連遺伝子として知られている遺伝子の発現が肺腫瘍オルガノイドにおいて上昇していることが明らかになった。これまでに犬の肺腫瘍とこれらの遺伝子の関連性については言及されておらず、今後の研究課題であると考えている。また遺伝子エンリッチメント解析 (GSEA) 結果から、正常肺オルガノイドと比較して肺腫瘍オルガノイドでは細胞増殖経路の一つである MEK シグナル経路の下流因子の発現が上昇していることが示唆された。そこで MEK 阻害薬であるトラメチニブが肺腫瘍治療薬として利用できる可能性を期待して、*in vitro* および *in vivo* における肺腫瘍オルガノイドへの影響を検証した。結果的にトラメチニブは *in vitro* において MEK/ERK シグナルを介してその下流の *c-Myc* の mRNA 発現を抑制することで、抗腫瘍効果を発揮した。さらにトラメチニブは *in vivo* においても、免疫不全マウス背部に移植した腫瘍オルガノイド組織の変性や壊死を誘導し、増殖活性を抑制することで抗腫瘍効果を示した。このように、本研究で樹立した肺腫瘍オルガノイドを実験モデルとして利用することで、これまで肺腫瘍に対する治療薬として検討されてこなかったトラメチニブが新たな治療薬候補として示された。今後は肺腫瘍罹患犬に対してトラメチニブによる治療を実施し、実際の抗腫瘍作用や生存期間への影響を検討することが求められる。

結論

本研究では犬の胸腔内難治性かつ希少腫瘍として知られている原発性肺腫瘍および悪性中皮腫に注目して、新規実験モデルの開発を目的とした。新規実験モデルの作出技法として、従来から広く用いられている二次元培養細胞と比較すると、より生体内での特徴が維持されていると言われているオルガノイド培養法に着目した。

第1章ならびに第2章において、腫瘍罹患犬の組織あるいは体腔貯留液を利用することで肺腫瘍および中皮腫のオルガノイドモデルの作出に成功した。それぞれの腫瘍オルガノイドは元の腫瘍組織の構造的特徴や分子発現のプロファイルが類似していることも確認され、種々の薬剤への感受性が異なることから個体ごとの薬剤感受性を反映していることも推測された。希少腫瘍に罹患した犬に対して汎用的な治療薬が確立されていない以上、こうした腫瘍モデルを用いることで薬剤スクリーニングや特定の因子の過剰発現の有無などを検討することで、個々の腫瘍罹患犬に合った個別化医療につなげられる可能性が示された。

第3章では、こうした腫瘍オルガノイドを研究モデルとして利用することで、腫瘍に特徴的な細胞増殖活性や発現の変動する因子の有無を確認し、得られた結果から導いた薬剤が臨床治療につながる可能性を示すことができた。腫瘍罹患犬由来の腫瘍オルガノイドモデルが新たな研究モデルとして有用であることを示唆する結果である。

希少かつ難治性の腫瘍においては、症例数の少なさや実験モデルの乏しさが研究促進の障壁となることが少なくない。本研究において樹立した腫瘍オルガノイドは平面培養とは異なる利点を持ち合わせている部分もあり、今後の腫瘍研究の発展に十分役立てられることが期待される。

謝辞

本研究に関して臼井達哉准教授ならびに佐々木一昭准教授には，研究デザインおよび実験手技をはじめ，論理的推敲の方法など総括的なご指導を賜りましたこと深謝いたします。

また本研究の検体提供に関しまして，東京農工大学獣医分子病態治療学研究室の打出毅教授ならびに獣医臨床腫瘍学研究室の皆上大吾准教授には多大なるご尽力をいただきました。

東京農工大学獣医毒性学研究室の鈴木和彦准教授には組織標本の作製や染色手法，結果の解釈、また博士論文作成に関して親身なご意見・ご指導を賜りました。獣医解剖学研究室の金田正弘准教授には，多種の実験に関連してさまざまな機器の使用をご快諾いただきました。

岩手大学比較薬理毒性学研究室の佐藤洋教授ならびに獣医生理学研究室の木崎景一郎教授には博士論文作成にかかり、貴重なご意見・ご質問を賜りました。最後に本研究を遂行するために獣医薬理学研究室の皆様には多大なるご協力をいただきました。皆様に謹んで感謝申し上げます。

引用文献

- Abugomaa A, Elbadawy M, Ishihara Y, Yamamoto H, Kaneda M, Yamawaki H, Shinohara Y, Usui T, and Sasaki K (2023) Anti-cancer activity of Chaga mushroom (Front Pharmacol 14:1159516.
- Abugomaa A, Elbadawy M, Yamamoto H, Ayame H, Ishihara Y, Sato Y, Yamawaki H, Kaneda M, Usui T, and Sasaki K (2022) Establishment of a direct 2.5D organoid culture model using companion animal cancer tissues. Biomed Pharmacother 154:113597.
- Abugomaa A, Elbadawy M, Yamanaka M, Goto Y, Hayashi K, Mori T, Uchide T, Azakami D, Fukushima R, Yoshida T, Shibutani M, Yamashita R, Kobayashi M, Yamawaki H, Shinohara Y, Kaneda M, Usui T, and Sasaki K (2020a) Establishment of 2.5D organoid culture model using 3D bladder cancer organoid culture. Sci Rep 10:9393.
- Abugomaa A, Elbadawy M, Yamawaki H, Usui T, and Sasaki K (2020b) Emerging Roles of Cancer Stem Cells in Bladder Cancer Progression, Tumorigenesis, and Resistance to Chemotherapy: A Potential Therapeutic Target for Bladder Cancer. Cells 9.
- Alexander M, Kim SY, and Cheng H (2020) Update 2020: Management of Non-Small Cell Lung Cancer. Lung 198:897-907.
- Ambrogio C, Köhler J, Zhou ZW, Wang H, Paranal R, Li J, Capelletti M, Caffarra C, Li S, Lv Q, Gondi S, Hunter JC, Lu J, Chiarle R, Santamaría D, Westover KD, and Jänne PA (2018) KRAS Dimerization Impacts MEK Inhibitor Sensitivity and Oncogenic Activity of Mutant KRAS. Cell 172:857-868.e815.
- Arita S, Arita N, and Hikasa Y (2013) Therapeutic effect of low-dose imatinib on pulmonary arterial hypertension in dogs. Can Vet J 54:255-261.
- Ashraf Y, Mansouri H, Laurent-Matha V, Alcaraz LB, Roger P, Guiu S, Derocq D, Robin G, Michaud HA, Delpech H, Jarlier M, Pugnère M, Robert B, Puel A, Martin L, Landomiel F, Bourquard T, Achour O, Fruitier-Amaudin I, Pichard A, Deshayes E, Turtoi A, Poupon A, Simony-Lafontaine J, Boissière-Michot F, Pirot N, Bernex F, Jacot W, du Manoir S, Theillet C, Pouget JP, Navarro-Teulon I, Bonnefoy N, Pèlegri A, Chardès T, Martineau P, and Liaudet-Coopman E (2019) Immunotherapy of triple-negative breast cancer with cathepsin D-targeting antibodies. J Immunother Cancer 7:29.
- Badhai J, Pandey GK, Song JY, Krijgsman O, Bhaskaran R, Chandrasekaran G, Kwon MC, Bombardelli L, Monkhorst K, Grasso C, Zevenhoven J, van der Vliet J, Cozijnsen M, Krimpenfort P, Peeper D, van Lohuizen M, and Berns A (2020) Combined deletion of Bap1, Nf2, and Cdkn2ab causes rapid onset of malignant mesothelioma in mice. J Exp Med 217.
- Barbone D, Ryan JA, Kolhatkar N, Chacko AD, Jablons DM, Sugarbaker DJ, Bueno R, Letai AG, Coussens LM, Fennell DA, and Broaddus VC (2011) The Bcl-2 repertoire of mesothelioma spheroids underlies acquired apoptotic multicellular resistance. Cell Death Dis 2:e174.
- Barbone D, Van Dam L, Follo C, Jithesh PV, Zhang SD, Richards WG, Bueno R, Fennell DA, and Broaddus VC (2016) Analysis of Gene Expression in 3D Spheroids Highlights a Survival Role

- for ASS1 in Mesothelioma. *PLoS One* 11:e0150044.
- Barbone D, Yang TM, Morgan JR, Gaudino G, and Broaddus VC (2008) Mammalian target of rapamycin contributes to the acquired apoptotic resistance of human mesothelioma multicellular spheroids. *J Biol Chem* 283:13021-13030.
- Barkauskas CE, Chung MI, Fioret B, Gao X, Katsura H, and Hogan BL (2017) Lung organoids: current uses and future promise. *Development* 144:986-997.
- Blackwell C, Sherk C, Fricko M, Ganji G, Barnette M, Hoang B, Tunstead J, Skedzielewski T, Alsaid H, Jucker BM, Minthorn E, Kumar R, and DeYoung MP (2016) Inhibition of FGF/FGFR autocrine signaling in mesothelioma with the FGF ligand trap, FP-1039/GSK3052230. *Oncotarget* 7:39861-39871.
- Bleijs M, van de Wetering M, Clevers H, and Drost J (2019) Xenograft and organoid model systems in cancer research. *EMBO J* 38:e101654.
- Blutt SE, and Estes MK (2022) Organoid Models for Infectious Disease. *Annu Rev Med* 73:167-182.
- Camerini A, Morabito A, Montanino A, Bernabé R, Grossi F, Ramlau R, Ciuleanu TE, Ceresoli GL, Pasello G, de Marinis F, Bosch-Barrera J, Laundreau P, Gautier S, Ta Thanh Minh C, and Kowalski D (2021) Metronomic oral vinorelbine in previously untreated advanced non-small-cell lung cancer patients unfit for platinum-based chemotherapy: results of the randomized phase II Tempo Lung trial. *ESMO Open* 6:100051.
- Chae HK, Oh YI, Park S, An JH, Seo K, Kang K, Chu SN, and Youn HY (2022) Retrospective analysis of efficacy and safety of oral paclitaxel for treatment of various cancers in dogs (2017-2021). *Vet Med Sci* 8:1443-1450.
- Chernova T, Murphy FA, Galavotti S, Sun XM, Powley IR, Grosso S, Schinwald A, Zacarias-Cabeza J, Dudek KM, Dinsdale D, Le Quesne J, Bennett J, Nakas A, Greaves P, Poland CA, Donaldson K, Bushell M, Willis AE, and MacFarlane M (2017) Long-Fiber Carbon Nanotubes Replicate Asbestos-Induced Mesothelioma with Disruption of the Tumor Suppressor Gene *Cdkn2a* (*Ink4a/Arf*). *Curr Biol* 27:3302-3314.e3306.
- Chernova T, Sun XM, Powley IR, Galavotti S, Grosso S, Murphy FA, Miles GJ, Cresswell L, Antonov AV, Bennett J, Nakas A, Dinsdale D, Cain K, Bushell M, Willis AE, and MacFarlane M (2016) Molecular profiling reveals primary mesothelioma cell lines recapitulate human disease. *Cell Death Differ* 23:1152-1164.
- Chhouri H, Alexandre D, and Grumolato L (2023) Mechanisms of Acquired Resistance and Tolerance to EGFR Targeted Therapy in Non-Small Cell Lung Cancer. *Cancers (Basel)* 15.
- Chia PL, Parakh S, Tsao MS, Pham NA, Gan HK, Cao D, Burvenich IJG, Rigopoulos A, Reilly EB, John T, and Scott AM (2020) Targeting and Efficacy of Novel mAb806-Antibody-Drug Conjugates in Malignant Mesothelioma. *Pharmaceuticals (Basel)* 13.
- Clemente-Vicario F, Alvarez CE, Rowell JL, Roy S, London CA, Kisseberth WC, and Lorch G (2015) Human Genetic Relevance and Potent Antitumor Activity of Heat Shock Protein 90 Inhibition in Canine Lung Adenocarcinoma Cell Lines. *PLoS One* 10:e0142007.
- Clevers H (2016) Modeling Development and Disease with Organoids. *Cell* 165:1586-1597.

- Closa JM, Font A, and Mascort J (1999) Pericardial mesothelioma in a dog: long-term survival after pericardiectomy in combination with chemotherapy. *J Small Anim Pract* 40:383-386.
- Colin DJ, Cottet-Dumoulin D, Faivre A, Germain S, Triponez F, and Serre-Beinier V (2018) Experimental Model of Human Malignant Mesothelioma in Athymic Mice. *Int J Mol Sci* 19.
- Cooper WA, Lam DC, O'Toole SA, and Minna JD (2013) Molecular biology of lung cancer. *J Thorac Dis* 5 Suppl 5:S479-490.
- Cramer G, Shin M, Hagan S, Katz SI, Simone CB, Busch TM, and Cengel KA (2019) Modeling Epidermal Growth Factor Inhibitor-mediated Enhancement of Photodynamic Therapy Efficacy Using 3D Mesothelioma Cell Culture. *Photochem Photobiol* 95:397-405.
- Cronise KE, Hernandez BG, Gustafson DL, and Duval DL (2019) Identifying the ErbB/MAPK Signaling Cascade as a Therapeutic Target in Canine Bladder Cancer. *Mol Pharmacol* 96:36-46.
- Cui Y, Liu X, Wu Y, Liang X, Dai J, Zhang Z, and Guo R (2022) Deleterious *AHNAK2* Mutation as a Novel Biomarker for Immune Checkpoint Inhibitors in Non-Small Cell Lung Cancer. *Front Oncol* 12:798401.
- D'Angelo AR, and Di Francesco G (2014) Sclerosing peritoneal mesothelioma in a dog: histopathological, histochemical and immunohistochemical investigations. *Vet Ital* 50:301-305.
- Dacic S (2022) Pleural mesothelioma classification-update and challenges. *Mod Pathol* 35:51-56.
- Daubriac J, Fleury-Feith J, Kheuang L, Galipon J, Saint-Albin A, Renier A, Giovannini M, Galateau-Sallé F, and Jaurand MC (2009) Malignant pleural mesothelioma cells resist anoikis as quiescent pluricellular aggregates. *Cell Death Differ* 16:1146-1155.
- Davidson B (2007) Biological characteristics of cancers involving the serosal cavities. *Crit Rev Oncog* 13:189-227.
- DeInnocentes P, Perry AL, Graff EC, Lutfal Kabir FM, and Curtis Bird R (2015) Characterization of HOX gene expression in canine mammary tumour cell lines from spontaneous tumours. *Vet Comp Oncol* 13:322-336.
- Destro A, Ceresoli GL, Falleni M, Zucali PA, Morengi E, Bianchi P, Pellegrini C, Cordani N, Vaira V, Alloisio M, Rizzi A, Bosari S, and Roncalli M (2006) EGFR overexpression in malignant pleural mesothelioma. An immunohistochemical and molecular study with clinico-pathological correlations. *Lung Cancer* 51:207-215.
- Dubey S, Jänne PA, Krug L, Pang H, Wang X, Heinze R, Watt C, Crawford J, Kratzke R, Vokes E, and Kindler HL (2010) A phase II study of sorafenib in malignant mesothelioma: results of Cancer and Leukemia Group B 30307. *J Thorac Oncol* 5:1655-1661.
- Elbadawy M, Abugomaa A, Yamawaki H, Usui T, and Sasaki K (2020a) Development of Prostate Cancer Organoid Culture Models in Basic Medicine and Translational Research. *Cancers (Basel)* 12.
- Elbadawy M, Fujisaka K, Yamamoto H, Tsunedomi R, Nagano H, Ayame H, Ishihara Y, Mori T, Azakami D, Uchide T, Fukushima R, Abugomaa A, Kaneda M, Yamawaki H, Shinohara Y, Omatsu T, Mizutani T, Usui T, and Sasaki K (2022) Establishment of an experimental model of normal dog bladder organoid using a three-dimensional culture method. *Biomed Pharmacother* 151:113105.

- Elbadawy M, Hayashi K, Ayame H, Ishihara Y, Abugomaa A, Shibutani M, Hayashi SM, Hazama S, Takenouchi H, Nakajima M, Tsunedomi R, Suzuki N, Nagano H, Shinohara Y, Kaneda M, Yamawaki H, Usui T, and Sasaki K (2021a) Anti-cancer activity of amorphous curcumin preparation in patient-derived colorectal cancer organoids. *Biomed Pharmacother* 142:112043.
- Elbadawy M, Kato Y, Saito N, Hayashi K, Abugomaa A, Kobayashi M, Yoshida T, Shibutani M, Kaneda M, Yamawaki H, Mizutani T, Lim CK, Saijo M, Sasaki K, Usui T, and Omatsu T (2021b) Establishment of Intestinal Organoid from. *Int J Mol Sci* 22.
- Elbadawy M, Sato Y, Mori T, Goto Y, Hayashi K, Yamanaka M, Azakami D, Uchide T, Fukushima R, Yoshida T, Shibutani M, Kobayashi M, Shinohara Y, Abugomaa A, Kaneda M, Yamawaki H, Usui T, and Sasaki K (2021c) Anti-tumor effect of trametinib in bladder cancer organoid and the underlying mechanism. *Cancer Biol Ther* 22:357-371.
- Elbadawy M, Usui T, Mori T, Tsunedomi R, Hazama S, Nabeta R, Uchide T, Fukushima R, Yoshida T, Shibutani M, Tanaka T, Masuda S, Okada R, Ichikawa R, Omatsu T, Mizutani T, Katayama Y, Noguchi S, Iwai S, Nakagawa T, Shinohara Y, Kaneda M, Yamawaki H, and Sasaki K (2019a) Establishment of a novel experimental model for muscle-invasive bladder cancer using a dog bladder cancer organoid culture. *Cancer Sci* 110:2806-2821.
- Elbadawy M, Usui T, Yamawaki H, and Sasaki K (2018a) Development of an Experimental Model for Analyzing Drug Resistance in Colorectal Cancer. *Cancers (Basel)* 10.
- Elbadawy M, Usui T, Yamawaki H, and Sasaki K (2018b) Novel Functions of Death-Associated Protein Kinases through Mitogen-Activated Protein Kinase-Related Signals. *Int J Mol Sci* 19.
- Elbadawy M, Usui T, Yamawaki H, and Sasaki K (2019b) Emerging Roles of C-Myc in Cancer Stem Cell-Related Signaling and Resistance to Cancer Chemotherapy: A Potential Therapeutic Target Against Colorectal Cancer. *Int J Mol Sci* 20.
- Elbadawy M, Yamanaka M, Goto Y, Hayashi K, Tsunedomi R, Hazama S, Nagano H, Yoshida T, Shibutani M, Ichikawa R, Nakahara J, Omatsu T, Mizutani T, Katayama Y, Shinohara Y, Abugomaa A, Kaneda M, Yamawaki H, Usui T, and Sasaki K (2020b) Efficacy of primary liver organoid culture from different stages of non-alcoholic steatohepatitis (NASH) mouse model. *Biomaterials* 237:119823.
- Elfadadny A, El-Husseiny HM, Abugomaa A, Ragab RF, Mady EA, Aboubakr M, Samir H, Mandour AS, El-Mleeh A, El-Far AH, Abd El-Aziz AH, and Elbadawy M (2021) Role of multidrug resistance-associated proteins in cancer therapeutics: past, present, and future perspectives. *Environ Sci Pollut Res Int* 28:49447-49466.
- Ermolayev V, Mohajerani P, Ale A, Sarantopoulos A, Aichler M, Kayser G, Walch A, and Ntziachristos V (2015) Early recognition of lung cancer by integrin targeted imaging in K-ras mouse model. *Int J Cancer* 137:1107-1118.
- Fassina A, Cappellesso R, Guzzardo V, Dalla Via L, Piccolo S, Ventura L, and Fassan M (2012) Epithelial-mesenchymal transition in malignant mesothelioma. *Mod Pathol* 25:86-99.
- Fu L, Shi K, Wang J, Chen W, Shi D, Tian Y, Guo W, Yu W, Xiao X, Kang T, Wang S, Huang W, and Deng W (2014) TFAP2B overexpression contributes to tumor growth and a poor prognosis of

- human lung adenocarcinoma through modulation of ERK and VEGF/PEDF signaling. *Mol Cancer* 13:89.
- Fukuoka H, Cooper O, Ben-Shlomo A, Mamelak A, Ren SG, Bruyette D, and Melmed S (2011) EGFR as a therapeutic target for human, canine, and mouse ACTH-secreting pituitary adenomas. *J Clin Invest* 121:4712-4721.
- Gao Y, Kruithof-de Julio M, Peng RW, and Dorn P (2022) Organoids as a Model for Precision Medicine in Malignant Pleural Mesothelioma: Where Are We Today? *Cancers (Basel)* 14.
- Gaver RC, George AM, Duncan GF, Morris AD, Deeb G, Faulkner HC, and Farnen RH (1988) The disposition of carboplatin in the beagle dog. *Cancer Chemother Pharmacol* 21:197-202.
- Gazdar AF, Gao B, and Minna JD (2010) Lung cancer cell lines: Useless artifacts or invaluable tools for medical science? *Lung Cancer* 68:309-318.
- Gilmartin AG, Bleam MR, Groy A, Moss KG, Minthorn EA, Kulkarni SG, Rominger CM, Erskine S, Fisher KE, Yang J, Zappacosta F, Annan R, Sutton D, and Laquerre SG (2011) GSK1120212 (JTP-74057) is an inhibitor of MEK activity and activation with favorable pharmacokinetic properties for sustained in vivo pathway inhibition. *Clin Cancer Res* 17:989-1000.
- Greco FA, and Hainsworth JD (1999) Paclitaxel-based therapy in non-small-cell lung cancer: improved third generation chemotherapy. *Ann Oncol* 10 Suppl 5:S63-67.
- Habanjar O, Diab-Assaf M, Caldefie-Chezet F, and Delort L (2021) 3D Cell Culture Systems: Tumor Application, Advantages, and Disadvantages. *Int J Mol Sci* 22.
- Han J, Liu Y, Yang S, Wu X, Li H, and Wang Q (2021) MEK inhibitors for the treatment of non-small cell lung cancer. *J Hematol Oncol* 14:1.
- Hershey AE, Kurzman ID, Forrest LJ, Bohling CA, Stonerook M, Placke ME, Imondi AR, and Vail DM (1999) Inhalation chemotherapy for macroscopic primary or metastatic lung tumors: proof of principle using dogs with spontaneously occurring tumors as a model. *Clin Cancer Res* 5:2653-2659.
- Hiriart E, Deepe R, and Wessels A (2019) Mesothelium and Malignant Mesothelioma. *J Dev Biol* 7.
- Ho WJ, Pham EA, Kim JW, Ng CW, Kim JH, Kamei DT, and Wu BM (2010) Incorporation of multicellular spheroids into 3-D polymeric scaffolds provides an improved tumor model for screening anticancer drugs. *Cancer Sci* 101:2637-2643.
- Horio D, Minami T, Kitai H, Ishigaki H, Higashiguchi Y, Kondo N, Hirota S, Kitajima K, Nakajima Y, Koda Y, Fujimoto E, Negi Y, Niki M, Kanemura S, Shibata E, Mikami K, Takahashi R, Yokoi T, Kuribayashi K, and Kijima T (2020) Tumor-associated macrophage-derived inflammatory cytokine enhances malignant potential of malignant pleural mesothelioma. *Cancer Sci* 111:2895-2906.
- Huang L, Holtzinger A, Jagan I, BeGora M, Lohse I, Ngai N, Nostro C, Wang R, Muthuswamy LB, Crawford HC, Arrowsmith C, Kalloger SE, Renouf DJ, Connor AA, Cleary S, Schaeffer DF, Roehrl M, Tsao MS, Gallinger S, Keller G, and Muthuswamy SK (2015) Ductal pancreatic cancer modeling and drug screening using human pluripotent stem cell- and patient-derived tumor organoids. *Nat Med* 21:1364-1371.

