

明 細 書

発明の名称：がん組織またはがん組織に類似した組織の培養方法

技術分野

[0001] 本出願は、がん組織またはがん組織に類似した組織の培養方法、当該培養方法によって得ることができる細胞塊や、それらの利用に関する。

背景技術

[0002] 全世界において、がんを死因とする死者の数は増加を続けている。たとえば、日本においても、がんは、日本人の最大の死因となった。がんを早期に発見するためのスクリーニングや、がんのリスク要因となるウイルス感染を防ぐためのワクチンの普及により、一部のがんについては、治療成績の改善や予防効果がみられるようになっている。更に、抗がん剤、外科的な手術、あるいは放射線や陽子線の照射によるがんの治療においても、次々に新たな技術の応用が試みられている。これらの種々のがん治療技術の中で、抗がん剤の利用は、現在においても、主要な選択肢の一つである。抗がん剤によるがんの治療（化学療法）において、がんの抗がん剤耐性の獲得は、治療を妨げる大きな原因の一つで、そのメカニズムの解明が望まれている。

[0003] たとえば、大腸がんの治療においては、新規薬剤や外科切除方法の改良により治療効率が向上している。他の臓器と同様に、切除が困難ながんであっても、予め薬物療法によって腫瘍を縮小させて手術の対象とする、いわゆるneoadjuvant therapy もしくはconversion therapyが広く行われるようになった。治療技術の進展によって、それまで外科切除対象ではなかったがんが治療される例も増えてきた。しかし、治療の奏功にもかかわらず再発する症例はまだまだ少なくない。そして、再発原因の一つが、がんの抗がん剤耐性の獲得と考えられている。耐性化の理由については、抗がん剤治療によって耐性を獲得した細胞群が誘導され、それらが生き残ると想定されている。しかし、耐性を獲得する細胞の由来については、がん幹細胞（Cancer Stem Cell；CSC）や、上皮間葉移行（Epithelial mesenchymal transition；EMT）等

のいくつかの異なる説が唱えられ、現在も大きな議論が続いている。また、実際の臨床の場面で、耐性化の実体をとらえた研究報告はない。抗がん剤に対するがん細胞の耐性獲得を制御するためには、そのメカニズムを知ることが重要である。

[0004] 本発明者らは、先に大腸がんのCSCマーカーであるLGR5 (Leucine-rich repeat-containing G-protein coupled receptor 5)に対する特異的抗体を取得し、臨床組織において高感度にCSCが検出できることを示し、更にCSC 細胞株を樹立した（非特許文献1、非特許文献2）。

また、種々の成長因子を組み合わせて、CSCを培養する試みも知られている（特許文献1）。更に、やはり成長因子を含む細胞外マトリクスの中で、上皮性幹細胞を培養する方法等も提案されている（特許文献2）。しかし、これらの公知のCSCやその培養技術はCSCを立体培養することで留まっており、がんの抗がん剤耐性獲得メカニズムの解明を行ったものではなかった。

先行技術文献

特許文献

[0005] 特許文献1：W02012/168930

特許文献2：US2012/0196312

非特許文献

[0006] 非特許文献1：Kobayashi, S., et al. Stem cells 30, 2631-2644 (2012).

非特許文献2：Yamazaki, M., et al. Acta histochemica et cytochemica 48, 159-164 (2015)

発明の概要

発明が解決しようとする課題

[0007] 本開示は、抗がん剤耐性を獲得したがん組織のモデルの構築を可能とする技術の提供を課題の一つとする。あるいは本開示は、そのモデルを利用して、がん組織の抗がん剤耐性獲得過程の解明や、更には抗がん剤耐性がん組織における標的分子をターゲットとする新たながんの治療技術、またはがんの

抗がん剤耐性を克服するがんの治療技術を見出すための方法の提供を課題の一つとする。

課題を解決するための手段

[0008] 本発明者らは、抗がん剤により処理されたがん組織またはがん組織に類似した組織を立体培養した培養物から小細胞塊 (small cluster) が形成されていることを見出し、その性質を明らかにした。新たに見出した小細胞塊は、化学療法が極めて著効した例から摘出されたがん組織内で見られる、患者の生体内における抗がん剤処置時のがん細胞の生存様式と類似していた。更に、培養物から見出された小細胞塊中の細胞は、CSC表現型およびmRNA発現量において、患者の生体内における抗がん剤処置時の生存がん細胞と類似していることを見出した。このように、患者のがん組織中の抗がん剤処置時の生存がん細胞の特徴を備えた、治療抵抗性の細胞塊を抗がん剤耐性がん組織のモデルとして人工的に再構成することに成功して本開示を完成した。

これまでに、がん組織からオルガノイドを樹立した報告は有る (J. N. Buzzelli et al., Stem Cell Res (2018) 27: 109-120)、C. S. Verissimo et al., Elife (2016) 5. Pii: e18489)。しかし、抗がん剤処理後の立体培養を試みた例は知られていない。すなわち本開示は、以下の各培養方法を提供する：

[0009] (A 1) 少なくとも一種類の抗がん剤より処理されたがん組織またはがん組織に類似した組織を立体培養する工程を含む、培養方法。

(A 2) 前記がん組織またはがん組織に類似した組織に対する抗がん剤による処理は、前記がん組織またはがん組織に類似した組織を前記少なくとも一種類の抗がん剤の存在下でインキュベートすることで行う、(A 1)に記載の方法。

(A 3) 前記抗がん剤は、がん細胞の増殖を阻害する薬剤から選ばれる一種類または複数種類の抗がん剤である、(A 1) または (A 2) のいずれか一つに記載の方法。

(A 4) 前記抗がん剤は化学療法剤である、(A 1) から (A 3) のいずれか一つに記載の方法。

(A 5) 前記抗がん剤は7-Ethyl-10-hydroxycamptothecinであり、前記抗がん剤処理は濃度300nMの抗がん剤存在下における72hインキュベーションである、(A 1) から (A 4) のいずれか一つに記載の方法。

(A 6) 前記立体培養工程は、前記少なくとも一種類の抗がん剤により処理されたがん組織またはがん組織に類似した組織を第一の細胞外マトリックスに接着させ、第一の培地を添加して培養する、(A 1) から (A 5) のいずれか一つに記載の方法。

(A 7) 前記第一の培地は、細胞や組織を立体培養可能な培地である、(A 6) に記載の方法。

(A 8) 前記第一の培地は、細胞分化を誘導することが可能な培地である、(A 6) または (A 7) に記載の方法。

(A 9) 前記第一の細胞外マトリックスは糖タンパク質、または多糖、またはエラスチンを含む、(A 6) から (A 8) のいずれか一つに記載の方法。

(A 10) 前記第一の細胞外マトリックスはMatrigel (登録商標) である、(A 6) から (A 9) のいずれか一つに記載の方法。

(A 11) 前記がん組織に類似した組織は、がん幹細胞由来組織である、(A 1) から (A 10) のいずれか一つに記載の方法。

(A 12) 前記がん組織に類似した組織はオルガノイドである、(A 1) から (A 11) のいずれか一つに記載の方法。

(A 13) 前記がん組織に類似した組織はスフェロイドである、(A 1) から (A 11) のいずれか一つに記載の方法。

(A 14) 前記がん組織に類似した組織は、一つまたは複数のがん幹細胞を培養するプレ培養工程によって形成される、(A 1) から (A 13) のいずれか一つに記載の方法。