- Huang MH, Lee JH, Chang YJ, Tsai HH, Lin YL, Lin AM, and Yang JC (2013) MEK inhibitors reverse resistance in epidermal growth factor receptor mutation lung cancer cells with acquired resistance to gefitinib. *Mol Oncol* 7:112-120.
- Hudson AL, Weir C, Moon E, Harvie R, Klebe S, Clarke SJ, Pavlakis N, and Howell VM (2014) Establishing a panel of chemo-resistant mesothelioma models for investigating chemo-resistance and identifying new treatments for mesothelioma. *Sci Rep* 4:6152.
- Husain AN, Colby TV, Ordóñez NG, Allen TC, Attanoos RL, Beasley MB, Butnor KJ, Chirieac LR, Churg AM, Dacic S, Galateau-Sallé F, Gibbs A, Gown AM, Krausz T, Litzky LA, Marchevsky A, Nicholson AG, Roggli VL, Sharma AK, Travis WD, Walts AE, and Wick MR (2018) Guidelines for Pathologic Diagnosis of Malignant Mesothelioma 2017 Update of the Consensus Statement From the International Mesothelioma Interest Group. *Arch Pathol Lab Med* 142:89-108.
- Ito A, Hagiwara M, Mimura T, Matsumoto M, Wakayama T, Iseki S, Yokozaki H, and Okada M (2008) Expression of cell adhesion molecule 1 in malignant pleural mesothelioma as a cause of efficient adhesion and growth on mesothelium. *Lab Invest* 88:504-514.
- Jongsma J, van Montfort E, Vooijs M, Zevenhoven J, Krimpenfort P, van der Valk M, van de Vijver M, and Berns A (2008) A conditional mouse model for malignant mesothelioma. *Cancer Cell* 13:261-271.
- Kalra N, Zhang J, Thomas A, Xi L, Cheung M, Talarchek J, Burkett S, Tsokos MG, Chen Y, Raffeld M, Miettinen M, Pastan I, Testa JR, and Hassan R (2015) Mesothelioma patient derived tumor xenografts with defined BAP1 mutations that mimic the molecular characteristics of human malignant mesothelioma. *BMC Cancer* 15:376.
- Kawanishi K (2016) Diverse properties of the mesothelial cells in health and disease. *Pleura Peritoneum* 1:79-89.
- Kim H, Phung Y, and Ho M (2012) Changes in global gene expression associated with 3D structure of tumors: an ex vivo matrix-free mesothelioma spheroid model. *PLoS One* 7:e39556.
- Kim JH, Choi YK, Yoon HY, Kweon OK, and Kim DY (2002) Juvenile malignant mesothelioma in a dog. *J Vet Med Sci* 64:269-271.
- Kim KU, Wilson SM, Abayasiriwardana KS, Collins R, Fjellbirkeland L, Xu Z, Jablons DM, Nishimura SL, and Broaddus VC (2005) A novel in vitro model of human mesothelioma for studying tumor biology and apoptotic resistance. *Am J Respir Cell Mol Biol* 33:541-548.
- Kukuyan AM, Sementino E, Kadariya Y, Menges CW, Cheung M, Tan Y, Cai KQ, Slifker MJ, Peri S, Klein-Szanto AJ, Rauscher FJ, and Testa JR (2019) Inactivation of Bap1 cooperates with losses of Nf2 and Cdkn2a to drive the development of pleural malignant mesothelioma in conditional mouse models. *Cancer Res* 79:4113-4123.
- Kusumoto H, Shintani Y, Kanzaki R, Kawamura T, Funaki S, Minami M, Nagatomo I, Morii E, and Okumura M (2017) Podocalyxin influences malignant potential by controlling epithelial-mesenchymal transition in lung adenocarcinoma. *Cancer Sci* 108:528-535.
- Lancaster MA, and Knoblich JA (2014) Organogenesis in a dish: modeling development and disease

- using organoid technologies. *Science* 345:1247125.
- Lapp S, Pfankuche VM, Baumgärtner W, and Puff C (2014) Viral oncolysis - can insights from measles be transferred to canine distemper virus? *Viruses* 6:2340-2375.
- Lawrence J, Cameron D, and Argyle D (2015) Species differences in tumour responses to cancer chemotherapy. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci* 370.
- LeBlanc AK, and Mazcko CN (2020) Improving human cancer therapy through the evaluation of pet dogs. *Nat Rev Cancer* 20:727-742.
- Li S, Yang K, Chen X, Zhu X, Zhou H, Li P, Chen Y, Jiang Y, Li T, Qin X, Yang H, Wu C, Ji B, You F, and Liu Y (2021) Simultaneous 2D and 3D cell culture array for multicellular geometry, drug discovery and tumor microenvironment reconstruction. *Biofabrication* 13.
- Li X, Francies HE, Secrier M, Perner J, Miremadi A, Galeano-Dalmau N, Barendt WJ, Letchford L, Leyden GM, Goffin EK, Barthorpe A, Lightfoot H, Chen E, Gilbert J, Noorani A, Devonshire G, Bower L, Grantham A, MacRae S, Grehan N, Wedge DC, Fitzgerald RC, and Garnett MJ (2018) Organoid cultures recapitulate esophageal adenocarcinoma heterogeneity providing a model for clonality studies and precision therapeutics. *Nat Commun* 9:2983.
- Li Z, Qian Y, Li W, Liu L, Yu L, Liu X, Wu G, Wang Y, Luo W, Fang F, Liu Y, Song F, Cai Z, Chen W, and Huang W (2020) Human Lung Adenocarcinoma-Derived Organoid Models for Drug Screening. *iScience* 23:101411.
- Lin X, Liao J, Geng X, Dan H, and Chen L (2020) Concurrent inhibition of ErbB family and MEK/ERK kinases to suppress non-small cell lung cancer proliferation. *Am J Transl Res* 12:847-856.
- Lisowska M, Milczarek M, Ciekot J, Kutkowska J, Hildebrand W, Rapak A, and Miazek A (2019) An Antibody Specific for the Dog Leukocyte Antigen DR (DLA-DR) and Its Novel Methotrexate Conjugate Inhibit the Growth of Canine B Cell Lymphoma. *Cancers (Basel)* 11.
- Liu CM, Shen HT, Lin YA, Yu YL, Chen YS, Liu CJ, and Hsieh YH (2020) Antiproliferative and Antimetastatic Effects of Praeruptorin C on Human Non-Small Cell Lung Cancer Through Inactivating ERK/CTSD Signalling Pathways. *Molecules* 25.
- London CA (2009) Tyrosine kinase inhibitors in veterinary medicine. *Top Companion Anim Med* 24:106-112.
- Lorch G, Sivaprakasam K, Zismann V, Perdignes N, Contente-Cuomo T, Nazareno A, Facista S, Wong S, Drenner K, Liang WS, Amann JM, Sinicropi-Yao SL, Koenig MJ, La Perle K, Whitsett TG, Murtaza M, Trent JM, Carbone DP, and Hendricks WPD (2019) Identification of Recurrent Activating. *Clin Cancer Res* 25:5866-5877.
- Maeda S, Sakai K, Kaji K, Iio A, Nakazawa M, Motegi T, Yonezawa T, and Momoi Y (2022) Lapatinib as first-line treatment for muscle-invasive urothelial carcinoma in dogs. *Sci Rep* 12:4.
- Manning LS, Whitaker D, Murch AR, Garlepp MJ, Davis MR, Musk AW, and Robinson BW (1991) Establishment and characterization of five human malignant mesothelioma cell lines derived from pleural effusions. *Int J Cancer* 47:285-290.
- Marek LA, Hinz TK, von Mässenhausen A, Olszewski KA, Kleczko EK, Boehm D, Weiser-Evans MC, Nemenoff RA, Hoffmann H, Warth A, Gozgit JM, Perner S, and Heasley LE (2014)

- Nonamplified FGFR1 is a growth driver in malignant pleural mesothelioma. *Mol Cancer Res* 12:1460-1469.
- Mazzocchi AR, Rajan SAP, Votanopoulos KI, Hall AR, and Skardal A (2018) In vitro patient-derived 3D mesothelioma tumor organoids facilitate patient-centric therapeutic screening. *Sci Rep* 8:2886.
- McKillop D, Partridge EA, Hutchison M, Rhead SA, Parry AC, Bardsley J, Woodman HM, and Swaisland HC (2004) Pharmacokinetics of gefitinib, an epidermal growth factor receptor tyrosine kinase inhibitor, in rat and dog. *Xenobiotica* 34:901-915.
- McPhetridge JB, Scharf VF, Regier PJ, Toth D, Lorange M, Tremolada G, Dornbusch JA, Selmic LE, Bae S, Townsend KL, McAdoo JC, Thieman KM, Solari F, Walton RA, Romeiser J, Tuohy JL, and Oblak ML (2021) Distribution of histopathologic types of primary pulmonary neoplasia in dogs and outcome of affected dogs: 340 cases (2010-2019). *J Am Vet Med Assoc* 260:234-243.
- Mierzejewski M, Paplinska-Goryca M, Korczynski P, and Krenke R (2021) Primary human mesothelial cell culture in the evaluation of the inflammatory response to different sclerosing agents used for pleurodesis. *Physiol Rep* 9:e14846.
- Moberg HL, Gramer I, Schofield I, Blackwood L, Killick D, Priestnall SL, and Guillén A (2022) Clinical presentation, treatment and outcome of canine malignant mesothelioma: A retrospective study of 34 cases. *Vet Comp Oncol* 20:304-312.
- Moore AJ, Parker RJ, and Wiggins J (2008) Malignant mesothelioma. *Orphanet J Rare Dis* 3:34.
- Moore AS, Kirk C, and Cardona A (1991) Intracavitary cisplatin chemotherapy experience with six dogs. *J Vet Intern Med* 5:227-231.
- Mullenders J, de Jongh E, Brousalı A, Roosen M, Blom JPA, Begthel H, Korving J, Jonges T, Kranenburg O, Meijer R, and Clevers HC (2019) Mouse and human urothelial cancer organoids: A tool for bladder cancer research. *Proc Natl Acad Sci U S A* 116:4567-4574.
- Nagasaka M, and Gadgeel SM (2018) Role of chemotherapy and targeted therapy in early-stage non-small cell lung cancer. *Expert Rev Anticancer Ther* 18:63-70.
- Nanki K, Toshimitsu K, Takano A, Fujii M, Shimokawa M, Ohta Y, Matano M, Seino T, Nishikori S, Ishikawa K, Kawasaki K, Togasaki K, Takahashi S, Sukawa Y, Ishida H, Sugimoto S, Kawakubo H, Kim J, Kitagawa Y, Sekine S, Koo BK, Kanai T, and Sato T (2018) Divergent Routes toward Wnt and R-spondin Niche Independency during Human Gastric Carcinogenesis. *Cell* 174:856-869.e817.
- Noguchi S, Inoue M, Ichikawa T, Kurozumi K, Matsumoto Y, Nakamoto Y, Akiyoshi H, and Kamishina H (2021) The NRG3/ERBB4 signaling cascade as a novel therapeutic target for canine glioma. *Exp Cell Res* 400:112504.
- Okuda K, Sasaki H, Kawano O, Yukiue H, Yokoyama T, Yano M, and Fujii Y (2008) Epidermal growth factor receptor gene mutation, amplification and protein expression in malignant pleural mesothelioma. *J Cancer Res Clin Oncol* 134:1105-1111.
- Palmieri C, and Riccardi E (2013) Immunohistochemical expression of HOXA-13 in normal, hyperplastic and neoplastic canine prostatic tissue. *J Comp Pathol* 149:417-423.

- Pampaloni F, Reynaud EG, and Stelzer EH (2007) The third dimension bridges the gap between cell culture and live tissue. *Nat Rev Mol Cell Biol* 8:839-845.
- Paoloni M, and Khanna C (2008) Translation of new cancer treatments from pet dogs to humans. *Nat Rev Cancer* 8:147-156.
- Parekh PR, Botting GM, Thurber DB, Boruszcak M, Murphy W, and Bertenshaw GP (2022) Predictive biomarkers for response to trametinib in non-small cell lung cancer. *Tumour Biol* 44:249-267.
- Peng J, Ma K, Rong H, Xiao B, Zhu J, and He JT (2021) Knockdown of GBAS regulates esophageal cancer cell viability and apoptosis. *Mol Med Rep* 24.
- Philippeaux MM, Pache JC, Dahoun S, Barnet M, Robert JH, Mauël J, and Spiliopoulos A (2004) Establishment of permanent cell lines purified from human mesothelioma: morphological aspects, new marker expression and karyotypic analysis. *Histochem Cell Biol* 122:249-260.
- Piazzini M, Kojic S, Capanni C, Stamenkovic N, Bavelloni A, Marin O, Lattanzi G, Blalock W, and Cenni V (2021) Ectopic Expression of Ankrd2 Affects Proliferation, Motility and Clonogenic Potential of Human Osteosarcoma Cells. *Cancers (Basel)* 13.
- Poirier VJ, Burgess KE, Adams WM, and Vail DM (2004) Toxicity, dosage, and efficacy of vinorelbine (Navelbine) in dogs with spontaneous neoplasia. *J Vet Intern Med* 18:536-539.
- Polton G, Finotello R, Sabbatini S, Rossi F, Laganga P, Vasconi ME, Barbanera A, Stiborova K, Rohrer Bley C, and Marconato L (2018) Survival analysis of dogs with advanced primary lung carcinoma treated by metronomic cyclophosphamide, piroxicam and thalidomide. *Vet Comp Oncol* 16:399-408.
- Pulido I, Ollosi S, Aparisi S, Becker JH, Aliena-Valero A, Benet M, Rodríguez ML, López A, Tamayo-Torres E, Chuliá-Peris L, García-Cañaveras JC, Soucheray M, Dalheim AV, Salom JB, Qiu W, Kaja S, Fernández-Coronado JA, Alandes S, Alcácer J, Al-Shahrour F, Borgia JA, Juan O, Nishimura MI, Lahoz A, Carretero J, and Shimamura T (2020) Endothelin-1-Mediated Drug Resistance in. *Cancer Res* 80:4224-4232.
- Relan V, Morrison L, Parsonson K, Clarke BE, Duhig EE, Windsor MN, Matar KS, Naidoo R, Passmore L, McCaul E, Courtney D, Yang IA, Fong KM, and Bowman RV (2013) Phenotypes and karyotypes of human malignant mesothelioma cell lines. *PLoS One* 8:e58132.
- Rena O, Boldorini LR, Gaudino E, and Casadio C (2011) Epidermal growth factor receptor overexpression in malignant pleural mesothelioma: prognostic correlations. *J Surg Oncol* 104:701-705.
- Reynders K, Wauters E, Moisse M, Decaluwé H, De Leyn P, Peeters S, Lambrecht M, Nackaerts K, Doms C, Janssens W, Vansteenkiste J, Lambrechts D, and De Ruyscher D (2018) RNA-sequencing in non-small cell lung cancer shows gene downregulation of therapeutic targets in tumor tissue compared to non-malignant lung tissue. *Radiat Oncol* 13:131.
- Rose RJ, and Worley DR (2020) A Contemporary Retrospective Study of Survival in Dogs With Primary Lung Tumors: 40 Cases (2005-2017). *Front Vet Sci* 7:519703.
- Sabbatini S, Mancini FR, Marconato L, Bacci B, Rossi F, Vignoli M, and Bettini G (2014) EGFR overexpression in canine primary lung cancer: pathogenetic implications and impact on survival.

Vet Comp Oncol 12:237-248.

- Sachs N, Papaspyropoulos A, Zomer-van Ommen DD, Heo I, Böttinger L, Klay D, Weeber F, Huelsz-Prince G, Iakobachvili N, Amatngalim GD, de Ligt J, van Hoeck A, Proost N, Viveen MC, Lyubimova A, Teeven L, Derakhshan S, Korving J, Begthel H, Dekkers JF, Kumawat K, Ramos E, van Oosterhout MF, Offerhaus GJ, Wiener DJ, Olimpio EP, Dijkstra KK, Smit EF, van der Linden M, Jaksani S, van de Ven M, Jonkers J, Rios AC, Voest EE, van Moorsel CH, van der Ent CK, Cuppen E, van Oudenaarden A, Coenjaerts FE, Meyaard L, Bont LJ, Peters PJ, Tans SJ, van Zon JS, Boj SF, Vries RG, Beekman JM, and Clevers H (2019) Long-term expanding human airway organoids for disease modeling. *EMBO J* 38.
- Sakai K, Maeda S, Saeki K, Nakagawa T, Murakami M, Endo Y, Yonezawa T, Kadosawa T, Mori T, Nishimura R, and Matsuki N (2018) Anti-tumour effect of lapatinib in canine transitional cell carcinoma cell lines. *Vet Comp Oncol* 16:642-649.
- Salgueiro L, Kummer S, Sonntag-Buck V, Weiß A, Schneider MA, Kräusslich HG, and Sotillo R (2022) Generation of Human Lung Organoid Cultures from Healthy and Tumor Tissue to Study Infectious Diseases. *J Virol* 96:e0009822.
- Sang Y, Zhou F, Wang D, Bi X, Liu X, Hao Z, Li Q, and Zhang W (2016) Up-regulation of long non-coding HOTTIP functions as an oncogene by regulating HOXA13 in non-small cell lung cancer. *Am J Transl Res* 8:2022-2032.
- Sato T, Vries RG, Snippert HJ, van de Wetering M, Barker N, Stange DE, van Es JH, Abo A, Kujala P, Peters PJ, and Clevers H (2009) Single Lgr5 stem cells build crypt-villus structures in vitro without a mesenchymal niche. *Nature* 459:262-265.
- Sauter JL, Dacic S, Galateau-Salle F, Attanoos RL, Butnor KJ, Churg A, Husain AN, Kadota K, Khor A, Nicholson AG, Roggli V, Schmitt F, Tsao MS, and Travis WD (2022) The 2021 WHO Classification of Tumors of the Pleura: Advances Since the 2015 Classification. *J Thorac Oncol* 17:608-622.
- Schelch K, Kirschner MB, Williams M, Cheng YY, van Zandwijk N, Grusch M, and Reid G (2018) A link between the fibroblast growth factor axis and the miR-16 family reveals potential new treatment combinations in mesothelioma. *Mol Oncol* 12:58-73.
- Schramm A, Opitz I, Thies S, Seifert B, Moch H, Weder W, and Soltermann A (2010) Prognostic significance of epithelial-mesenchymal transition in malignant pleural mesothelioma. *Eur J Cardiothorac Surg* 37:566-572.
- Seastedt KP, Pruett N, and Hoang CD (2021) Mouse models for mesothelioma drug discovery and development. *Expert Opin Drug Discov* 16:697-708.
- Sementino E, Menges CW, Kadariya Y, Peri S, Xu J, Liu Z, Wilkes RG, Cai KQ, Rauscher FJ, Klein-Szanto AJ, and Testa JR (2018) Inactivation of Tp53 and Pten drives rapid development of pleural and peritoneal malignant mesotheliomas. *J Cell Physiol* 233:8952-8961.
- Seo KW, Choi US, Jung YC, Hong SJ, Byeun YE, Kang MS, Pachrin B, Kim WH, Hwang CY, Kim DY, Youn HY, and Lee CW (2007) Palliative intravenous cisplatin treatment for concurrent peritoneal and pleural mesothelioma in a dog. *J Vet Med Sci* 69:201-204.