(A 15) 前記プレ培養工程は、一つまたは複数のがん幹細胞を第二の細胞外マトリックスに接着させ、第二の培地を添加して行われる、(A 14) に記載の方法。

(A 16) 前記第二の培地は細胞や組織を立体培養可能な培地である、(A

15)に記載の方法。

(A17)前記第二の培地は、前記第一の培地と同構成の培地である、(A15)または(A16)に記載の方法。

(A18)前記第二の細胞外マトリックスは糖タンパク質、または多糖、またはエラスチンを含む、(A15)から(A17)のいずれか一つに記載の方法。

(A19)前記第二の細胞外マトリックスはMatrigel(登録商標)である、(A15)から(A18)のいずれか一つに記載の方法。

(A20)前記プレ培養工程は、一つまたは複数のがん幹細胞を細胞培養培地に浮遊させて培養する工程である、(A14)に記載の方法。

(A21)前記がん幹細胞は上皮がん由来の腫瘍組織由来の細胞である、(A11)から(A20)のいずれか一つに記載の方法。

(A22)前記がん組織は、生体から分離されたがん組織または組織破片である、(A1)から(A10)のいずれかに記載の方法。

[0010] また本開示は、以下の細胞塊の形成方法にも関する。

(B1)少なくとも一種類の抗がん剤より処理されたがん組織またはがん組織に類似した組織を立体培養する立体培養工程を含む、細胞塊の形成方法。

(B2)前記がん組織またはがん組織に類似した組織に対する抗がん剤による処理は、前記がん組織またはがん組織に類似した組織を前記少なくとも一種類の抗がん剤の存在下でインキュベートすることで行う、(B1)に記載の方法。

(B3)前記抗がん剤は、がん細胞の増殖を阻害する薬剤から選ばれる一種類または複数種類の抗がん剤である、(B1)または(B2)のいずれか一つに記載の方法。

(B4)前記抗がん剤は化学療法剤である、(B1)から(B3)のいずれか一つに記載の方法。

(B5)前記抗がん剤は7-Ethyl-10-hydroxycamptothecinであり、前記抗がん剤処理は濃度300nMの抗がん剤存在下における72hインキュベーションであ

る、(B 1) から (B 4) のいずれか一つに記載の方法。

(B 6) 前記立体培養工程は、前記少なくとも一種類の抗がん剤により処理されたがん組織またはがん組織に類似した組織を第一の細胞外マトリックスに接着させ、第一の培地を添加して培養する、(B 1) から (B 5) のいずれか一つに記載の方法。

(B 7) 前記第一の培地は細胞や組織を立体培養可能な培地である、(B 6) に記載の方法。

(B 8) 前記第一の培地は、細胞分化を誘導することが可能な培地である、(B 6) または (B 7) に記載の方法。

(B 9) 前記第一の細胞外マトリックスは糖タンパク質、または多糖、またはエラスチンを含む、(B 6) から (B 8) のいずれか一つに記載の方法。

(B 10) 前記第一の細胞外マトリックスはMatrigel (登録商標) である、(B 6) から (B 9) のいずれか一つに記載の方法。

(B 11) 前記がん組織に類似した組織は、がん幹細胞由来組織である、(B 1) から (B 10) のいずれか一つに記載の方法。

(B 12) 前記がん組織に類似した組織はオルガノイドである、(B 1) から (B 11) のいずれか一つに記載の方法。

(B 13) 前記がん組織に類似した組織はスフェロイドである、(B 1) から (B 11) のいずれか一つに記載の方法。

(B 14) 前記がん組織に類似した組織は、一つまたは複数のがん幹細胞を培養するプレ培養工程によって形成される、(B 1) から (B 13) のいずれか一つに記載の方法。

(B 15) 前記プレ培養工程は、一つまたは複数のがん幹細胞を第二の細胞外マトリックスに接着させ、第二の培地を添加して行われる、(B 14) に記載の方法。

(B 16) 前記第二の培地は細胞や組織を立体培養可能な培地である、(B 15) に記載の方法。

(B 17) 前記第二の培地は、前記第一の培地と同構成の培地である、(B

15) または (B 16) に記載の方法。

(B 18) 前記第二の細胞外マトリックスは糖タンパク質、または多糖、またはエラスチンを含む、(B 15) から (B 17) のいずれか一つに記載の方法。

(B 19) 前記第二の細胞外マトリックスはMatrigel (登録商標) である、(B 15) から (B 18) のいずれか一つに記載の方法。

(B 20) 前記プレ培養工程は、一つまたは複数のがん幹細胞を細胞培養培地に浮遊させて培養する工程である、(B 14) に記載の方法。

(B 21) 前記がん幹細胞は上皮がん由来の腫瘍組織由来の細胞である、(B 11) から (B 20) のいずれか一つに記載の方法。

(B 22) 前記がん組織は、生体から分離されたがん組織または組織破片である、(B 1) から (B 10) のいずれかに記載の方法。

[0011] あるいは本開示は、以下の細胞塊にも関する。

(C 1) (B 1) から (B 22) のいずれか一つに記載の方法により形成された細胞塊。

(C 2) 前記細胞塊は、前記がん組織またはがん組織に類似した組織が処理された抗がん剤の中の少なくとも一種類の抗がん剤に対して耐性を有する、(C 1) に記載の細胞塊。

(C 3) 前記細胞塊に含まれる細胞の少なくとも一つは、LGR5を発現している、(C 1) から (C 2) のいずれかに記載の細胞塊。

(C 4) 前記細胞塊に含まれる細胞の少なくとも一つは、CD44 (CD44v9を含む)、CD34、CD133、Sca-1、CD24から選ばれる少なくとも一つのタンパクを発現している、(C 1) から (C 3) のいずれか一つに記載の細胞塊。

(C 5) 前記細胞塊に含まれる細胞は、GPX2を発現している、(C 1) から (C 4) のいずれか一つに記載の細胞塊。

(C 6) 前記細胞塊に含まれる細胞の少なくとも一つは、vimentin、ZEB1から選ばれる少なくとも一つのタンパクを発現していない、(C 1) から (C 5) のいずれか一つに記載の細胞塊。

(C 7) 前記細胞塊に含まれる細胞の少なくとも一つは、E-cadherinを低発現している、(C 1) から (C 6) のいずれか一つに記載の細胞塊。

(C 8) 前記細胞塊はgland構造を有するまたは有さない、(C 1) から (C 7) のいずれか一つに記載の細胞塊。

[0012] また本開示は、以下の細胞塊の用途を提供する。

(D 1) (C 1) から (C 10) のいずれか一つに記載の細胞塊に含まれる細胞の遺伝子発現量、タンパク質発現量、タンパク質修飾、タンパク質局在、エピゲノム、またはメタボロミクス状態を分析する方法。

(D 2) がんに対する治療活性を有する薬剤を同定する方法であって、少なくとも一つの試験薬剤を選択することと、(C 1) から (C 10) のいずれか一つに記載の細胞塊を前記試験薬剤と接触させることと、前記試験薬剤の前記細胞塊に含まれる細胞に対する細胞傷害活性を測定することを含む、方法。

(D 3) がんに対する治療活性を有する薬剤を同定する方法であって、少なくとも一つの試験薬剤を選択することと、(C 1) から (C 10) のいずれか一つに記載の細胞塊を前記試験薬剤と接触させることと、前記薬剤の存在及び非存在下で前記細胞塊に含まれる細胞のタンパク質発現を比較することを含む、方法。

(D 4) 薬剤の細胞傷害活性を決定する方法であって、薬剤を(C 1) から (C 10) のいずれか一つに記載の細胞塊に接触させる工程を含む、方法。

(D 5) 薬剤の作用機序を同定する方法であって、少なくとも一つの試験薬剤を選択することと、(C 1) から (C 10) のいずれか一つに記載の細胞塊を前記試験薬剤と接触させることと、前記薬剤の存在及び非存在下で前記細胞塊に含まれる細胞のタンパク質発現を比較することを含む、方法。

(D 6) 抗がん剤と薬剤の併用組み合わせを同定する方法であって、特定の抗がん剤に対して耐性を有する細胞塊を提供する工程と、提供された細胞塊を試験薬剤と接触させる工程と、前記試験薬剤の前記細胞塊に含まれる細胞に対する細胞傷害活性を測定することを含む、方法。

(D 7) 特定の抗がん剤に対して耐性を有する細胞塊において発現量が正常組織より高い遺伝子を同定する工程を含む、抗がん剤に対する耐性を有するがんにおける治療ターゲットの同定方法。

(D 8) 特定の抗がん剤に対して耐性を有する細胞塊において変異している遺伝子を同定する工程を含む、抗がん剤に対する耐性を有するがんにおける治療ターゲットの同定方法。

(D 9) 特定の抗がん剤に対して耐性を有する細胞塊において発現量が正常組織より高いタンパク質を同定する工程を含む、抗がん剤に対する耐性を有するがんにおける治療ターゲットの同定方法。

(D 10) 特定の抗がん剤に対して耐性を有する細胞塊において修飾されているタンパク質を同定する工程を含む、抗がん剤に対する耐性を有するがんにおける治療ターゲットの同定方法。