- Shamseddin M, Obacz J, Garnett MJ, Rintoul RC, Francies HE, and Marciniak SJ (2021) Use of preclinical models for malignant pleural mesothelioma. *Thorax* 76:1154-1162.
- Shi R, Radulovich N, Ng C, Liu N, Notsuda H, Cabanero M, Martins-Filho SN, Raghavan V, Li Q, Mer AS, Rosen JC, Li M, Wang YH, Tamblyn L, Pham NA, Haibe-Kains B, Liu G, Moghal N, and Tsao MS (2020) Organoid Cultures as Preclinical Models of Non-Small Cell Lung Cancer. *Clin Cancer Res* 26:1162-1174.
- Son NV, Chambers JK, Shiga T, Kishimoto TE, Kikuhara S, Saeki K, Fujiwara R, Tsuboi M, Nishimura R, Uchida K, and Nakayama H (2018) Sarcomatoid mesothelioma of tunica vaginalis testis in the right scrotum of a dog. *J Vet Med Sci* 80:1125-1128.
- Spugnini EP, Crispi S, Scarabello A, Caruso G, Citro G, and Baldi A (2008) Piroxicam and intracavitary platinum-based chemotherapy for the treatment of advanced mesothelioma in pets: preliminary observations. *J Exp Clin Cancer Res* 27:6.
- Su Y, Zhang X, Bidlingmaier S, Behrens CR, Lee NK, and Liu B (2020) ALPPL2 Is a Highly Specific and Targetable Tumor Cell Surface Antigen. *Cancer Res* 80:4552-4564.
- Subbiah V, Baik C, and Kirkwood JM (2020) Clinical Development of BRAF plus MEK Inhibitor Combinations. *Trends Cancer* 6:797-810.
- Subramanian A, Tamayo P, Mootha VK, Mukherjee S, Ebert BL, Gillette MA, Paulovich A, Pomeroy SL, Golub TR, Lander ES, and Mesirov JP (2005) Gene set enrichment analysis: a knowledge-based approach for interpreting genome-wide expression profiles. *Proc Natl Acad Sci U S A* 102:15545-15550.
- Sung H, Ferlay J, Siegel RL, Laversanne M, Soerjomataram I, Jemal A, and Bray F (2021) Global Cancer Statistics 2020: GLOBOCAN Estimates of Incidence and Mortality Worldwide for 36 Cancers in 185 Countries. *CA Cancer J Clin* 71:209-249.
- Suzui M, Futakuchi M, Fukamachi K, Numano T, Abdelgied M, Takahashi S, Ohnishi M, Omori T, Tsuruoka S, Hirose A, Kanno J, Sakamoto Y, Alexander DB, Alexander WT, Jiegou X, and Tsuda H (2016) Multiwalled carbon nanotubes intratracheally instilled into the rat lung induce development of pleural malignant mesothelioma and lung tumors. *Cancer Sci* 107:924-935.
- Tanabe A, Deguchi T, Sato T, Nemoto Y, Maruo T, Madarame H, Shida T, Naya Y, Ogihara K, and Sahara H (2016) Radioresistance of cancer stem-like cell derived from canine tumours. *Vet Comp Oncol* 14:e93-e101.
- Teng KT, Brodbelt DC, Pegram C, Church DB, and O'Neill DG (2022) Life tables of annual life expectancy and mortality for companion dogs in the United Kingdom. *Sci Rep* 12:6415.
- Thurneysen C, Opitz I, Kurtz S, Weder W, Stahel RA, and Felley-Bosco E (2009) Functional inactivation of NF2/merlin in human mesothelioma. *Lung Cancer* 64:140-147.
- Tranchant R, Montagne F, Jaurand MC, and Jean D (2018) [Molecular heterogeneity of malignant pleural mesotheliomas]. *Bull Cancer* 105:35-45.
- Travis WD, Brambilla E, Nicholson AG, Yatabe Y, Austin JHM, Beasley MB, Chirieac LR, Dacic S, Duhig E, Flieder DB, Geisinger K, Hirsch FR, Ishikawa Y, Kerr KM, Noguchi M, Pelosi G, Powell CA, Tsao MS, Wistuba I, and Panel W (2015) The 2015 World Health Organization

- Classification of Lung Tumors: Impact of Genetic, Clinical and Radiologic Advances Since the 2004 Classification. *J Thorac Oncol* 10:1243-1260.
- Tsagkouli S, Kyriakoulis IG, Kyriakoulis KG, Fyta E, Syrigos A, Bakakos P, Charpidou A, and Kotteas E (2022) Serum and Pleural Soluble Cell Adhesion Molecules in Mesothelioma Patients: A Retrospective Cohort Study. *Cancers (Basel)* 14.
- Tsugeno Y, Sato F, Muragaki Y, and Kato Y (2014) Cell culture of human gingival fibroblasts, oral cancer cells and mesothelioma cells with serum-free media, STK1 and STK2. *Biomed Rep* 2:644-648.
- Usami N, Fukui T, Kondo M, Taniguchi T, Yokoyama T, Mori S, Yokoi K, Horio Y, Shimokata K, Sekido Y, and Hida T (2006) Establishment and characterization of four malignant pleural mesothelioma cell lines from Japanese patients. *Cancer Sci* 97:387-394.
- Usui T, Sakurai M, Enjoji S, Kawasaki H, Umata K, Ohama T, Fujiwara N, Yabe R, Tsuji S, Yamawaki H, Hazama S, Takenouchi H, Nakajima M, Tsunedomi R, Suzuki N, Nagano H, and Sato K (2016) Establishment of a Novel Model for Anticancer Drug Resistance in Three-Dimensional Primary Culture of Tumor Microenvironment. *Stem Cells Int* 2016:7053872.
- Usui T, Sakurai M, Nishikawa S, Umata K, Nemoto Y, Haraguchi T, Itamoto K, Mizuno T, Noguchi S, Mori T, Iwai S, Nakagawa T, Yamawaki H, Ohama T, and Sato K (2017) Establishment of a dog primary prostate cancer organoid using the urine cancer stem cells. *Cancer Sci* 108:2383-2392.
- Usui T, Sakurai M, Umata K, Elbadawy M, Ohama T, Yamawaki H, Hazama S, Takenouchi H, Nakajima M, Tsunedomi R, Suzuki N, Nagano H, Sato K, Kaneda M, and Sasaki K (2018) Hedgehog Signals Mediate Anti-Cancer Drug Resistance in Three-Dimensional Primary Colorectal Cancer Organoid Culture. *Int J Mol Sci* 19.
- van de Wetering M, Francies HE, Francis JM, Bounova G, Iorio F, Pronk A, van Houdt W, van Gorp J, Taylor-Weiner A, Kester L, McLaren-Douglas A, Blokker J, Jaksani S, Bartfeld S, Volckman R, van Sluis P, Li VS, Seepo S, Sekhar P, Pedamallu C, Cibulskis K, Carter SL, McKenna A, Lawrence MS, Lichtenstein L, Stewart C, Koster J, Versteeg R, van Oudenaarden A, Saez-Rodriguez J, Vries RG, Getz G, Wessels L, Stratton MR, McDermott U, Meyerson M, Garnett MJ, and Clevers H (2015) Prospective derivation of a living organoid biobank of colorectal cancer patients. *Cell* 161:933-945.
- Vijayakumar T, Rameshkumar A, Krishnan R, Bose D, V V, and G N (2023) Evaluation of the Anti-Carcinogenic Effect of Centella Asiatica on Oral Cancer Cell Line: In vitro Study. *Asian Pac J Cancer Prev* 24:1695-1700.
- Vlacic G, Hoda MA, Klikovits T, Sinn K, Gschwandtner E, Mohorcic K, Schelch K, Pirker C, Peter-Vörösmarty B, Brankovic J, Dome B, Laszlo V, Cufer T, Rozman A, Klepetko W, Grasl-Kraupp B, Hegedus B, Berger W, Kern I, and Grusch M (2019) Expression of FGFR1-4 in Malignant Pleural Mesothelioma Tissue and Corresponding Cell Lines and its Relationship to Patient Survival and FGFR Inhibitor Sensitivity. *Cells* 8.
- Vural SA, Ozyildiz Z, and Ozsoy SY (2007) Pleural mesothelioma in a nine-month-old dog. *Ir Vet J* 60:30-33.

- Wang J, Li X, and Chen H (2020) Organoid models in lung regeneration and cancer. *Cancer Lett* 475:129-135.
- Wei BR, Michael HT, Halsey CH, Peer CJ, Adhikari A, Dwyer JE, Hoover SB, El Meskini R, Kozlov S, Weaver Ohler Z, Figg WD, Merlino G, and Simpson RM (2016) Synergistic targeted inhibition of MEK and dual PI3K/mTOR diminishes viability and inhibits tumor growth of canine melanoma underscoring its utility as a preclinical model for human mucosal melanoma. *Pigment Cell Melanoma Res* 29:643-655.
- Wolff AC, Hammond ME, Hicks DG, Dowsett M, McShane LM, Allison KH, Allred DC, Bartlett JM, Bilous M, Fitzgibbons P, Hanna W, Jenkins RB, Mangu PB, Paik S, Perez EA, Press MF, Spears PA, Vance GH, Viale G, Hayes DF, Oncology ASOC, and Pathologists CoA (2013) Recommendations for human epidermal growth factor receptor 2 testing in breast cancer: American Society of Clinical Oncology/College of American Pathologists clinical practice guideline update. *J Clin Oncol* 31:3997-4013.
- Wolff AC, Hammond MEH, Allison KH, Harvey BE, Mangu PB, Bartlett JMS, Bilous M, Ellis IO, Fitzgibbons P, Hanna W, Jenkins RB, Press MF, Spears PA, Vance GH, Viale G, McShane LM, and Dowsett M (2018) Human Epidermal Growth Factor Receptor 2 Testing in Breast Cancer: American Society of Clinical Oncology/College of American Pathologists Clinical Practice Guideline Focused Update. *J Clin Oncol* 36:2105-2122.
- Wouda RM, Miller ME, Chon E, and Stein TJ (2015) Clinical effects of vinorelbine administration in the management of various malignant tumor types in dogs: 58 cases (1997-2012). *J Am Vet Med Assoc* 246:1230-1237.
- Wu L, Allo G, John T, Li M, Tagawa T, Opitz I, Anraku M, Yun Z, Pintilie M, Pitcher B, Liu G, Feld R, Johnston MR, de Perrot M, and Tsao MS (2017) Patient-Derived Xenograft Establishment from Human Malignant Pleural Mesothelioma. *Clin Cancer Res* 23:1060-1067.
- Xiang X, Phung Y, Feng M, Nagashima K, Zhang J, Broaddus VC, Hassan R, Fitzgerald D, and Ho M (2011) The development and characterization of a human mesothelioma in vitro 3D model to investigate immunotoxin therapy. *PLoS One* 6:e14640.
- Xu M, Cheng A, Yu L, Wei W, Li J, and Cai C (2022) AHNK2 is a biomarker and a potential therapeutic target of adenocarcinomas. *Acta Biochim Biophys Sin (Shanghai)* 54:1708-1719.
- Yamamoto H, Elbadawy M, Fujisaka K, Sato Y, Ohmori T, Shinohara Y, Hatano Y, Kobayashi D, Gomyo A, Sudo Y, Azakami D, Uchida T, Fukushima R, Morita S, Abugomaa A, Yamawaki H, Kaneda M, Usui T, and Sasaki K (2021) Evaluation of the Safety and Feasibility of Apheresis in Dogs: For Application in Metastatic Cancer Research. *Animals (Basel)* 11.
- Yamazaki H, Tanaka T, Mie K, Nishida H, Miura N, and Akiyoshi H (2020) Assessment of postoperative adjuvant treatment using toceranib phosphate against adenocarcinoma in dogs. *J Vet Intern Med* 34:1272-1281.
- Yan HHN, Siu HC, Law S, Ho SL, Yue SSK, Tsui WY, Chan D, Chan AS, Ma S, Lam KO, Bartfeld S, Man AHY, Lee BCH, Chan ASY, Wong JWH, Cheng PSW, Chan AKW, Zhang J, Shi J, Fan X, Kwong DLW, Mak TW, Yuen ST, Clevers H, and Leung SY (2018) A Comprehensive Human

- Gastric Cancer Organoid Biobank Captures Tumor Subtype Heterogeneity and Enables Therapeutic Screening. *Cell Stem Cell* 23:882-897.e811.
- Yokota E, Iwai M, Yukawa T, Yoshida M, Naomoto Y, Haisa M, Monobe Y, Takigawa N, Guo M, Maeda Y, Fukazawa T, and Yamatsuji T (2021) Clinical application of a lung cancer organoid (tumoroid) culture system. *NPJ Precis Oncol* 5:29.
- Yoshida T, Kobayashi M, Uomoto S, Ohshima K, Hara E, Katoh Y, Takahashi N, Harada T, Usui T, Elbadawy M, and Shibutani M (2022) The potential of organoids in toxicologic pathology: role of toxicologic pathologists in. *J Toxicol Pathol* 35:225-235.
- Yoshimoto S, Kato D, Kamoto S, Yamamoto K, Tsuboi M, Shinada M, Ikeda N, Tanaka Y, Yoshitake R, Eto S, Saeki K, Chambers J, Hashimoto Y, Uchida K, Nishimura R, and Nakagawa T (2020) Overexpression of human epidermal growth factor receptor 2 in canine primary lung cancer. *J Vet Med Sci* 82:804-808.
- Yuen ML, Zhuang L, Rath EM, Yu T, Johnson B, Sarun KH, Wang Y, Kao S, Linton A, Clarke CJ, McCaughan BC, Takahashi K, Lee K, and Cheng YY (2021) The Role of E-Cadherin and microRNA on FAK Inhibitor Response in Malignant Pleural Mesothelioma (MPM). *Int J Mol Sci* 22.
- Zardab M, Stasinou K, Grose RP, and Kocher HM (2022) The Obscure Potential of AHNAK2. *Cancers (Basel)* 14.
- Zauderer MG, Martin A, Egger J, Rizvi H, Offin M, Rimmer A, Adusumilli PS, Rusch VW, Kris MG, Sauter JL, Ladanyi M, and Shen R (2021) The use of a next-generation sequencing-derived machine-learning risk-prediction model (OncoCast-MPM) for malignant pleural mesothelioma: a retrospective study. *Lancet Digit Health* 3:e565-e576.
- Zeira O, Ghezzi E, Pettinari L, Re V, Lupi DM, Benali SL, Borgonovo S, Alessandri G, Petrella F, Paroni R, Dei Cas M, Tremolada C, Coccè V, and Pessina A (2020) Case Report: Microfragmented Adipose Tissue Drug Delivery in Canine Mesothelioma: A Case Report on Safety, Feasibility, and Clinical Findings. *Front Vet Sci* 7:585427.
- Zhang W, Hong R, Xue L, Ou Y, Liu X, Zhao Z, Xiao W, Dong D, Dong L, Fu M, Ma L, Lu N, Chen H, Song Y, and Zhan Q (2017) Piccolo mediates EGFR signaling and acts as a prognostic biomarker in esophageal squamous cell carcinoma. *Oncogene* 36:3890-3902.

図表

表 1-1 症例情報

検体名	年齢	犬種	性別	腫瘍を含む肺葉部位	病理組織学的診断
20001	15 歳	ミニチュア・ダックスフンド	去勢オス	左肺後葉	肺腺癌
21001	9 歳	フレンチ・ブルドッグ	去勢オス	右肺前葉	肺原発性神経内分泌腫瘍
21003	12 歳	トイ・プードル	去勢オス	左肺前葉	肺腺癌
21004	15 歳	シー・ズー	去勢オス	左肺後葉	肺腺癌
21007	15 歳	雑種	避妊メス	左肺後葉	肺腺癌
22001	9 歳	チワワ	避妊メス	右肺前葉	肺腺癌

すべての被検犬は肺葉切除を実施される前に肺腫瘍に対する内科療法は受けていない。

表 1-2 保存用培養液

名称	入手会社	カタログ番号	保存時濃度	総量	混合後最終濃度
Advanced DMEM/F12 (1x)	Gibco	12634-010		500 ml	
HEPES	Dojindo	342-01375	1M	1 ml	2 mM
GlutaMAX-1 (100x)	Gibco	35050-061		5 ml	
Penicillin-Streptomycin Solution (100x)	WAKO	168-23191		5 ml	
Primocin	Nacalai tesque	14860	50 mg/ml	1 ml	100 µg/ml

表 1-3 犬原発性肺腫瘍オルガノイドの培養液

名称	入手会社	カタログ番号	保存時濃度	総量	混合後最終濃度
Advanced DMEM/F12	Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA	12634-010		25 ml	
L-WNR conditioned medium as a source of 50% Wnt, Noggin and R-Spondin	Prepared in Lab from L-WRN cells (CRL-3276TM)			25 ml	
HEPES	Dojindo	342-01375	1M	0.5 ml	2 mM
GlutaMAX-1 (100x)	Gibco	35050-061		5 ml	
Nicotinamide	Sigma	N0630	1M	5 ml	10 mM
N-Acetyl-l-cysteine	LKT Laboratories	A0918	500 mM	1 ml	1 mM
A83-01	Adooq Bioscience	A12358	5 mM	5 µl	500 nM
Murine EGF	PeptoTech	315-09-1MG	500 µg/ml	5 µl	50 ng/ml
FGF7	PeptoTech	AF-100-19	10 µg/ml	25 µl	5 ng/ml
TGFα	PeptoTech	120 - 10C	20 µg/ml	50µl	20 ng/ml
Primocin	InvivoGen	ant-pm-2	50 mg/ml	100 µl	100 µg/ml
Penicillin-Streptomycin (100x)	WAKO	168-23191		10 ml	1%

表 1-4 図 1-6 における統計学的パラメーター

薬剤および系統 n 数 (test vs control)		P-value (bilateral) vs. control (両側 p 値)				DF Total (自由度)				t-value vs. control (等分散の 2 標本を対象)			
		0.1	1	10	100	0.1	1	10	100	0.1	1	10	100
カルボプラチン濃度 (μg/ml)													
LC20001	n=9 (9 vs 9)	0.381	0.412	0.021	<0.001	16	16	16	16	-0.902	-0.842	2.556	4.421
LC21001	n=6 (6 vs 6)	0.797	0.193	<0.001	<0.001	10	10	10	10	0.264	1.395	4.855	7.419
LC21004	n=6 (6 vs 6)	0.691	0.601	0.012	<0.001	10	10	10	10	0.410	0.540	3.043	4.991
ドキシソルビシン濃度 (nM)													
LC20001	n=9 (9 vs 9)	0.040	0.006	0.384	<0.001	16	16	16	16	-2.241	-3.181	0.896	4.393
LC21001	n=6 (6 vs 6)	0.352	0.276	<0.001	<0.001	10	10	10	10	-0.976	-1.152	5.491	6.994
LC21004	n=6 (6 vs 6)	0.661	0.729	0.004	<0.001	10	10	10	10	-0.451	-0.356	3.797	5.009
シスプラチン濃度 (μM)													
LC20001	n=9 (9 vs 9)	0.55	0.00	<0.001	<0.001	16	16	16	16	0.611	3.592	5.284	16.918
LC21001	n=6 (6 vs 6)	0.69	0.00	<0.001	<0.001	10	10	10	10	-0.404	3.896	6.620	9.203
LC21004	n=6 (6 vs 6)	0.80	1.00	0.59	<0.001	10	10	10	10	-0.257	-0.004	0.559	4.857
メトトレキサート濃度 (μM)													
LC20001	n=6 (6 vs 6)	0.062	0.859	0.034	0.005	10	10	10	10	-2.096	0.183	2.449	3.642
LC21001	n=6 (6 vs 6)	0.257	<0.001	<0.001	<0.001	10	10	10	10	1.203	5.584	6.636	6.111
LC21004	n=6 (6 vs 6)	0.043	0.009	0.007	0.004	10	10	10	10	2.318	3.205	3.381	3.756
シクロホスファミド濃度 (μM)													
LC20001	n=6 (6 vs 6)	0.852	0.449	0.480	0.781	10	10	10	10	-0.192	-0.788	-0.734	-0.286
LC21001	n=6 (6 vs 6)	0.122	0.072	0.225	0.010	10	10	10	10	-1.688	-2.011	-1.292	3.166
LC21004	n=6 (6 vs 6)	0.713	0.498	0.360	0.048	10	10	10	10	0.378	0.704	0.959	2.255
パクリタキセル濃度 (μM)													
LC20001	n=9 (9 vs 9)	<0.001	<0.001	<0.001	<0.001	16	16	16	16	9.539	11.630	8.221	10.270
LC21001	n=6 (6 vs 6)	<0.001	<0.001	<0.001	<0.001	10	10	10	10	7.397	7.755	7.736	7.599
LC21004	n=6 (6 vs 6)	<0.001	<0.001	<0.001	<0.001	10	10	10	10	4.837	4.566	5.055	5.436
LC22001	n=6 (6 vs 6)	<0.001	<0.001	<0.001	<0.001	10	10	10	10	15.976	17.335	13.105	16.383
ビノレルビン濃度 (μM)													
LC20001	n=3 (3 vs 3)	0.011	0.015	0.007	0.007	4	4	4	4	4.491	4.117	5.015	5.141
LC21001	n=6 (6 vs 6)	0.003	<0.001	<0.001	<0.001	10	10	10	10	3.956	6.466	6.930	6.852
LC21004	n=6 (6 vs 6)	0.004	<0.001	<0.001	<0.001	10	10	10	10	3.754	6.017	7.395	7.255
LC21007	n=3 (3 vs 6)	<0.001	<0.001	<0.001	<0.001	7	7	7	7	9.584	12.005	12.319	12.420
LC22001	n=6 (6 vs 6)	0.020	<0.001	<0.001	<0.001	10	10	10	10	2.769	15.561	16.642	16.323