(D 11) 前記細胞塊は (C 1) から (C 10) のいずれか一つに記載の細胞塊である、(D 6) から (D 10) のいずれか一つに記載の方法。

(D 12) 前記がんは大腸がん、肺がん、乳がん、前立腺がん、すい臓がんから選ばれるがんである、(D 2) から (D 11) のいずれか一つに記載の方法。

[0013] また本開示は、以下のキットを提供する。

(E 1) 少なくとも一種の抗がん剤と、第一の培地を含む、がん組織またはがん組織に類似した組織の立体培養キット。

(E 2) 前記がん組織またはがん組織に類似した組織は、前記抗がん剤により処理された後に立体培養に供される、(E 1) に記載のキット。

(E 3) 前記がん組織またはがん組織に類似した組織に対する抗がん剤による処理は、前記がん組織またはがん組織に類似した組織を前記少なくとも一種の抗がん剤の存在下でインキュベートすることで行う、(E 1) または (E 2) に記載のキット。

(E 4) 前記抗がん剤は、がん細胞の増殖を阻害する薬剤から選ばれる一種類または複数種類の抗がん剤である、(E 1) から (E 3) のいずれか一つ

に記載のキット。

(E 5) 前記抗がん剤は化学療法剤である、(E 1) から (E 4) のいずれか一つに記載のキット。

(E 6) 前記抗がん剤は7-Ethyl-10-hydroxycamptothecinであり、前記抗がん剤処理は濃度300nMの抗がん剤存在下における72hインキュベーションである、(E 1) から (E 5) のいずれか一つに記載のキット。

(E 7) 前記第一の培地は、細胞や組織を立体培養可能な培地である、(E 1) から (E 6) のいずれか一つに記載のキット。

(E 8) 前記第一の培地は、細胞分化を誘導することが可能な培地である、(E 1) から (E 7) のいずれか一つに記載のキット。

(E 9) 前記立体培養キットは更に第一の細胞外マトリックスを含む、(E 1) から (E 8) のいずれか一つに記載のキット。

(E 10) 前記第一の細胞外マトリックスは糖タンパク質、または多糖、またはエラスチンを含む、(E 9) に記載のキット。

(E 11) 前記第一の細胞外マトリックスはMatrigel (登録商標) である、(E 9) または (E 10) に記載のキット。

(E 12) 前記がん組織に類似した組織は、がん幹細胞由来組織である、(E 1) から (E 11) のいずれか一つに記載のキット。

(E 13) 前記がん組織に類似した組織はオルガノイドである、(E 1) から (E 12) のいずれか一つに記載のキット。

(E 14) 前記がん組織に類似した組織はスフェロイドである、(E 1) から (E 12) のいずれか一つに記載のキット。

(E 15) 前記がん組織に類似した組織は、一つまたは複数のがん幹細胞を培養するプレ培養工程によって形成される、(E 1) から (E 14) のいずれか一つに記載のキット。

(E 16) 前記キットは更に第二の培地と第二の細胞外マトリックスを含み、前記プレ培養工程は、一つまたは複数のがん幹細胞を第二の細胞外マトリックスに接着させ、第二の培地を添加して行われる、(E 15) に記載のキ

ット。

(E 1 7) 前記第二の培地は細胞や組織を立体培養可能な培地である、(E 1 6) に記載のキット。

(E 1 8) 前記第二の培地は、前記第一の培地と同構成の培地である、(E 1 6) または (E 1 7) に記載のキット。

(E 1 9) 前記第二の細胞外マトリックスは糖タンパク質、または多糖、またはエラスチンを含む、(E 1 6) から (E 1 8) のいずれか一つに記載のキット。

(E 2 0) 前記第二の細胞外マトリックスはMatrigel (登録商標) である、(E 1 6) から (E 1 9) のいずれか一つに記載のキット。

(E 2 1) 前記プレ培養工程は、一つまたは複数のがん幹細胞を細胞培養培地に浮遊させて培養する工程である、(E 1 5) に記載のキット。

(E 2 2) 前記がん幹細胞は上皮がん由来の腫瘍組織由来の細胞である、(E 1 2) から (E 2 1) のいずれか一つに記載のキット。

(E 2 3) 前記がん組織は、生体から分離されたがん組織または組織破片である、(E 1) から (E 1 1) のいずれか一つに記載のキット。

発明の効果

[0014] 本開示によって、抗がん剤耐性を獲得したがん組織を高度に再現したモデルを構成することに成功した。本開示は、がんの抗がん剤耐性獲得メカニズムの解明や、抗がん剤耐性がんを対象とする治療戦略の探索を可能とする。