表 1-5 図 1-7 における統計学的パラメータ

薬剤および系統 n 数 (test vs control)		P-value (bilateral) vs. control (両側 p 値)				DF Total (自由度)				t-value vs. control (等分散の 2 標本を対象)			
		0.01	0.1	1	10	0.01	0.1	1	10	0.01	0.1	1	10
ラパチニブ濃度 (μM)		0.01	0.1	1	10	0.01	0.1	1	10	0.01	0.1	1	10
LC20001	n=9 (9 vs 9)	0.374	0.765	0.960	<0.001	16	16	16	16	-0.914	-0.304	0.051	5.585
LC21001	n=6 (6 vs 6)	0.657	0.198	<0.001	<0.001	10	10	10	10	-0.458	1.378	7.311	10.680
LC21004	n=6 (6 vs 6)	0.652	0.895	0.002	<0.001	10	10	10	10	0.465	0.135	4.086	8.646
LC21007	n=3 (3 vs 6)	0.516	0.002	<0.001	<0.001	7	7	7	7	-0.684	4.662	12.089	14.013
LC22001	n=6 (6 vs 6)	0.923	0.575	0.002	<0.001	10	10	10	10	-0.100	0.579	4.126	21.242
ゲフィチニブ濃度 (μM)		0.03	0.1	0.3	1	0.03	0.1	0.3	1	0.03	0.1	0.3	1
LC20001	n=6 (6 vs 6)	0.633	0.818	0.036	0.353	10	10	10	10	0.493	0.236	2.419	0.974
LC21001	n=6 (6 vs 6)	0.718	0.003	<0.001	<0.001	10	10	10	10	-0.372	3.891	8.814	9.379
LC21004	n=6 (6 vs 6)	0.304	0.005	0.001	<0.001	10	10	10	10	1.083	3.632	4.504	5.582
LC21007	n=3 (3 vs 6)	<0.001	<0.001	<0.001	<0.001	7	7	7	7	5.838	10.205	11.730	11.279
LC22001	n=6 (6 vs 6)	0.818	0.270	<0.001	<0.001	10	10	10	10	-0.237	1.167	5.532	6.781

表 1-6 図 1-9 における統計学的パラメータ①

検体名	EGFR 過剰発現レベルを評価するために観察した視野数 (対物レンズ 10 倍)	ゲフィチニブの IC50 値 (μM)	HER2 過剰発現レベルを評価するために観察した視野数 (対物レンズ 10 倍)	ラパチニブの IC50 値 (μM)
LC20001	4	>1	4	5.77
LC21001	4	0.11	4	0.41
LC21004	4	0.18	4	0.84
LC21007	4	0.04	4	0.19
LC22001	4	>1	4	2.23

表 1-7 図 1-9 における統計学的パラメータ②

比較対象	肺腫瘍オルガノイド検体数	Pearson's r	P-value (bilateral) (両側 p 値)	DF Total (自由度)	t-value (対をなす標本を対象)
EGFR vs Gefitinib	n=5	-0.5180	0.3712	3	1.0490
HER2 vs Lapatinib	n=5	-0.3063	0.6162	3	0.5572

表 2-1 保存用培養液

名称	入手会社	カタログ番号	保存時濃度	総量	混合後最終濃度
Advanced DMEM/F12 (1x)	Gibco	12634-010		500 ml	
HEPES	Dojindo	342-01375	1M	1 ml	2 mM
GlutaMAX-1 (100x)	Gibco	35050-061		5 ml	
Penicillin-Streptomycin Solution (100x)	WAKO	168-23191		5 ml	
Primocin	Nacalai tesque	14860	50 mg/ml	1 ml	100 µg/ml

表 2-2 検体情報

検体名	年齢	犬種	性別	検体採取日 (日/月/年)	先行治療	特記事項
MC20001				10/26/2020	治療無	
MC21001	9 歳	トイ プードル	去勢 オス	01/15/2021	50 mg/m ² カルボプラチンの胸腔内投与（初回）	MC20001 ， MC21001 ， MC21004 は被検犬 1 から採 取された胸水由来検体
MC21004				04/28/2021	50 mg/m ² カルボプラチンの胸腔内投与（2 回目）	
MC21005	10 歳	トイ プードル	避妊 メス	06/16/2021	治療無	
MC21009	11 歳	柴犬	去勢 オス	08/04/2021	50 mg/m ² カルボプラチンの胸腔内投与（2 回目）	MC21009, MC21010 は被検 犬 3 から採取された胸水由 来検体
MC21010				10/20/2021	50 mg/m ² カルボプラチンの胸腔内投与（3 回目）	
MC19009			No data		No data	長期継代された二次元培養 細胞

すべての被検犬は心膜切除手術を受け、病理組織学的に心膜中皮腫と診断された。

表 2-3 悪性中皮腫オルガノイド培養液

名称	入手会社	カタログ番号	保存時濃度	総量	混合後最終濃度
Advanced DMEM/F12	Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA	12634-010		25 mL	
L-WNR conditioned medium as a source of 50% Wnt, Noggin and R-Spondin	Prepared in Lab from L-WRN cells (CRL-3276TM)			25 ml	
HEPES	Dojindo	342-01375	1M	0.5 ml	2 mM
GlutaMAX-1 (100x)	Gibco	35050-061		5 ml	
Nicotinamide	Sigma	N0630	1M	5 ml	10 mM
N-Acetyl-l-cysteine	LKT Laboratories	A0918	500 mM	1 ml	1 mM
A83-01	Adooq Bioscience	A12358	5 mM	5 µl	500 nM
Murine EGF	PeproTech	315-09-1MG	500 µg/ml	5 µl	50 ng/ml
<u>FGF2*</u>	Peprotech	AF-100-18B	10 µg/ml	25 µl	5 ng/ml
<u>FGF7**</u>	PeproTech	AF-100-19	10 µg/ml	25 µl	5 ng/ml
Primocin	InvivoGen	ant-pm-2	50 mg/mL	100 µl	100 µg/ml
Penicillin-Streptomycin (100x)	WAKO	168-23191		10 ml	1%
<u>Hydrocortisone**</u>	東京化成工業	H0533	1 mg/ml	50 µl	1 µg/ml
<u>Heparin**</u>	東京化成工業	H0393	2 mg/ml	50 µl	2 µg/ml

*FGF2 は培養液最適化以降で添加。

**FGF7, Hydrocortisone および Heparin は初代培養時のみ添加し, 培養液の最適化以降は添加せず。

表 2-4 二次元細胞培養液

名称	入手会社	カタログ番号	保存時濃度	総量	混合後最終濃度
Roswell Park Memorial Institute - 1640 (RPMI -1640)	Sigma-Aldrich	R8758-500ML		25 mL	
GlutaMAX-1 (100x)	Gibco	35050-061		5 ml	
Murine EGF	PeptoTech	315-09-1MG	500 µg/ml	5 µl	50 ng/ml
<u>FGF2*</u>	Peptidech	AF-100-18B	10 µg/ml	25 µl	5 ng/ml
Primocin	InvivoGen	ant-pm-2	50 mg/mL	100 µl	100 µg/ml
Penicillin-Streptomycin (100x)	WAKO	168-23191		10 ml	1%
<u>Hydrocortisone**</u>	東京化成工業	H0533	1 mg/ml	50 µl	1 µg/ml
<u>Heparin**</u>	東京化成工業	H0393	2 mg/ml	50 µl	2 µg/ml

*FGF2 はオルガノイド培養液最適化実施後、条件をそろえるために添加。

**Hydrocortisone および Heparin は初代培養のみ添加し、継代培養時は添加せず。

表 2-5 定量的リアルタイム PCR に用いたプライマー情報

遺伝子名	プライマー種類	プライマー配列
GAPDH	Forward	5'-AACTCCCTCAAGATTGTCAGCAA-3'
	Reverse	5'-CATGGATGACTTTGGCTAGAGGA-3'
CDH1	Forward	5'-CGTCGAAATCGCTGTACTCA-3'
	Reverse	5'-GGTGGAGAGGATGACCTCAA-3'
CDH2	Forward	5'-CAGACATGGAAGGCAATCCT-3'
	Reverse	5'-TGACTAAGCCGTCATTGCTG-3'
VIM	Forward	5'-GTACCGGAGACAGGTGCAGT-3'
	Reverse	5'-TCCAGCAGCTTCCTGTAGGT-3'
ITGAE	Forward	5'-GGGGAAGTGATCCAGACTGA-3'
	Reverse	5'-GAGGTTGAGTGGGTCTCCAA-3'
ITGAV	Forward	5'-GGGGAAGTGATCCAGACTGA-3'
	Reverse	5'-GAGGTTGAGTGGGTCTCCAA-3'
ITGA2	Forward	5'-TCACTGACGTGTCCATTGGT-3'
	Reverse	5'-AGGTCTAAACTTGGCGCTGA-3'
ITGA3	Forward	5'-ACAAGACCGTGTGGTTCTCC-3'
	Reverse	5'-CTCTTCATCTCCGCCTTCTG-3'
ITGA6	Forward	5'-TGATAGCCGTCATCCCTTTC-3'
	Reverse	5'-ATCGGTTTGGATCCACCATA-3'

表 2-6 免疫化学染色による悪性中皮腫オルガノイドおよび二次元培養細胞における各マーカータンパクの陽性率

1次抗体の種類	MC20001 Org / 2D (%)	MC21001 Org / 2D (%)	MC21004 Org / 2D (%)	MC21009 Org / 2D (%)	MC21001* Org / 2D (%)	MC19009* Org / 2D (%)
AE1/AE3	52/56	100/100	100/82	100/4	89/79	5/100
WT-1	48/5	6/0	49/5	23/0	0/0	0/0
Mesothelin	89/59	0/100	31/18	95/32	20/10	95/100
Vimentin	53/100	89/100	77/100	79/100	84/83	99/100
E-cadherin	100/0	57/0	98/0	79/0	69/33	0/0

表 2-7 悪性中皮腫オルガノイドおよび二次元培養細胞における各抗がん剤に対する IC50 値

IC ₅₀ 値	検体番号	Carboplatin (μg/ml)	Cisplatin (μM)	Doxorubicin (nM)	Gemcitabine (μM)
IC ₅₀ (organoid / 2D)	MC19009	>100 / 36.3	66.0 / 18.4	>100 / >100	>100 / 13.6
	MC21001	89.2 / >100	26.9 / 20.5	>100 / >100	27.4 / >100
	MC21009	>100 / >100	56.9 / 29.3	>100 / >100	>100 / >100

表 2-8 図 2-9 における統計学的パラメーター

薬剤および系統 n 数 (test vs control)		P-value (bilateral) vs. control (両側 p 値)				DF Total (自由度)				t-value vs. control (等分散の 2 標本を対象)			
カルボプラチン (μg/ml)		0.1	1	10	100	0.1	1	10	100	0.1	1	10	100
MC21001 org	n=6 (6 vs 6)	0.097	0.385	0.055	0.005	10	10	10	10	-1.831	-0.905	2.150	3.555
MC21001 2D	n=6 (6 vs 6)	0.143	0.019	0.001	0.000	10	10	10	10	1.589	2.802	4.977	9.272
MC21001 org vs 2D	n=6 (6 vs 6)	0.003	0.034	0.986	0.856	10	10	10	10	-3.810	-2.462	0.018	0.186
MC21009 org	n=6 (6 vs 6)	0.639	0.500	0.013	0.033	10	10	10	10	0.485	0.712	3.178	2.564
MC21009 2D	n=3 (3 vs 3)	0.025	0.471	0.226	0.000	4	4	4	4	-2.855	0.762	1.328	7.568
MC21009 org vs 2D	n=3 (3 vs 6)	0.238	0.716	0.172	0.080	7	7	7	7	1.290	0.385	1.549	-2.108
シスプラチン (μM)		0.1	1	10	100	0.1	1	10	100	0.1	1	10	100
MC21001 org	n=6 (6 vs 6)	0.514	0.642	0.026	0.000	10	10	10	10	-0.674	0.479	2.580	7.707
MC21001 2D	n=6 (6 vs 6)	0.103	0.003	0.000	0.000	10	10	10	10	1.793	3.875	5.536	22.399
MC21001 org vs 2D	n=6 (6 vs 6)	0.057	0.044	0.745	0.270	10	10	10	10	-2.155	-2.300	-0.334	-1.167
MC21009 org	n=6 (6 vs 6)	0.841	0.655	0.241	0.000	10	10	10	10	0.207	0.462	1.254	7.131
MC21009 2D	n=3 (3 vs 3)	0.166	0.090	0.005	0.000	4	4	4	4	-1.546	1.963	4.042	16.597
MC21009 org vs 2D	n=3 (3 vs 6)	0.150	0.667	0.930	0.000	7	7	7	7	1.652	-0.450	-0.091	-7.875
ドキシソルビシン (nM)		0.1	1	10	100	0.1	1	10	100	0.1	1	10	100
MC21001 org	n=6 (6 vs 6)	0.673	0.828	0.846	0.029	10	10	10	10	-0.433	-0.223	-0.199	2.514
MC21001 2D	n=6 (6 vs 6)	0.024	0.251	0.001	0.000	10	10	10	10	2.668	1.219	4.996	7.604
MC21001 org vs 2D	n=6 (6 vs 6)	0.124	0.454	0.011	0.676	10	10	10	10	-1.678	-0.779	-3.090	-0.430
MC21009 org	n=6 (6 vs 6)	0.189	0.511	0.475	0.009	10	10	10	10	1.435	0.684	0.745	3.314
MC21009 2D	n=3 (3 vs 3)	0.001	0.001	0.000	0.002	4	4	4	4	5.104	5.269	6.741	4.733
MC21009 org vs 2D	n=3 (3 vs 6)	0.042	0.127	0.016	0.511	7	7	7	7	-2.576	-1.731	-3.163	0.692
ゲムシタビン (μM)		0.1	1	10	100	0.1	1	10	100	0.1	1	10	100
MC21001 org	n=6 (6 vs 6)	0.148	0.020	0.013	0.001	10	10	10	10	1.554	2.727	2.945	4.525
MC21001 2D	n=6 (6 vs 6)	0.024	0.251	0.001	0.000	10	10	10	10	2.668	1.219	4.996	7.604
MC21001 org vs 2D	n=6 (6 vs 6)	0.124	0.454	0.011	0.676	10	10	10	10	-1.678	-0.779	-3.090	-0.430
MC21009 org	n=6 (6 vs 6)	0.573	0.748	0.252	0.298	10	10	10	10	0.584	0.332	1.225	1.106
MC21009 2D	n=3 (3 vs 3)	0.009	0.014	0.000	0.000	4	4	4	4	-3.611	3.259	6.914	6.482
MC21009 org vs 2D	n=3 (3 vs 6)	0.005	0.062	0.011	0.005	7	7	7	7	4.022	-2.222	-3.414	-4.020

表 3-1 症例情報

検体名	年齢	犬種	性別	腫瘍を含む 肺葉部位	病理組織学的診断	特記事項
20001	15歳	ミニチュア・ダックスフンド	去勢オス	左肺後葉	肺腺癌	肺腫瘍オルガノイドを利用
21001	9歳	フレンチ・ブルドッグ	去勢オス	右肺前葉	肺原発性神経内分泌腫瘍	肺腫瘍および正常肺オルガノイドを利用
21003	12歳	トイ・プードル	去勢オス	左肺前葉	肺腺癌	正常肺オルガノイドを利用
21004	15歳	シー・ズー	去勢オス	左肺後葉	肺腺癌	肺腫瘍および正常肺オルガノイドを利用
21007	15歳	雑種	避妊メス	左肺後葉	肺腺癌	肺腫瘍および正常肺オルガノイドを利用
22001	9歳	チワワ	避妊メス	右肺前葉	肺腺癌	肺腫瘍オルガノイドを利用

表 3-2 保存用培養液

名称	入手会社	カタログ番号	保存時濃度	総量	混合後最終濃度
Advanced DMEM/F12 (1x)	Gibco	12634-010		500 ml	
HEPES	Dojindo	342-01375	1M	1 ml	2 mM
GlutaMAX-1 (100x)	Gibco	35050-061		5 ml	
Penicillin-Streptomycin Solution (100x)	WAKO	168-23191		5 ml	
Primocin	Nacalai tesque	14860	50 mg/ml	1 ml	100 µg/ml

表 3-3 犬の正常肺オルガノイドの培養液

名称	入手会社	カタログ番号	保存時濃度	総量	混合後最終濃度
Advanced DMEM/F12	Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA	12634-010		25 ml	
L-WNR conditioned medium as a source of 50% Wnt, Noggin and R-Spondin	Prepared in Lab from L-WRN cells (CRL-3276TM)			25 ml	
HEPES	Dojindo	342-01375	1M	0.5 ml	2 mM
GlutaMAX-1 (100x)	Gibco	35050-061		5 ml	
Nicotinamide	Sigma	N0630	1M	5 ml	10 mM
N-Acetyl-l-cysteine	LKT Laboratories	A0918	500 mM	1 ml	1 mM
A83-01	Adooq Bioscience	A12358	5 mM	5 µl	500 nM
Murine EGF	PeptoTech	315-09-1MG	500 µg/ml	5 µl	50 ng/ml
FGF7	PeptoTech	AF-100-19	10 µg/ml	25 µl	5 ng/ml
TGFα	PeptoTech	120 - 10C	20 µg/ml	50µl	20 ng/ml
Primocin	InvivoGen	ant-pm-2	50 mg/ml	100 µl	100 µg/ml
Penicillin-Streptomycin (100x)	WAKO	168-23191		10 ml	1%

表 3-4 定量的リアルタイム PCR に用いたプライマー情報

遺伝子名	プライマー種類	プライマー配列
GAPDH	Forward	5'-AACTCCCTCAAGATTGTCAGCAA-3'
	Reverse	5'-CATGGATGACTTTGGCTAGAGGA-3'
ELK1	Forward	5'-CAGCATTCACTTCTGGAGCA-3'
	Reverse	5'-CCACCACAGCTAGAGCACAA-3'
c-Myc	Forward	5'-CAGCAGCTCGAATTTCTTCC-3'
	Reverse	5'-CAGCAGCTCGAATTTCTTCC-3'
PLA2G4A	Forward	5'-CCCAGACCTCCGATTCAGTA-3'
	Reverse	5'-TGTACCATGTGGAGCCAGAA-3'
SIK1	Forward	5'-CGTTTGGTGTTTTGGCTTTT-3'
	Reverse	5'-CATCTGCTCAGTGCAAGGAA-3'

表 3-5 図 3-6 における統計学的パラメータ

薬剤および系統 n 数 (test vs control)	P-value (bilateral) vs. control (両側 p 値)					DF Total (自由度)					t-value vs. control (等分散の 2 標本を対象)				
	0.0001	0.001	0.01	0.1	1	0.0001	0.001	0.01	0.1	1	0.0001	0.001	0.01	0.1	1
トラメチニブ濃度 (μM)	0.0001	0.001	0.01	0.1	1	0.0001	0.001	0.01	0.1	1	0.0001	0.001	0.01	0.1	1
LC20001 n=3 (3 vs 3)	0.952	0.121	0.004	0.005	0.001	4	4	4	4	4	-0.063	1.964	5.808	5.575	9.495
LC21004 n=3 (3 vs 3)	0.243	0.034	0.018	0.018	0.017	4	4	4	4	4	1.367	3.177	3.859	3.895	3.964
LC21007 n=3 (3 vs 3)	0.058	<0.001	<0.001	<0.001	<0.001	4	4	4	4	4	2.626	34.082	39.494	42.029	42.343
LC22001 n=3 (3 vs 3)	0.157	0.001	<0.001	<0.001	<0.001	4	4	4	4	4	-1.740	9.365	13.137	12.455	17.963