図面の簡単な説明

[0015] [図1]オルガノイドの作製方法を示す図である。

[図2]細胞をMatrigel中で立体培養したときのオルガノイドの増殖を示す図である。

[図3]オルガノイドの遺伝子発現解析結果を示す図である。

[図4]オルガノイドの構造とマーカー発現を示す図である。

[図5]再増殖オルガノイドの作製方法を示す図である。

[図6]再増殖オルガノイドの顕微鏡観察写真である。

[図7]再増殖オルガノイドの構造を示す図である。

[図8]再増殖オルガノイドにおけるLGR5発現のFACS解析結果を示す図である。

[図9]再増殖オルガノイドの構造とマーカー発現を示す図である。

[図10]ROS代謝関連遺伝子の遺伝子発現解析結果を示す図である。

[図11]オルガノイドの構造とGPX1、GPX2タンパク質発現を示す図である。

[図12]再増殖オルガノイドへの阻害剤添加方法を示す図である。

[図13]再培養時にgamma-glutamylcysteine synthetase阻害剤 L-Buthionine-sulfoximine および／またはthioredoxin reductase阻害剤 auranofinを添加したオルガノイドの増殖を示す図である。

発明を実施するための形態

[0016] 本開示において、抗がん剤により処理されたがん組織またはがん組織に類似した組織を立体培養する培養工程を含む培養方法が提供される。本開示の培養方法を経て、前記抗がん剤に対して抵抗性を持つがん細胞を得ることができる。

[0017] がん組織またはがん組織に類似した組織の培養方法

本開示の第一の側面として、がん組織またはがん組織に類似した組織を培養する方法が提供される。

[0018] 本開示の培養方法で培養されるがん組織またはがん組織に類似した組織は、抗がん剤で処理された組織である。

[0019] 抗がん剤

本明細書において、「抗がん剤」は、がん細胞に作用する任意の薬剤を利用することができる。たとえば、がん細胞の増殖を阻害する薬剤、がん細胞に対する免疫担当細胞の作用を強化する薬剤等を挙げることができる。がん細胞の増殖の阻害作用には、タンパクや核酸の合成阻害、がん細胞の増殖因子によるシグナリングを阻害する、いわゆる分子標的阻害、各種のホルモン等のがん細胞増殖因子の阻害（拮抗剤）などが含まれる。抗がん剤が、化学的に合成された分子である場合、特に化学療法剤と呼ばれる。疾患治療剤は、合成医薬品のみならず、抗体やサイトカインなどの生物学的製剤（バイオ

医薬) も含まれる。抗体やサイトカインの作用を人為的に強化したり血中動態を改善した改変体も、生物学的製剤と呼ぶ。抗体には、モノクローナル抗体、キメラ抗体、ヒト型化抗体などが含まれる。更に、細胞傷害性T細胞のような、がん細胞に作用する細胞を疾患治療剤に利用することもできる。細胞傷害性T細胞には、その受容体を遺伝子組み換え技術によって導入した、いわゆるCAR (Chimeric Antigen Receptor) - T細胞等も含まれる。

[0020] 本開示に用いる抗がん剤は、利用し得る任意の化合物であってよい。既に臨床応用された抗がん剤であれば、実際の患者に生じている治療抵抗性の細胞塊を再構成することができる。あるいは開発中の候補薬剤を用いる場合は、当該薬剤が、治療抵抗性細胞塊を生じる可能性を知ることができる。