表 3-6 図 3-7B における統計学的パラメータ

対象タンパク	n 数 (test vs control)	P-value (bilateral) vs. control (両側 p 値)	DF Total (自由度)	t-value vs. control (等分散の 2 標本を対象)
pERK	n=3 (3 vs 3)	0.0062	2	12.6039
ERK	n=3 (3 vs 3)	0.7842	2	-0.3126

表 3-7 図 3-8 における統計学的パラメータ

対象遺伝子	n 数 (test vs control)	P-value (bilateral) vs. control (両側 p 値)	DF Total (自由度)	t-value vs. control (等分散の 2 標本を対象)
ELK1	n=16 (16 vs 16) *	0.0602	30	1.9528
cMyc	n=16 (16 vs 16) *	<0.0001	30	15.6670
PLA2G4A	n=16 (16 vs 16) *	0.8993	30	-0.1276
SIK1	n=16 (16 vs 16) *	<0.0001	30	5.6945

*4 系統の肺腫瘍オルガノイドに対して GAPDH を含む各遺伝子を 2 サンプルずつ PCR にかける。得られた各 GAPDH の発現量に対する各遺伝子の発現量を算出した。その結果各系統のオルガノイドに対して 4 つずつの発現データが得られたため、表の n 数は 16 となっている。

表 3-8 図 3-10A, C における統計学的パラメータ

対象項目および n 数 (test vs control)		P-value (bilateral) vs. control (両側 p 値)	DF Total (自由度)	t-value vs. control (等分散の 2 標本を対象)
図 3-10A				
day1	n=5 (5 vs 5)	0.857	8	-0.1857
day8	n=5 (5 vs 5)	0.004	8	3.9160
day15	n=5 (5 vs 5)	0.001	8	5.2307
day23	n=5 (5 vs 5)	0.003	8	4.1913
図 3-10C				
tumor weight	n=5 (5 vs 5)	0.010	8	-3.3620

表 3-9 図 3-11B における統計学的パラメータ

対象項目および n 数 (test vs control)		P-value (bilateral) vs. control (両側 p 値)	DF Total (自由度)	t-value vs. control (等分散の 2 標本を対象)
図 3-4F				
Ki-67	n=5 (5 vs 5)	0.053	8	2.2734

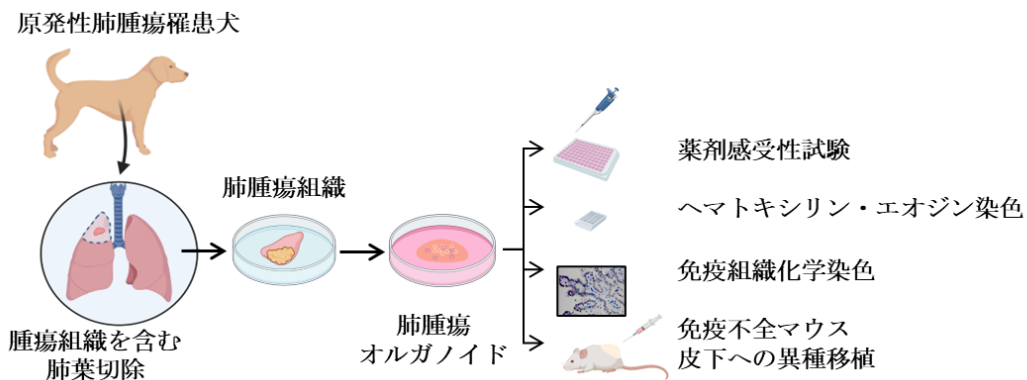


図 1-1 犬原発性肺腫瘍オルガノイド作製法ならびに実験概要図

原発性肺腫瘍被検犬の肺葉切除検体から採取した肺腫瘍組織を細切し、マトリゲルへ包埋することで三次元培養を行った。数継代培養後、薬剤感受性試験や組織学的評価、免疫不全マウス皮下移植をした。

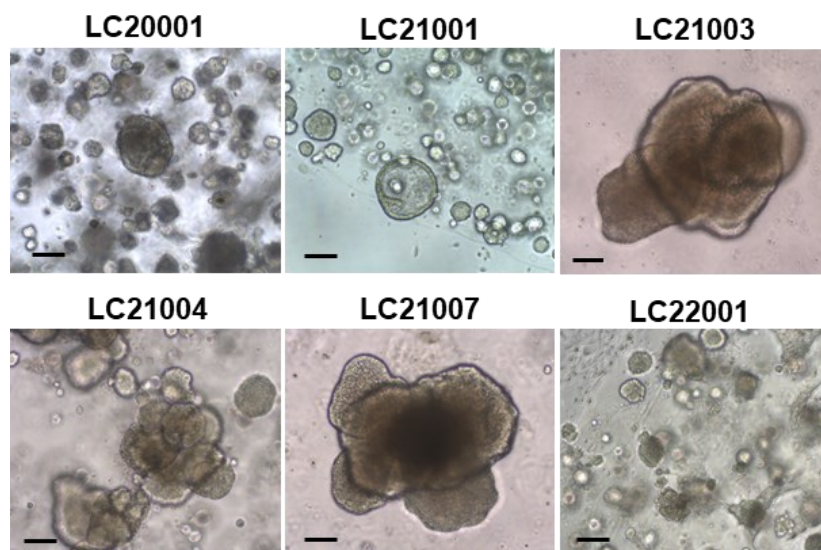


図 1-2 肺腫瘍オルガノイドの代表的な明視野顕微鏡写真

作製した肺腫瘍オルガノイドは培養開始から 7 日以内に球状あるいは突起状のオルガノイドが形成され、経時的に増大する様子が見られた (scale bar: 100 μm)。

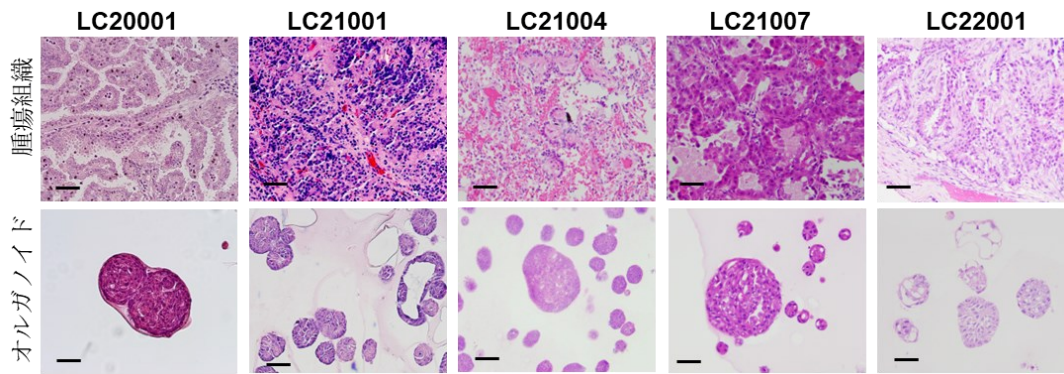


図 1-3 肺腫瘍オルガノイドの代表的なヘマトキシリン・エオジン（HE）染色写真

作製した肺腫瘍オルガノイドと元の腫瘍組織の組織切片を作製し、HE染色を実施した。特に腺癌と診断された検体（LC20001, LC21004, LC21007, LC22001）では腺癌に特徴的な腺腔様構造も認められた（scale bar: 50 μ m）。

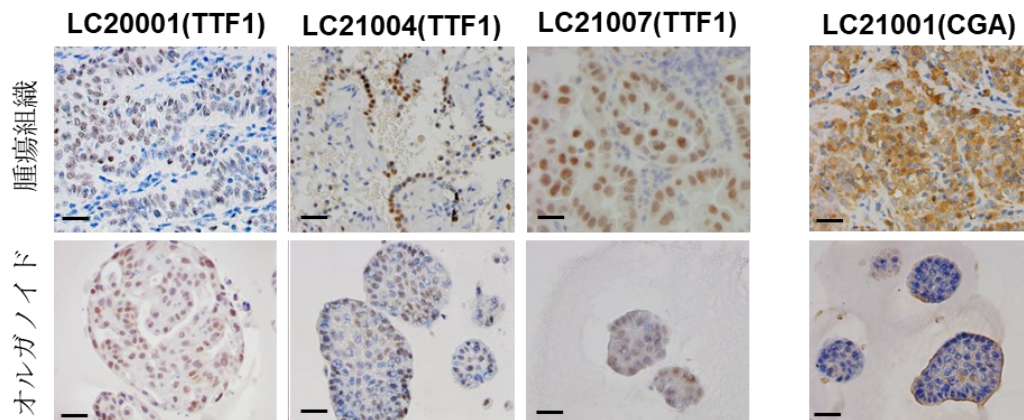
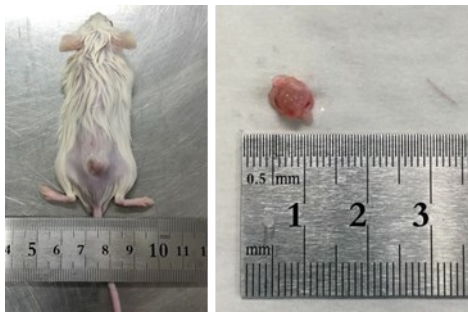


図 1-4 肺腫瘍オルガノイド検体の代表的な免疫組織化学染色写真

作製した肺腫瘍オルガノイドに対して元の腫瘍組織の腫瘍マーカー発現を確認するために、免疫組織化学染色を実施した。組織学的に腺癌と診断された症例由来のオルガノイド（LC20001, LC21004, LC21007）では腺癌マーカーの1つである TTF1 のタンパク発現が核内において認められた。また肺原発性神経内分泌腫瘍と診断された症例由来のオルガノイド（LC21001）では、内分泌腫瘍マーカーの1つである CGA のタンパク発現が細胞質内で確認された。これらは元の組織におけるそれぞれのタンパク発現の局在と類似していた（scale bar: 25 μ m）。

A.



B.

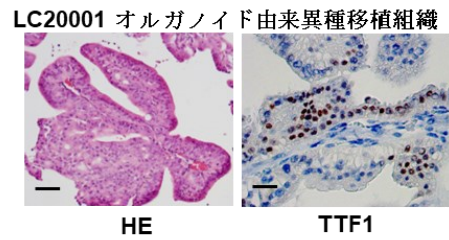


図 1-5 肺腫瘍オルガノイドの免疫不全マウス皮下への異種移植

1×10^6 個の肺腫瘍オルガノイド（検体 LC20001）をインスリン用注射針でオスの SCID マウス背部皮下に移植し、8 週間適切な環境下で飼育した後に直径 1 cm 大の腫瘍形成が確認された。A の左写真は背部腫瘍の外観を、右写真は摘出後の組織外観を示す。B は摘出した腫瘍組織切片のヘマトキシリン・エオジン（HE）染色（scale bar: 50 μm ）と免疫組織化学染色（scale bar: 25 μm ）における腺癌マーカーの 1 つである TTF1 の核内発現を確認した。

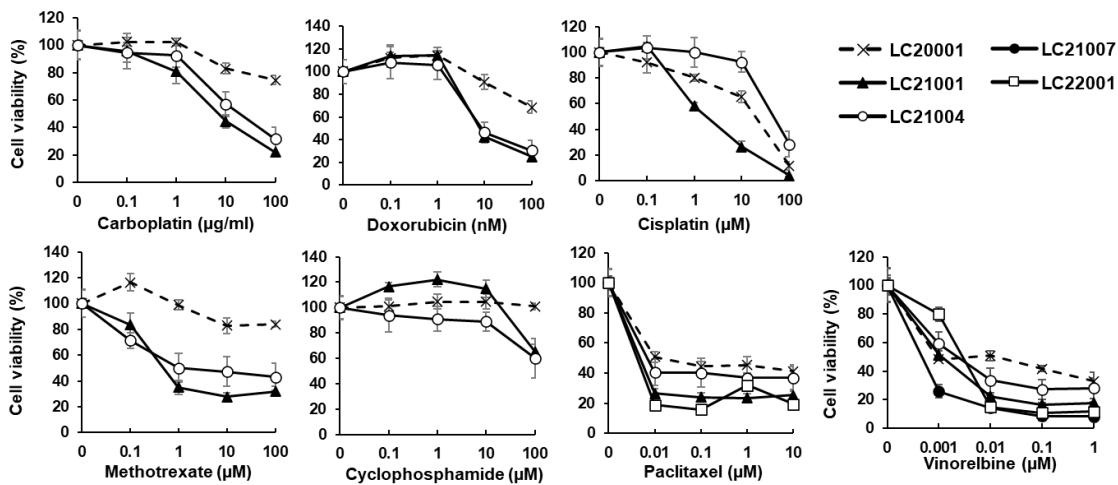


図 1-6 犬原発性肺腫瘍オルガノイドの各検体に対する薬剤感受性試験の実施

5 系統の肺腫瘍オルガノイド (LC20001, LC21001, LC21004, LC21007, LC22001) をそれぞれ 2000 個ずつ 96 ウェルプレートへ播種し、各薬剤 3~9 ウェルずつ 7 種類の薬剤を処置した。薬剤はそれぞれカルボプラチン (0.1, 1, 10, 100 µg/ml) シスプラチン (0.1, 1, 10, 100 µM), ビノレルビン (0.001, 0.01, 0.1, 1 µM), パクリタキセル (0.01, 0.1, 1, 10 µM), ドキソルビシン (0.1, 1, 10, 100 nM), メトトレキサート (0.1, 1, 10, 100 µM), シクロホスファミド (0.1, 1, 10, 100 µM), ラパチニブ (0.01, 0.1, 1, 10 µM) およびゲフィチニブ (0.03, 0.1, 0.3, 1 µM) を用い、コントロールには溶媒である DMSO (1mg/ml) を添加した。72 時間培養後、プレストブルーアッセイキットとマイクロプレートリーダーを用いて吸光度を計測し、各薬剤における細胞生存率の平均値をコントロールの平均値を 100%とした相対値 (%) で表した。グラフの縦軸は細胞生存率を、横軸は各薬剤の濃度を示し、結果は薬剤濃度における平均値±標準誤差で示した。各グラフに伴う統計学的パラメータに関しては表 1-4 に記載した。

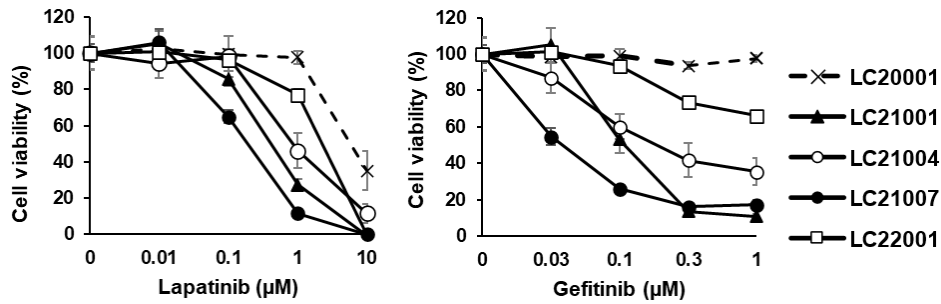


図 1-7 犬原発性肺腫瘍オルガノイドにおけるラパチニブおよびゲフィチニブの感受性試験

5 系統の肺腫瘍オルガノイド (LC20001, LC21001, LC21004, LC21007, LC22001) に対してラパチニブ (HER2 阻害薬) あるいはゲフィチニブ (EGFR 阻害薬) を処置し, 図 1-6 の薬剤感受性試験と同手法で細胞生存率を算出した。グラフの縦軸に細胞生存率を, 横軸に各薬剤の濃度を示し, 結果は薬剤濃度における平均値±標準誤差で示した。各グラフに伴う統計学的パラメータに関しては表 1-5 に記載した。

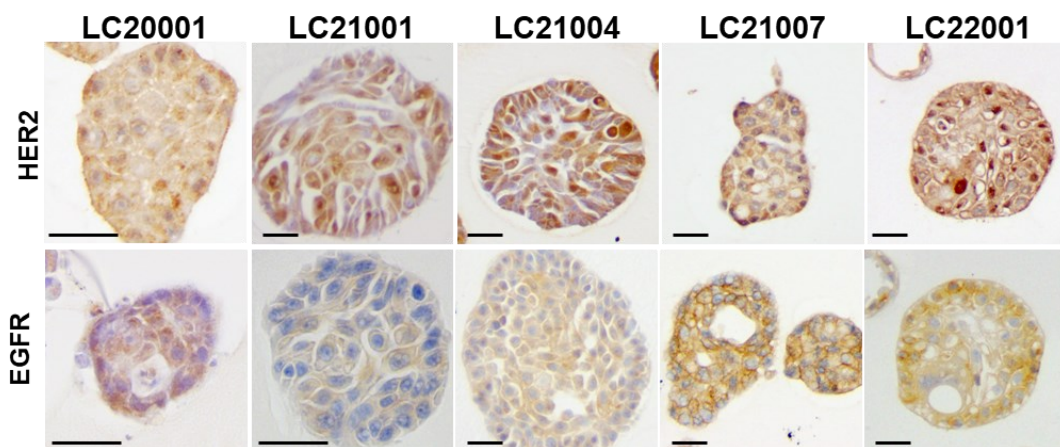


図 1-8 免疫化学染色を用いた肺腫瘍オルガノイドにおける HER2 および EGFR のタンパク発現の評価

5 系統の肺腫瘍オルガノイド (LC20001, LC21001, LC21004, LC21007, LC22001) を用いて免疫化学染色を実施し, 抗 HER2 抗体または抗 EGFR 抗体に対する陽性細胞を評価した。系統によって各抗体に対する染色性は異なり, 細胞膜上に強い染色性を示すものや全体的に染色性の薄いものが認められた (scale bar: 25 µm)。

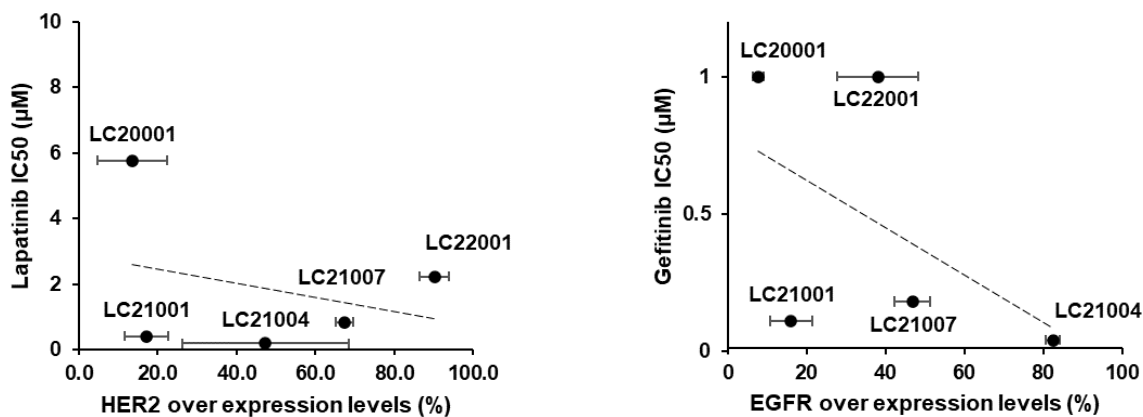
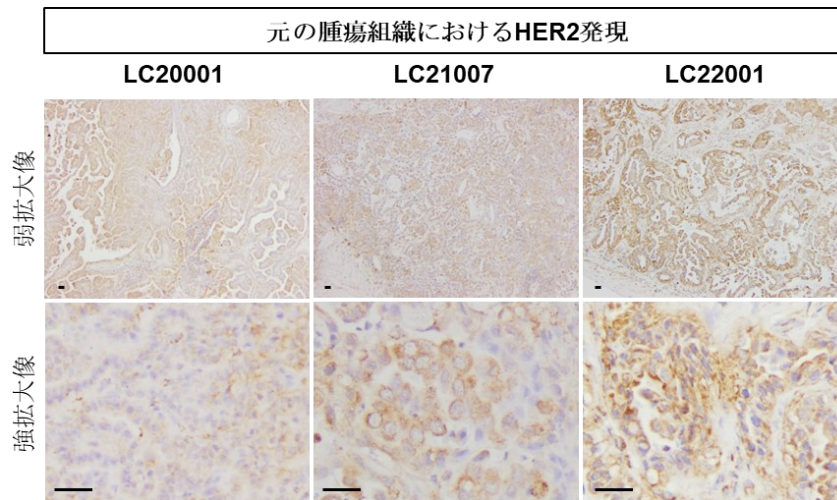


図 1-9 HER2 タンパク発現およびラパチニブに対する IC50 値あるいは EGFR タンパク発現およびゲフィチニブに対する IC50 値との相関図

図 1-8 で示した免疫組織化学染色における HER2 および EGFR のタンパク発現レベルを、the American Society of Clinical Oncology/College of American Pathologists で提案されている手法に基づいて 4 群 (Complete 群および Incomplete 群, Faint 群, None 群) に分類した。Complete 群のみを各タンパクを過剰発現した細胞とみなし、10 倍の対物レンズ 4 視野中に含まれる全体の細胞に対して、Complete 群の割合を比較・定量し、その平均値±標準誤差を横軸に示した。図 1-7 で示したラパチニブおよびゲフィチニブに対する各系統のオルガノイドの IC50 値を縦軸に取り、HER2 あるいは EGFR の過剰発現レベルとそれぞれの薬剤に対する感受性の相関を Pearson の積率相関係数を用いて評価した。HER2 とラパチニブにおける Pearson の積率相関係数は 0.31 であり、EGFR とゲフィチニブにおける Pearson の積率相関係数は 0.52 であった。各グラフに伴う統計学的パラメータに関しては表 1-6,7 に記載した。

A.



B.

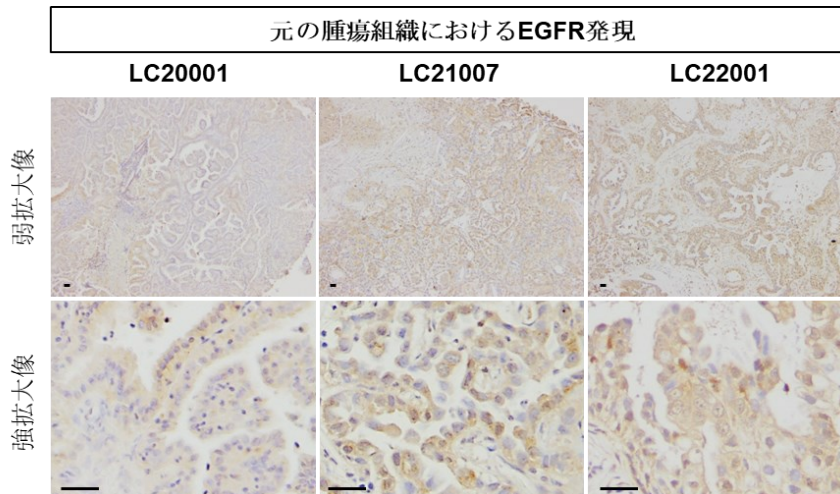


図 1-10 被検犬の元の腫瘍組織における HER2 および EGFR のタンパク発現の評価

被検犬の元の腫瘍組織における HER2 および EGFR のタンパク発現を評価するために免疫組織化学染色を実施した (scale bar: 25 μ m)。A.は抗 HER2 抗体に対する陽性細胞を、B.は抗 EGFR 抗体に対する陽性細胞を示している。また A.と B.はともに、上段に腫瘍全体の弱拡大像を、下段に強拡大像を示した。LC20001 では両タンパクの発現が低く、LC21007 は中程度に発現が高くなっていた。LC22001 では HER2 発現レベルが高く、EGFR の発現はやや低かった。

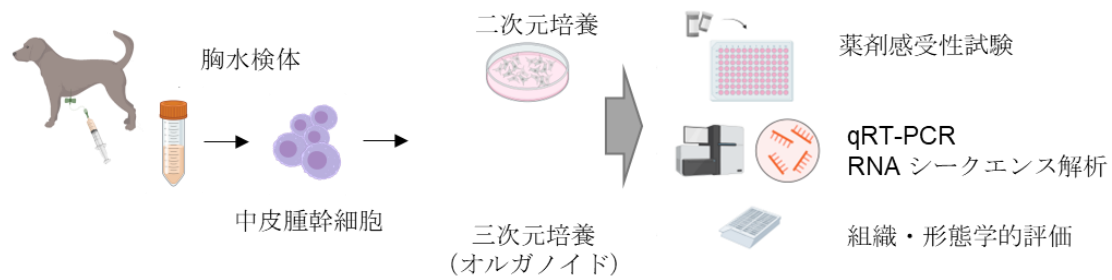


図 2-1 犬悪性中皮腫オルガノイドおよび二次元培養細胞の作製法ならびに比較解析の概要図

心膜中皮腫被検犬の胸水検体から採取した悪性中皮腫細胞はマトリゲル包埋あるいは6 cm ディッシュ上へ播種することで、それぞれオルガノイドあるいは二次元細胞として培養した。数継代培養後、各検体は薬剤感受性試験や遺伝子解析、組織学的評価を実施した。

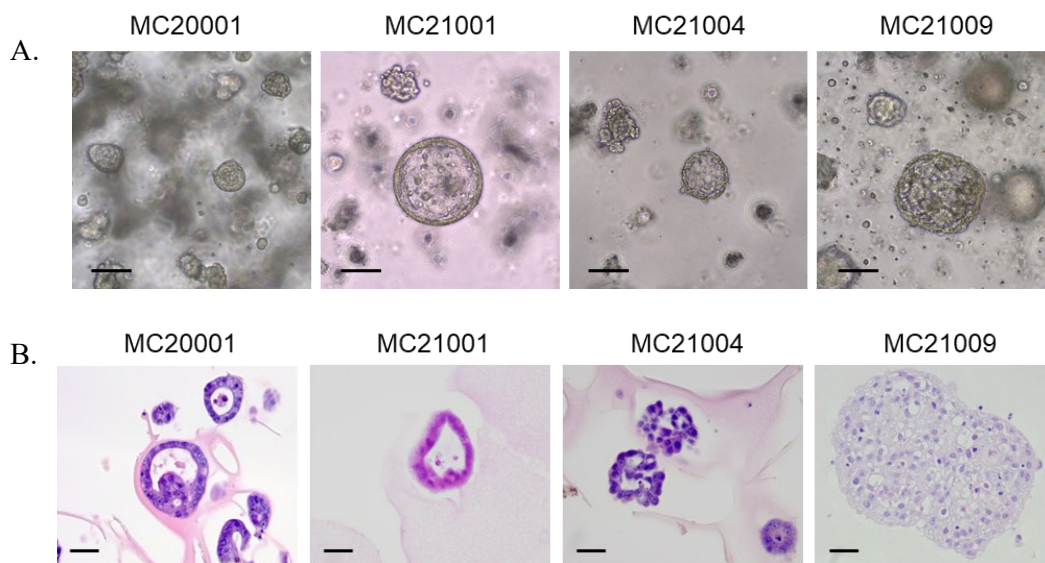


図 2-2 胸水検体由来の悪性中皮腫オルガノイドの代表的な明視野顕微鏡写真および HE 染色写真

- A. 胸水検体から培養した犬悪性中皮腫オルガノイドの代表的な明視野顕微鏡写真を示す。各検体は培養後7日以内に球状のオルガノイドを形成した (scale bar: 100 μ m)。
- B. 悪性中皮腫オルガノイドの組織切片を作製し、HE染色を実施した。胸水検体由来のオルガノイドは内腔状から充実性の形態を示していた (scale bar: 25 μ m)。

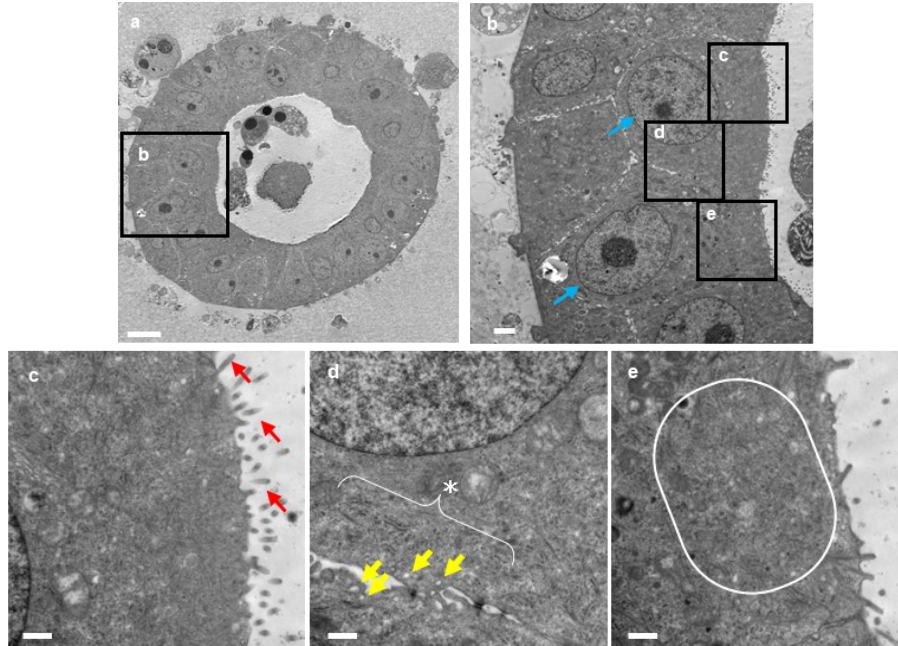


図 2-3 胸水検体由来の犬悪性中皮腫オルガノイドの電子顕微鏡写真

- a. 一つのオルガノイド全体像 (scale bar: 10 μm)。
- b. 写真 a における囲み b 部分の拡大像。青矢印は明瞭な核小体とユークロマチンを示す (scale bar: 2 μm)。
- c. 写真 b の囲み c 部分の拡大像。赤矢印は微絨毛の発達を示す (scale bar: 600 nm)。
- d. 写真 b の囲み d 部分の拡大像。黄色矢印は飲作用胞を, *はグリコーゲン顆粒を示す (scale bar: 600 nm)。
- e. 写真 b の囲み e 部分の拡大像。白い楕円部分はランダムに配置したマイクロフィラメントを示す (scale bar: 600 nm)。

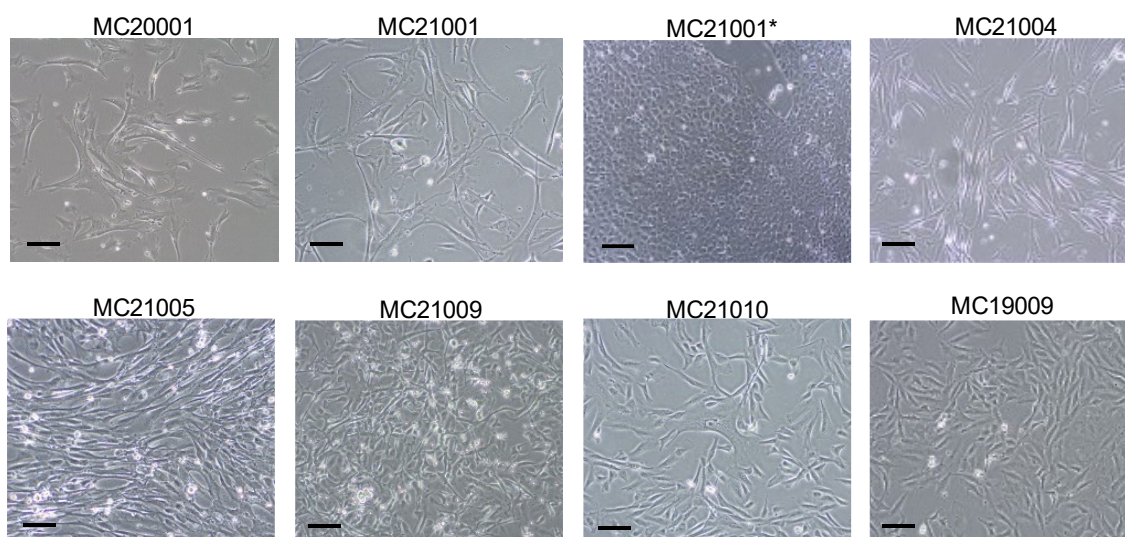


図 2-4 胸水検体由来の犬悪性中皮腫二次元細胞の代表的な明視野顕微鏡写真

胸水検体から培養された二次元細胞は、MC21001を除きすべて間葉系様の形態を示していた (scale bar: 100 μm)。一方でMC21001は培養初期では他と同様に間葉系様の形態を示していたものの、8継代目以降から形態に変化が認められ、敷石状の上皮様の形態が観察された (MC21001*)。

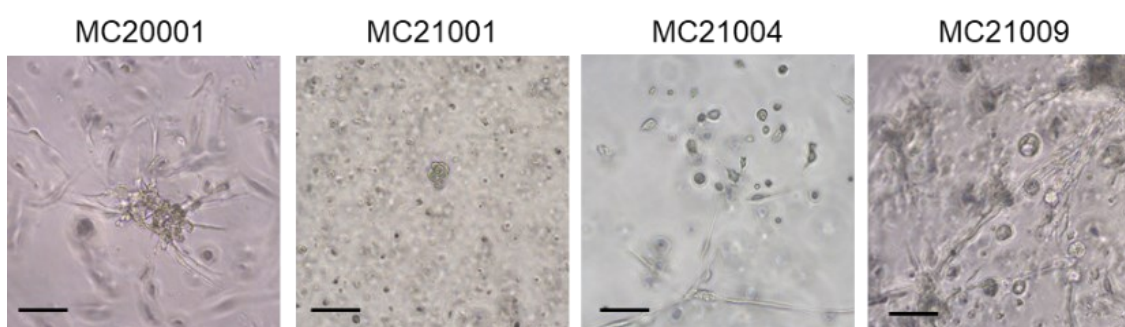


図 2-5 二次元培養細胞からの中皮腫三次元培養の実施とその明視野顕微鏡写真

図 2-4 で示した二次元細胞を数継代し、ディッシュ上に接着した細胞を EDTA と TrypLE を用いて剥離し、マトリゲル包埋を行うことで三次元培養を試みた。図 2-2 A. で示した胸水由来のオルガノイドとは異なり、球状の独立した細胞集塊などは認められたが、オルガノイドの形成は認められなかった (scale bar: 100 μm)。

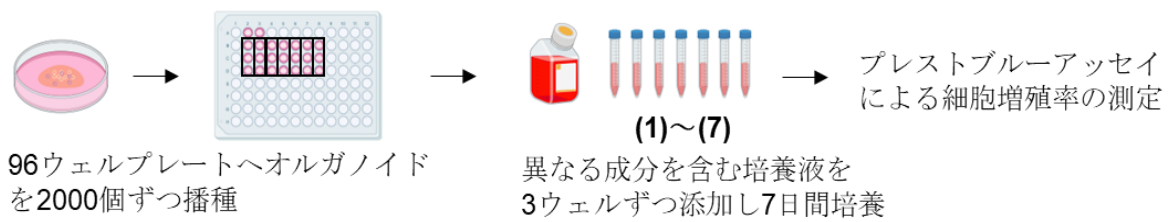


図 2-6 犬の悪性中皮腫オルガノイドの最適な培養成分の検討実験概要図

MC20001 オルガノイドを EDTA と TrypLE を用いて遊離させ、70 μ m のセルストレーナーを用いて小さなオルガノイドを選別した。96 ウェルプレートへ 2000 個ずつオルガノイドを播種し、成分の異なる 7 種類の培養液で 7 日間培養し、プレストブルーアッセイを用いて細胞増殖率を比較した。培養液の内容は(1)コントロール培養液: Ad.DMEM に 1%GibcoGlutaMax と 100 μ g/ml Primocin を添加, (2) WNR 培養液: コントロール培養液に対して WNR 調整培地 (W:Wnt3a, N:Noggin, R:R-Spondin) を 1:1 で混合, (3) から (7) の培養液はコントロール培養液にそれぞれ (3) 50ng/ml の EGF, (4) 5 ng/ml の FGF2, (5) 5 ng/ml の FGF7, (6) 25 ng/ml の FGF10, (7) 100 ng/ml の IGF を含んだ培養液である。

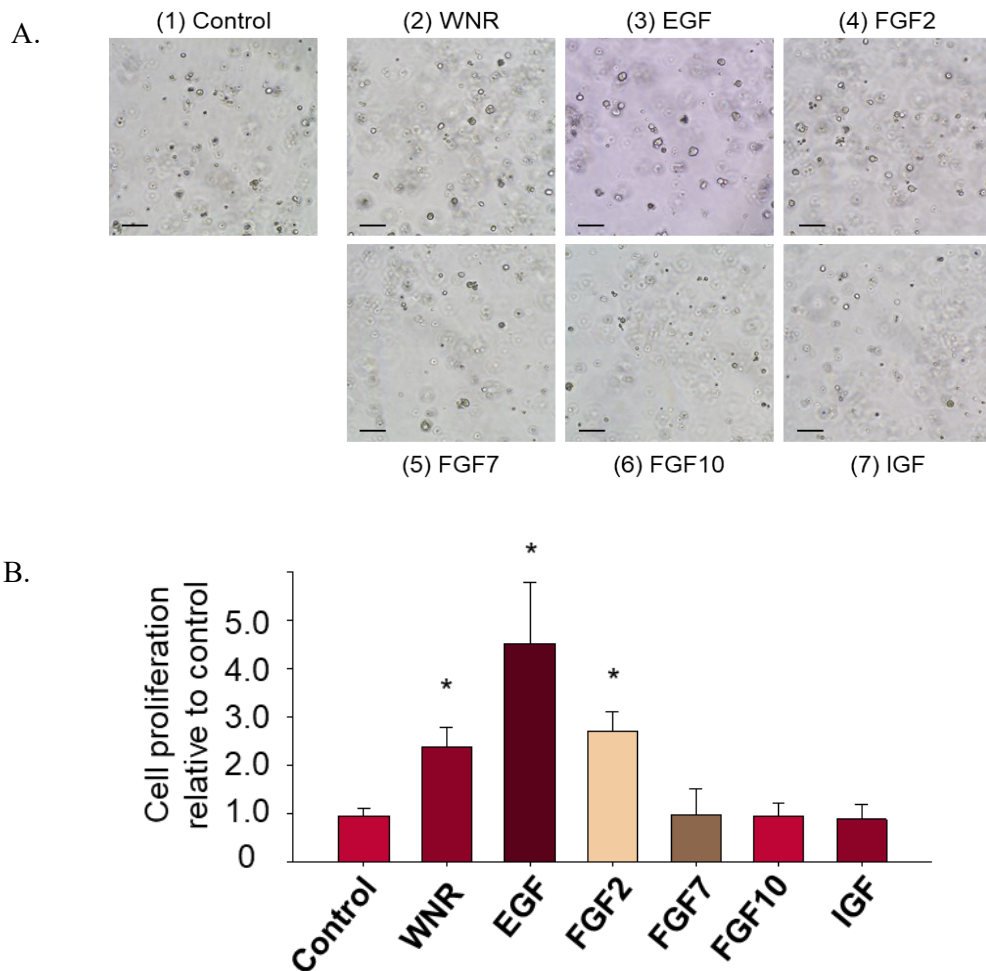
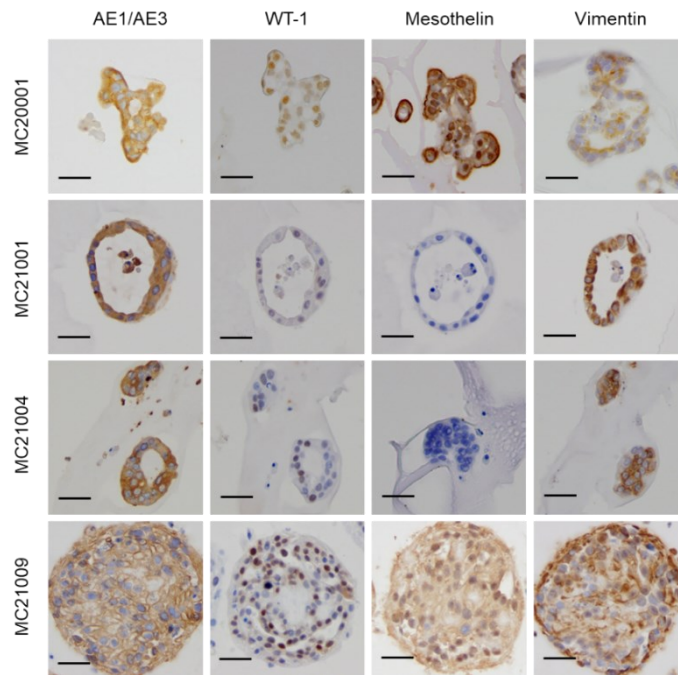


図 2-7 MC20001 オルガノイドを異なる培養液で 7 日間培養後の明視野顕微鏡写真および細胞増殖率の比較

- A. (1) ~ (7) の写真はそれぞれ図 2-2 で示した内容の培養液で 7 日間培養した後の明視野顕微鏡像を示している。小さな丸がセルストレーナーで選別した MC20001 の小さなオルガノイドを表している (scale bar: 100 μm)。
- B. プレストブルーアッセイキットを用いて培養 7 日目の細胞増殖率を算出した。コントロール培養液における細胞増殖率を 1 として縦軸に各培養液における細胞増殖率の相対値を、横軸にそれぞれの培養液の内容を示した。コントロールと比較して両側 P 値<0.05 の場合を有意差があるとして「*」で示した。

A.