[0021] 化学療法剤

「化学療法剤」は、がんの治療に有用な化学的化合物のことをいう。化学療法剤の例は、以下を含む：チオテパおよびシクロホスファミド (CYTOXAN (登録商標)) などのアルキル化剤；ブスルファン、インプロスルファン、およびピポスルファンなどのスルホン酸アルキル；ベンゾドパ (benzodopa)、カルボコン、メツレドパ (meturedopa)、およびウレドパ (uredopa) などのアジリジン；アルトレタミン、トリエチレンメラミン、トリエチレンホスホルアミド、トリエチレンチオホスホルアミド、およびトリメチロメラミンを含むエチレンイミンおよびメチロールメラミン；アセトゲニン (特にブラタシンおよびブラタシノン)；デルタ-9-テトラヒドロカンナビノール (ドロナビノール、MARINOL (登録商標))；ベータ-ラパコン；ラパコール；コルヒチン；ベツリン酸；カンプトテシン (合成アナログであるトポテカン (HYCAMTIN (登録商標))、CPT-11 (イリノテカン、CAMPTOSAR (登録商標)))、アセチルカンプトテシン、スコボレクチン (scopolectin)、および9-アミノカンプトテシンを含む)；ブリオスタチン；カリスタチン；CC-1065 (そのアドゼレシン、カルゼレシン、およびビゼレシン合成アナログを含む)；ポドフィロトキシン；ポドフィリン酸；テニポシド；クリプトフィシン (特に、クリプトフィシン1およびクリプトフィシン8)；ドラスタチン；デュオカル

マイシン（合成アナログKW-2189およびCB1-TM1を含む）；エロイテロピン；パンクラチスタチン；サルコジクチン；スポンギスタチン；クロラムブシル、クロルナファジン、クロロホスファミド（chlorophosphamide）、エストラムスチン、イホスファミド、メクロレタミン、メクロレタミンオキシド塩酸塩、メルファラン、ノブエンビキン、フェネステリン、プレドニムスチン、トロホスファミド、ウラシルマスタードなどの、ナイトロジェンマスタード；カルムスチン、クロロゾトシン、ホテムスチン、ロムスチン、ニムスチン、およびラニムスチンなどの、ニトロソ尿素；エンジン抗生物質（例えば、カリケアマイシン、特にカリケアマイシンガンマ1IおよびカリケアマイシンオメガI1（例えば、Nicolaou et al., Angew. Chem Intl. Ed. Engl., 33: 183-186（1994）を参照のこと）；経口アルファ-4インテグリン阻害剤である、CDP323；ジネマイシンAを含むジネマイシン；エスペラマイシン；ならびにネオカルジノスタチンクロモフォアおよび関連色素タンパク質エンジン抗生物質クロモフォア）、アクラシノマイシン、アクチノマイシン、アントラマイシン、アザセリン、ブレオマイシン、カクチノマイシン、カルビシン、カルミノマイシン、カルジノフィリン、クロモマイシン、ダクチノマイシン、ダウノルビシン、デトルビシン、6-ジアゾ-5-オキソ-L-ノルロイシン、ドキシソルビシン（ADRIAMYCIN（登録商標））、モルホリノードキシソルビシン、シアノモルホリノードキシソルビシン、2-ピロリノードキシソルビシン、ドキシソルビシンHClリポソーム注射用（DOXIL（登録商標））、リポソームドキシソルビシンTCL D-99（MYOCET（登録商標））、ペグ化リポソームドキシソルビシン（CAELYX（登録商標））、およびデオキシドキシソルビシンを含む）、エピルビシン、エソルビシン、イダルビシン、マルセロマイシン、マイトマイシンCなどのマイトマイシン、ミコフェノール酸、ノガラマイシン、オリボマイシン、ペプロマイシン、ポルフィロマイシン、ピューロマイシン、クエラマイシン（quelamycin）、ロドルビシン（rodorubicin）、ストレプトニグリン、ストレプトゾシン、ツベルシジン、ウベニメクス、ジノスタチン、ゾルビシンなどの、抗生物質；メトトレキサート、ゲムシタビン（GEMZAR（登録商標）