B.

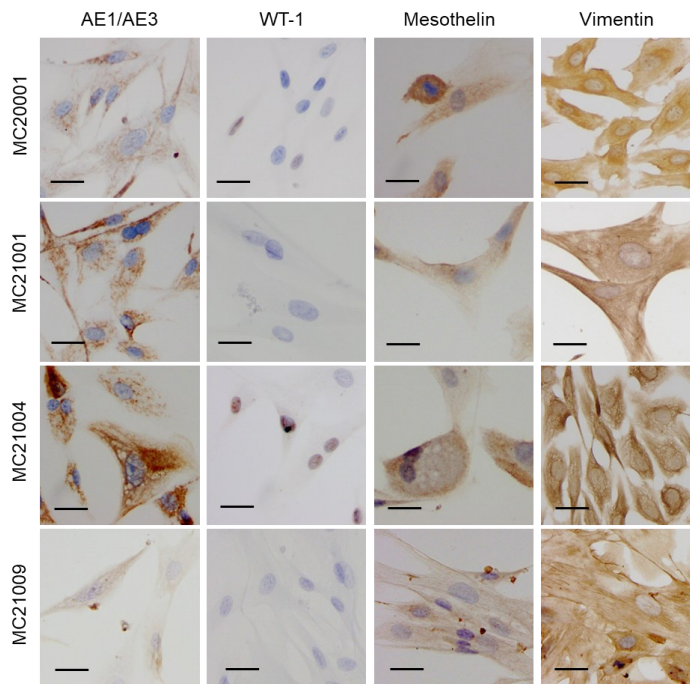


図 2-8 犬悪性中皮腫オルガノイドおよび二次元細胞における免疫化学染色

4 系統 (MC20001, MC21001, MC21004, MC21009) のオルガノイド (A.) および二次元細胞 (B.) における免疫組織化学染色結果の代表写真を示した (scale bar: 50 μ m)。上皮細胞マーカーとして抗 AE1/AE3 抗体を, 間葉細胞マーカーとして抗 Vimentin 抗体を, 中皮腫マーカーとして抗 WT-1 抗体および抗 Mesothelin 抗体を用いた。

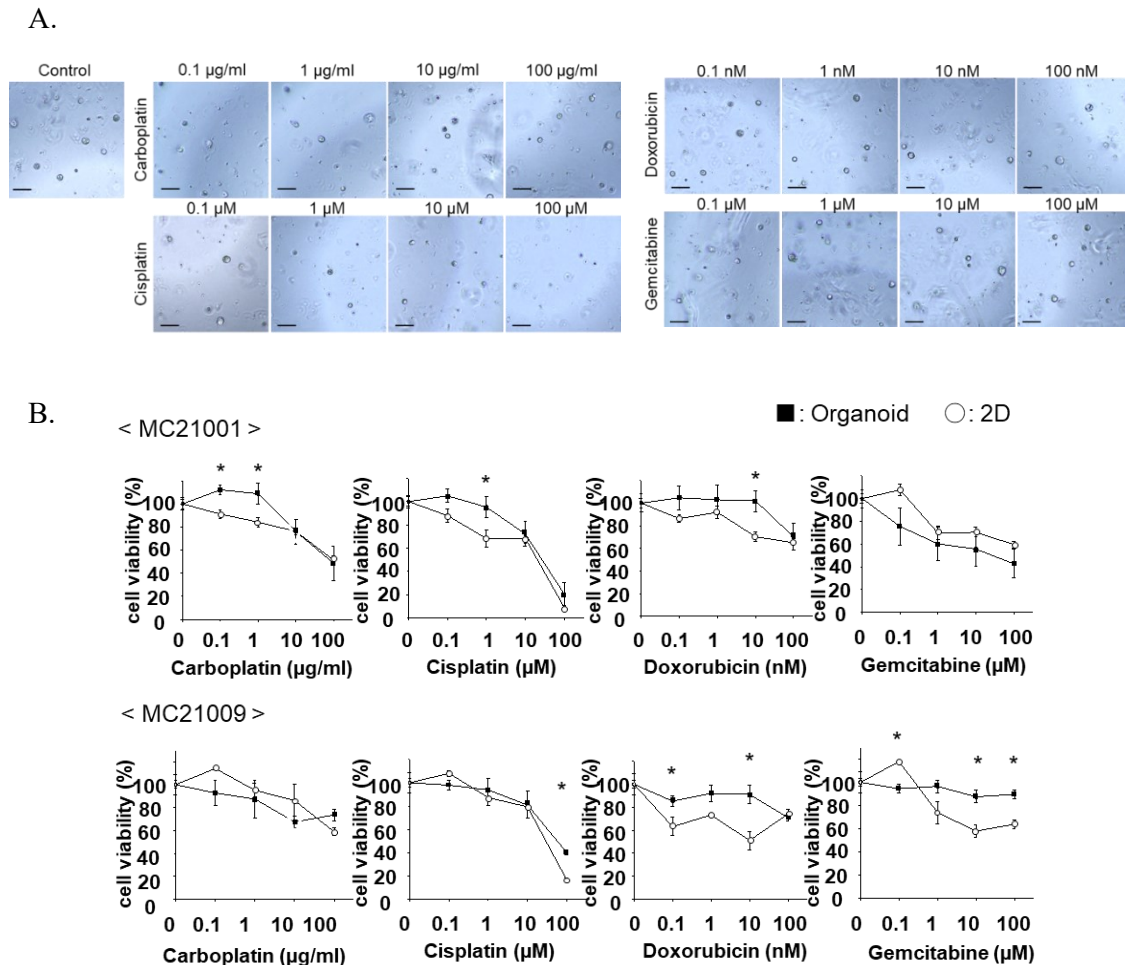
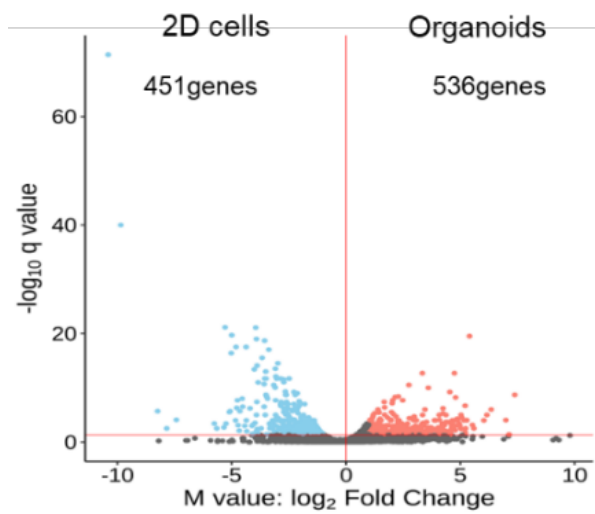


図 2-9 犬悪性中皮腫オルガノイドおよび二次元細胞に対する薬剤感受性試験の比較

MC21001 および MC21009 の 2 系統を用いて、それぞれ 2000 個ずつオルガノイドあるいは二次元細胞を 96 ウェルプレートへ播種した。4 種類の薬剤 (カルボプラチン, シスプラチン, ドキソルビシンおよびゲムシタビン) を 3 ウェルずつ処置し, 72 時間培養後, プレストブルーアッセイキットを用いて吸光度を計測し, 各薬剤における細胞生存率を比較した。A.には MC21009 オルガノイドに対する各薬剤処置下の代表的な明視野顕微鏡写真を示した (scale bar: 100 μ m)。B.にはそれぞれの系統における各薬剤に対する細胞生存率のグラフを示した。コントロールにおける平均値を 100%とした相対値 (%) を縦軸に, 各薬剤の濃度を横軸に表している。結果は 3 ウェルの平均値 \pm 標準誤差で表し, 同濃度におけるオルガノイドに対する二次元細胞を比較した両側 P 値<0.05 の場合に有意差があるとして「*」で示した。各グラフに伴う統計学的パラメータに関しては表 2-7 に記載した。

A.



B.

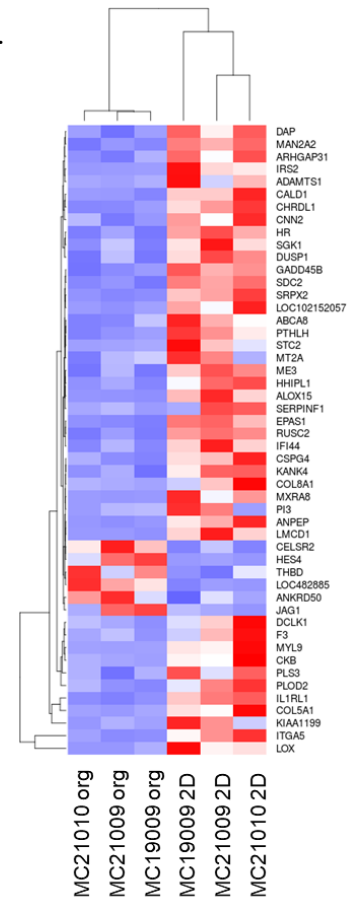


図 2-10 悪性中皮腫オルガノイドおよび二次元細胞における遺伝子発現プロファイルの比較

3 系統のオルガノイドおよび二次元細胞から RNA を抽出し、RNA シークエンス解析を実施した。A.には RNA シークエンス解析による発現率の異なる RNA を Volcano プロットで表した。青いプロットは二次元細胞において有意に発現が亢進していた遺伝子群を、赤いプロットはオルガノイドにおいて有意に発現が亢進していた遺伝子群を示している。B.には中でも有意に発現が亢進していた 987 遺伝子のうち、上位 50 遺伝子のヒートマップで表した。発現が高い場合を赤色に、低い場合を青色に示している。org はオルガノイドを、2D は二次元細胞を指す。

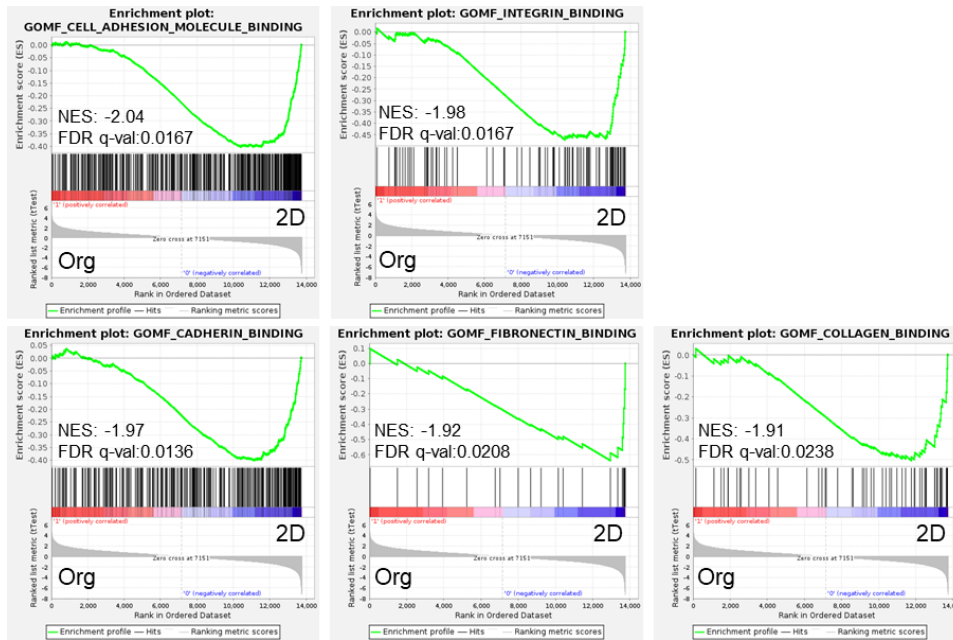


図 2-11 RNA シークエンス解析に基づいたオルガノイドと二次元細胞間での GSEA 解析

RNA シークエンス解析から得られた結果をもとに GSEA 解析を実施したところ、細胞接着に関連した遺伝子セットに有意差が認められた。NES は補正されたエンリッチメントスコアを指す。

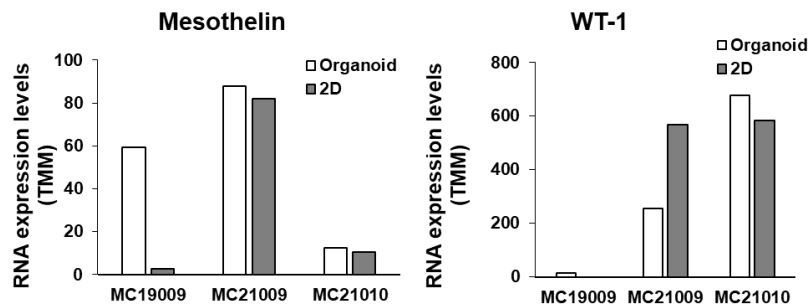


図 2-12 WT-1 および Mesothelin の mRNA 発現率の比較

中皮腫マーカーとして知られている WT-1 と Mesothelin の mRNA 発現率について、RNA シークエンス解析結果から得られたデータをもとに比較した。縦軸には Trimmed mean of M values (TMM) 値を横軸には各系統のオルガノイドおよび二次元細胞を表している。

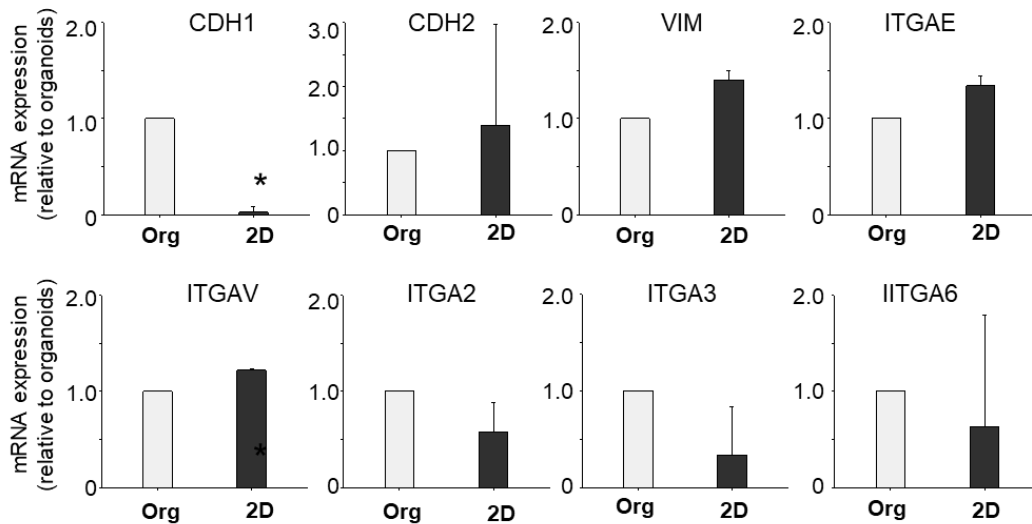


図 2-13 悪性中皮腫オルガノイドおよび二次元細胞における細胞接着因子の mRNA 発現レベルの比較

オルガノイドと二次元細胞から RNA を抽出し、細胞接着に関連する因子 (CDH1: E-Cadherin, CDH2: N-Cadherin, VIM: Vimentin, ITGAE, ITGAV, ITGA2, ITGA3, ITGA6) の mRNA 発現レベルを定量的リアルタイム PCR により比較した。各遺伝子発現率は検体ごとの GAPDH 値との相対値で表した。3 系統の検体を各 4 回ずつ PCR に供し、その平均値と標準誤差を算出した。オルガノイドにおける平均発現率を 1 として二次元細胞における発現率の相対値をグラフに表し、オルガノイドに対する P 値 < 0.05 の場合に有意差があるとして「*」で示した。

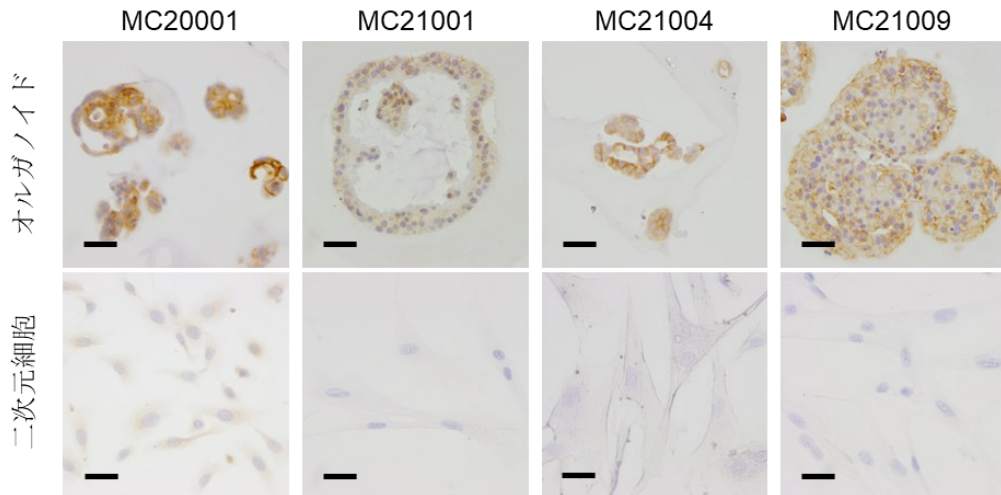


図 2-14 オルガノイドと二次元細胞における E-Cadherin のタンパク発現の比較

4 系統 (MC20001, MC21001, MC21004, MC21009) のオルガノイドと二次元細胞を用いて免疫化学染色を行い、抗 E-Cadherin 抗体に対する陽性細胞率を比較した。オルガノイドでは全体的に細胞膜上に顕著な染色性を示したが、二次元細胞ではほとんど検出されなかった (scale bar: 50 μm)。

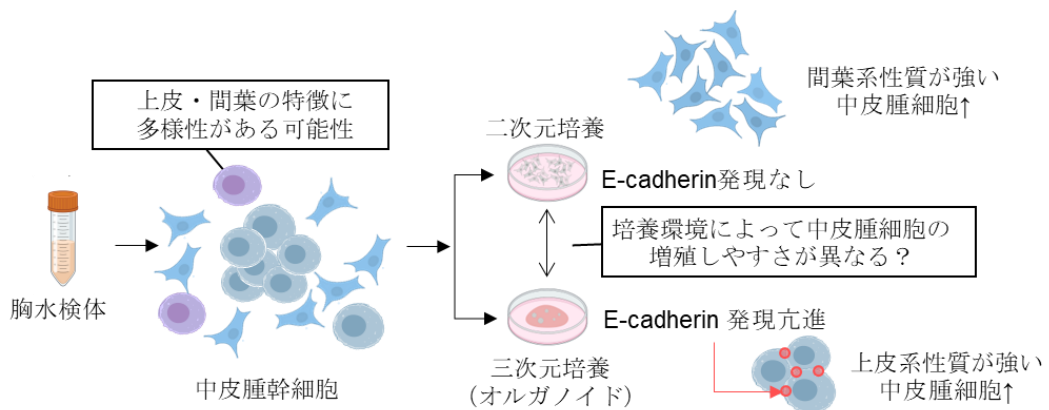


図 2-15 本研究結果の総括的概要図。

胸水中の悪性中皮腫細胞には上皮・間葉の異なる特性を有する細胞が混在し、二次元培養を行うことで E-Cadherin 発現の抑制を伴う間葉系細胞の特性が優位となり、一方で三次元培養を行うことで E-Cadherin 発現の亢進を伴う上皮系細胞の特性が優位となる可能性が示唆された。

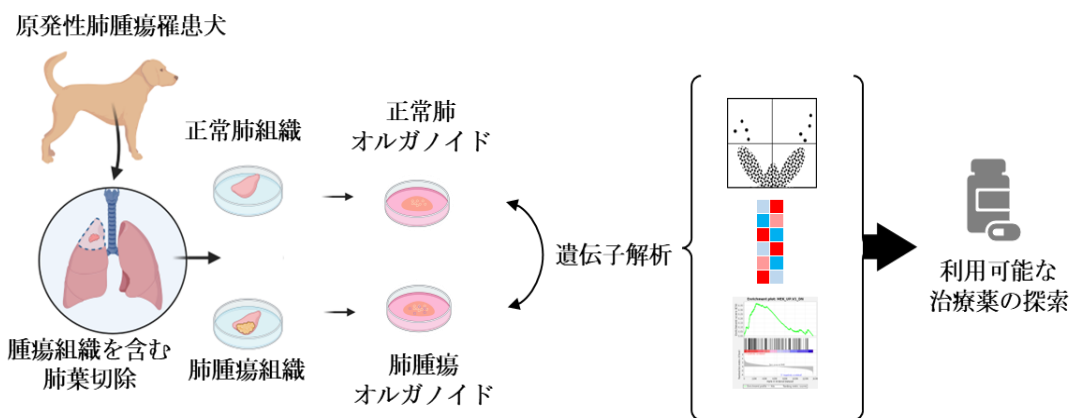


図 3-1 第 3 章の実験概要図

原発性肺腫瘍被検犬の肺葉切除検体から採取した肺腫瘍組織と近接する正常部組織をそれぞれ細切し、マトリゲルへ包埋することで三次元培養を行った。数継代培養後、肺腫瘍オルガノイドと正常肺オルガノイドに対して RNA シークエンス解析を実施し、遺伝子発現プロファイルの比較解析を実施した。得られたデータから肺腫瘍に特異的な分子的特徴を利用して、新たに応用可能な治療薬の探索を実施した。

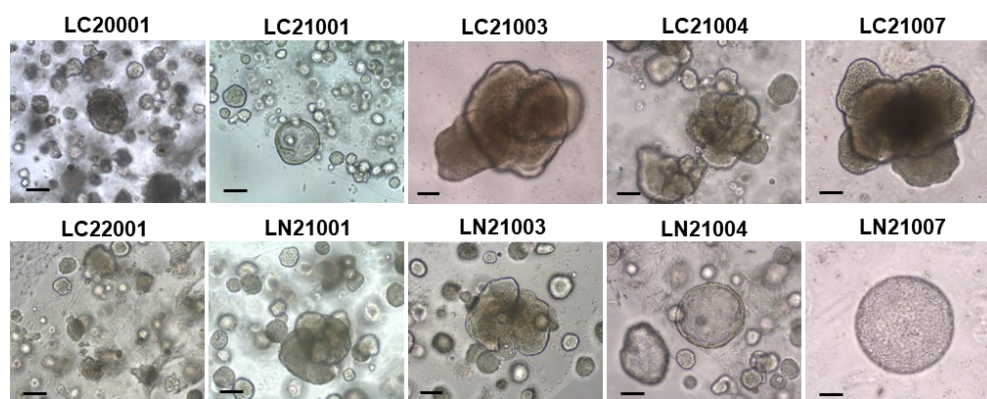


図 3-2 各肺腫瘍オルガノイドおよび正常肺オルガノイドの代表的な明視野顕微鏡写真

肺腫瘍オルガノイドと同様に近接した正常肺組織から正常肺オルガノイドを培養した。LC は肺腫瘍オルガノイドを LN は正常肺オルガノイドを指す。肺腫瘍オルガノイドと比較すると正常肺オルガノイドはより球状の構造を示している様子が認められた (scale bar: 100 μm)。

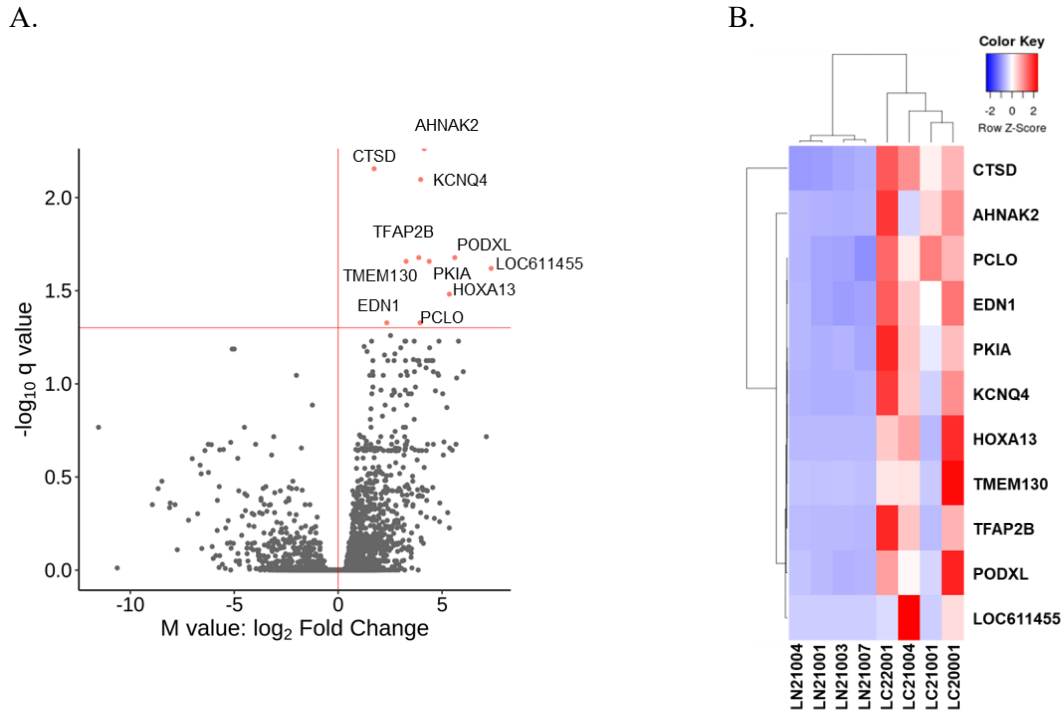


図 3-3 肺腫瘍オルガノイドおよび正常肺オルガノイドにおける遺伝子プロファイルの比較解析

4 系統の肺腫瘍オルガノイド (LC20001, LC21001, LC21004, LC22001) および正常肺オルガノイド (LN21001, LN210003, LN21004, LN21007) から RNA を抽出し, RNA シークエンス解析を実施した。A.には RNA シークエンス解析による発現率の異なる RNA を Volcano プロットで表した。赤いプロットは肺腫瘍オルガノイドにおいて有意に発現が亢進していた 11 遺伝子を示している。なお cNLO は肺腫瘍オルガノイドを cPLCO は肺腫瘍オルガノイドを指す。B.には肺腫瘍オルガノイドにおいて有意に発現が亢進していた 11 遺伝子について, その発現率をヒートマップで示した。発現が高い場合を赤色に, 低い場合を青色で示している。

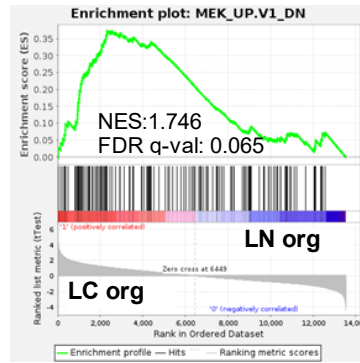


図 3-4 RNA シークエンス解析に基づいた肺腫瘍オルガノイドと正常肺オルガノイド間での GSEA 解析

RNA シークエンス解析から得られたデータをもとに GSEA 解析を行ったところ、特に肺腫瘍オルガノイドにおいて MEK 経路下流の遺伝子発現が濃縮されている結果が得られた。NES は補正されたエンリッチメントスコアを指す。また LC org は肺腫瘍オルガノイドを LN org は正常肺オルガノイドを指す。

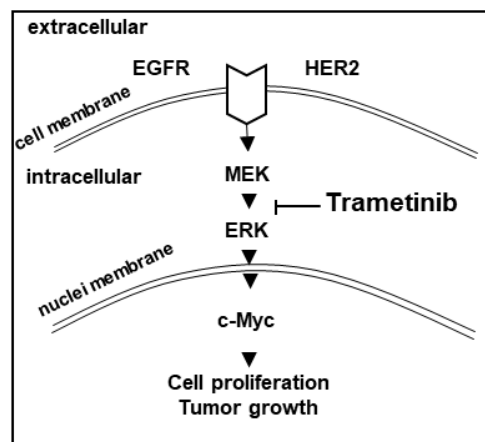


図 3-5 MEK シグナル経路の概略図およびトラメチニブの作用場所

EGFR や HER2 などの細胞増殖経路の下流に位置する MEK シグナル経路の概略図を示した。膜タンパク質である EGFR や HER2 などの刺激を受け、MEK 経路が活性化するとその下流の ERK を活性化し、さらに核内における細胞増殖シグナル分子である *c-Myc* 等を刺激することで細胞増殖や腫瘍増殖が促進される。トラメチニブは MEK による ERK の活性化を阻害する働きを持つ。

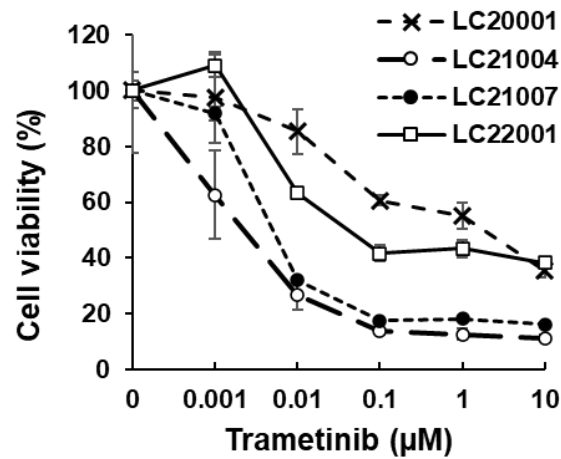


図 3-6 *in vitro* におけるトラメチニブの肺腫瘍オルガノイドに対する影響

4 系統の肺腫瘍オルガノイド (LC20001, LC21004, LC21007, LC22001) をそれぞれ 2000 個ずつ 96 ウェルプレートへ播種し、各濃度のトラメチニブ (0.001, 0.01, 0.1, 1, 10 μM) を 3 ウェルずつ処置し、72 時間後の細胞生存率の推移を示した。グラフの縦軸には DMSO (1mg/ml) を処置した際の平均生存率をコントロールとして各濃度の細胞生存率の相対値 (%) を表し、横軸にはトラメチニブの濃度を示した。結果は平均値±標準誤差で示している。各グラフに伴う統計学的パラメータに関しては表 3-5 に記載した。

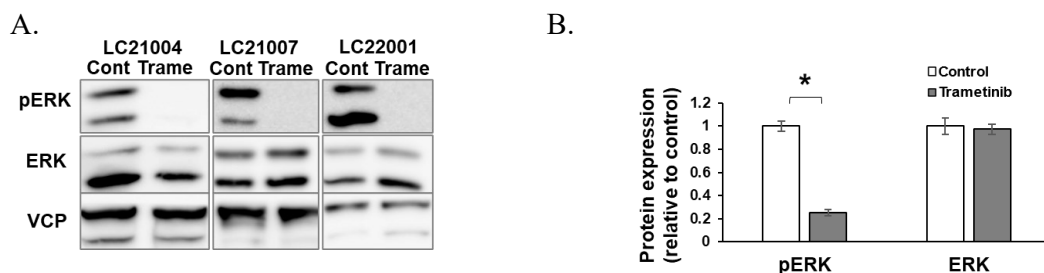


図 3-7 ترامチニブ処置による肺腫瘍オルガノイドの ERK タンパク発現の変化

3 系統の肺腫瘍オルガノイド (LC21004, LC21007, LC22001) に対して図 3-6 の細胞生存率の評価と同様に細胞を播種し, それぞれ 1 μ M の ترامチニブを 3 時間処置した後にオルガノイドを回収し, タンパクを抽出した。ウェスタンブロッティングによってトータル ERK (ERK) およびリン酸化 ERK (pERK) のタンパク発現量の変化を調べた。VCP はコントロールタンパクとして同時に確認した。Cont は溶媒のみを処置したコントロール群を, Trame は ترامチニブを処置した群を示している。

A. ウェスタンブロッティングの結果を示した。

B. A.の結果を ImageJ software を用いて定量化した。各検体の VCP タンパク発現量に対する pERK あるいは ERK 発現を相対値として算出し, 3 系統の肺腫瘍オルガノイドにおける平均値を数値化した。さらに両タンパクにおけるコントロール群の平均値を 1 として, ترامチニブ処置群の相対値を縦軸に取り, 棒グラフに表した。結果は平均値 \pm 標準誤差で示した。コントロール群に対する両側 p 値 <0.05 の場合に有意差があるとみなし, 「*」で示した。各グラフに伴う統計学的パラメータに関しては表 3-7 に記載した。

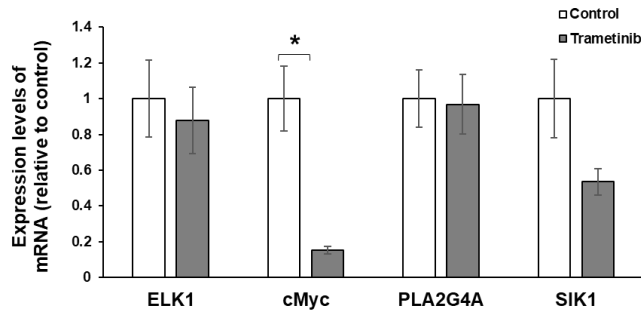


図 3-8 トラメチニブ処置による肺腫瘍オルガノイドの ERK 下流因子の mRNA 発現の変化

図 3-7 と同様に 3 系統の肺腫瘍オルガノイド (LC21004, LC21007, LC22001) に対してそれぞれ 1 μ M のトラメチニブを 3 時間した後にオルガノイドを回収した。それぞれのオルガノイドから RNA を抽出し、定量的リアルタイム PCR 法を用いて MEK-ERK シグナルの下流因子の mRNA 発現レベルの変化を調べた。下流因子として ETS transcription factor ETS Like-1 protein (*ELK1*) および *c-Myc*, phospholipase A2 group 4 A (*PLA2G4A*), Salt-Inducible Kinase 1 (*SIK1*) を選択した (表 3-1)。各系統の mRNA 発現のコントロールとして GAPDH を用い、各遺伝子は系統ごとに 2 サンプルずつ測定された。mRNA は GAPDH に対する相対値を取り、2 対 2 で各遺伝子 4 つずつのデータを得た。さらにコントロール群における mRNA 発現量の平均値を 1 とした相対値をトラメチニブ群の値としてグラフにし、それぞれ平均値 \pm 標準誤差で表した。コントロールに対する両側 p 値 < 0.05 の場合に有意差があるとみなし、「*」で示した。各グラフに伴う統計学的パラメータに関しては表 3-5 に記載した。

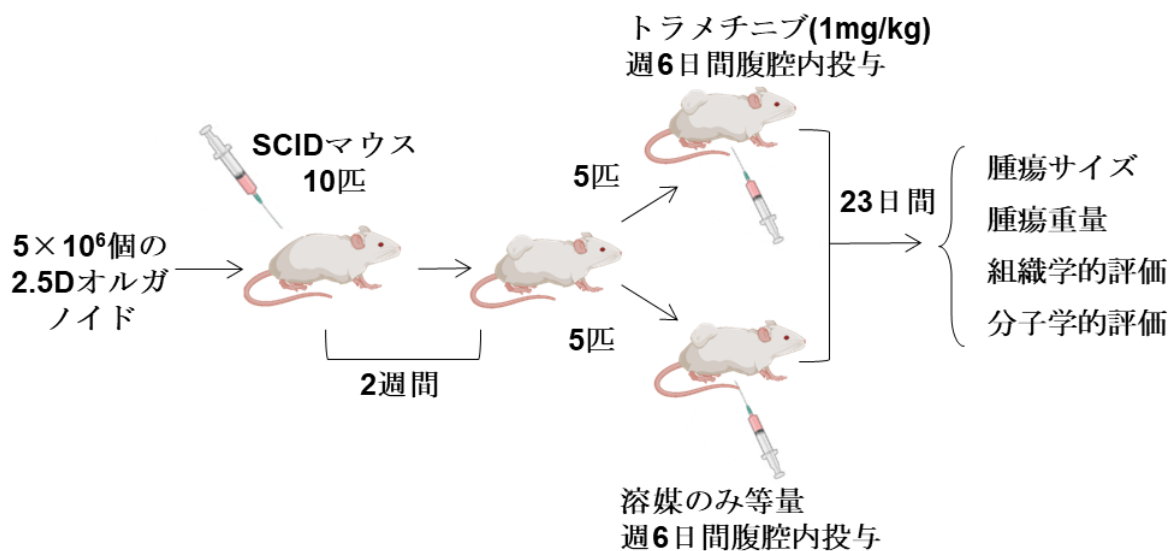


図 3-9 肺腫瘍オルガノイドの免疫不全マウスへの移植およびトラメチニブ処置の概要図

LC22001 の肺腫瘍オルガノイドを一度平面ディッシュ上へ播種し、2.5 次元培養として拡大培養を行った後、10 匹のオスの SCID マウスの背部皮下に 5×10^6 個ずつ移植した。適切環境下で 2 週間飼育し、移植組織が目視可能なサイズへと増大したことを確認後、5 匹ずつ 2 群に分けた。トラメチニブ 1 mg/kg を週 6 日投与するトラメチニブ投与群と等量の溶媒を週 6 日投与するコントロール群として、23 日間の腹腔内投与試験を実施し、経過を観察した。7 日毎に腫瘍サイズを計測し、23 日目に腫瘍組織を摘出した。腫瘍重量やサイズ、組織学的変化や分子学的変化について比較解析を行った。

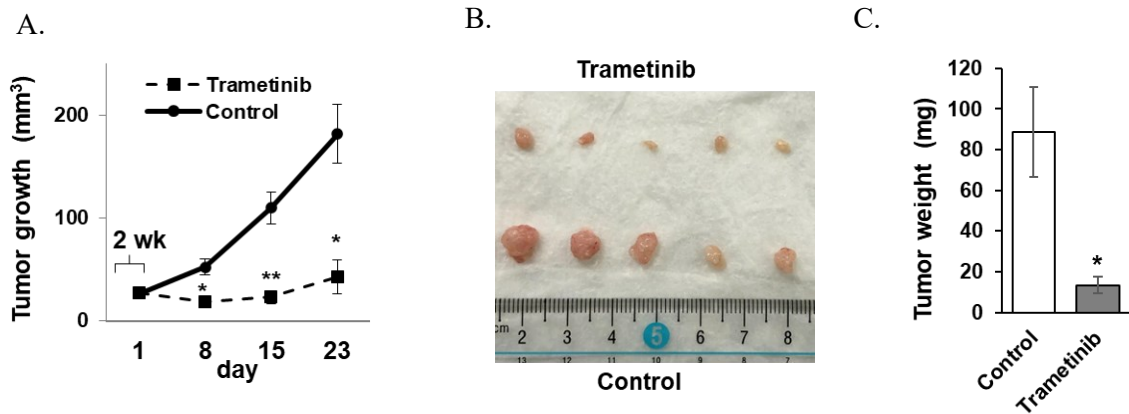
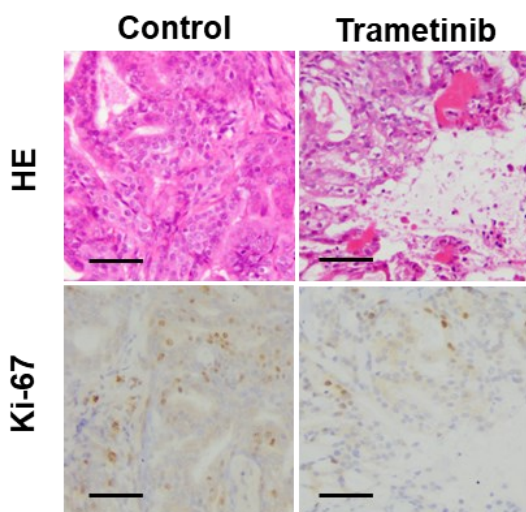


図 3-10 トラメチニブ処置による免疫不全マウス背部皮下の肺腫瘍オルガノイド移植組織への影響（腫瘍増殖・サイズ・重量）

- A. トラメチニブ投与群とコントロール群における移植組織サイズの推移。結果は各群における平均値±標準誤差で表し、コントロール群に対する両側 P 値<0.05 の場合に有意差があるとして「*」で示し、さらに $p < 0.025$ の場合を「**」で示した。
- B. 23 日目に摘出した移植組織の外観写真。上段にはトラメチニブ投与群を、下段にはコントロール群を写している。
- C. B.に示した移植組織の重量を測定し、各群の平均重量±標準誤差をグラフに表した。コントロール群に対する両側 P 値<0.05 の場合に有意差があるとして「*」で示した。
- A, C に伴う統計学的パラメータに関しては表 3-8 に記載した。

A.



B.

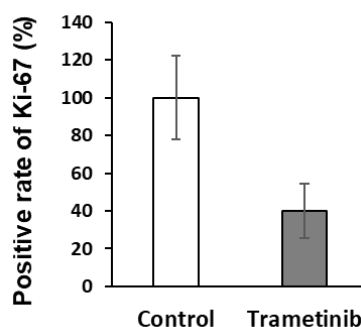


図 3-11 トラメチニブ処置による免疫不全マウス背部皮下の肺腫瘍オルガノイド移植組織への影響（組織的变化）

- A. 図 3-10 の 23 日目に摘出した両群の移植組織に対して、組織切片を作製し、HE 染色の実施および免疫組織化学染色による Ki-67 陽性細胞を確認した。写真はその代表例である (scale bar: 50 μ m)。
- B. A.の免疫組織化学染色によって確認した Ki-67 陽性細胞率を定量化するために ImageJ software を用いて組織片全体の腫瘍細胞当たりに対する抗 Ki-67 抗体陽性細胞の割合を計数した。さらにコントロール群における平均値を 100%としてトラメチニブ投与群の相対値を算出し、平均値 \pm 標準誤差としてグラフに表した。コントロール群に対する P 値に有意差は得られなかったものの、トラメチニブ投与群では Ki-67 陽性細胞率が低下している傾向が見られた。グラフに伴う統計学的パラメータに関しては表 3-9 に記載した。