）、テガフル（UFTORAL（登録商標））、カペシタビン（XELODA（登録商標））、エポチロン、および5-フルオロウラシル（5-FU）などの、代謝拮抗物質；デノプテリン、メトトレキサート、プテロプテリン、トリメトトレキサートなどの、葉酸アナログ；フルダラビン、6-メルカプトプリン、チアミプリン、チオグアニンなどの、プリンアナログ；アンシタビン、アザシチジン、6-アザウリジン、カルモフル、シタラビン、ジデオキシウリジン、ドキシフルリジン、エノシタビン、フロクスウリジンなどの、ピリミジンアナログ；カルステロン、プロピオン酸ドロモスタノロン、エピチオスタノール、メピチオスタン、テストラクトンなどの、アンドロゲン；アミノグルテチミド、ミトタン、トリロスタンなどの、抗副腎物質（anti-adrenals）；フォリン酸などの、葉酸補給物質；アセグラトン；アルドホスファミドグリコシド；アミノレブリン酸；エニルウラシル；アムサクリン；ベストラブシル；ビスアントレン；エダトレキサート；デフォファミン（defofamine）；デメコルチン；ジアジクオン；エルフロルニチン（elfornithine）；酢酸エリプチニウム；エポチロン；エトグルシド；硝酸ガリウム；ヒドロキウレア；レンチナン；ロニダミン；メイタンシンおよびアンサマイトシンなどの、メイタンシノイド；ミトグアゾン；ミトキサントロン；モピダモール；ニトラエリン（nitraerine）；ペントスタチン；フェナメット；ピラルピシン；ロソキサントロン；2-エチルヒドラジド；プロカルバジン；PSK（登録商標）多糖複合体（JH S Natural Products, Eugene, OR）；ラゾキサン；リゾキシン；シゾフィラン；スピロゲルマニウム；テヌアゾン酸；トリアジクオン；2,2',2'-トリクロロトリエチルアミン；トリコテセン（特にT-2毒素、ベラキュリンA（verra curin A）、ロリジンA、およびアングエイジン）；ウレタン；ビンデシン（ELDISINE（登録商標）、FILDESIN（登録商標））；ダカルバジン；マンノムスチン；ミトブロニトール；ミトラクトール；ピポブロマン；ガシトシン（gacyt osine）；アラビノシド（「Ara-C」）；チオテパ；タキシイド、例えばパクリタキセル（TAXOL（登録商標））、パクリタキセルのアルブミン改変ナノ粒子製剤（ABRAXANE（商標））、およびドセタキセル（TAXOTERE（登録商標））

）；クロラムブシル；6-チオグアニン；メルカプトプリン；メトトレキサート；シスプラチン、オキサリプラチン（例えば、ELOXATIN（登録商標））、およびカルボプラチンなどの、白金剤；ビンブラスチン（VELBAN（登録商標））、ピンクリスチン（ONCOVIN（登録商標））、ビンデシン（ELDISINE（登録商標）、FILDESIN（登録商標））、およびビノレルビン（NAVELBINE（登録商標））を含む、チューブリン重合による微小管形成を妨げるビンカ類；エトポシド（VP-16）；イホスファミド；ミトキサントロン；ロイコボリン；ノバントロン；エダトレキサート；ダウノマイシン；アミノプテリン；イバンドロネート；トポイソメラーゼ阻害剤RFS 2000；ジフルオロメチルオルニチン（difluoromethylornithine: DMF0）；ベキサロテン（TARGRETIN（登録商標））を含むレチノイン酸などの、レチノイド；クロドロネート（例えば、B ONEFOS（登録商標）またはOSTAC（登録商標））、エチドロネート（DIDROCAL（登録商標））、NE-58095、ゾレドロロン酸／ゾレドロネート（ZOMETA（登録商標））、アレンドロネート（FOSAMAX（登録商標））、パミドロネート（AR EDIA（登録商標））、チルドロネート（SKELID（登録商標））、またはリセドロネート（ACTONEL（登録商標））などの、ビスホスホネート；トロキサシタピン（a 1,3-ジオキサランヌクレオシドシトシンアナログ）；アンチセンスオリゴヌクレオチド、特に、異常な細胞増殖に関連するシグナル伝達経路における遺伝子の発現を阻害するもの、例えばPKC-アルファ、Raf、H-Ras、および上皮成長因子受容体（epidermal growth factor receptor: EGF-R）；THERATOPE（登録商標）ワクチンおよび遺伝子療法用ワクチン（例えば、ALLO VECTIN（登録商標）ワクチン、LEUVECTIN（登録商標）ワクチン、およびVAXI D（登録商標）ワクチン）などの、ワクチン；トポイソメラーゼ1阻害剤（例えば、LURTOTECAN（登録商標））；rmRH（例えば、ABARELIX（登録商標））；BAY439006（ソラフェニブ；Bayer）；SU-11248（スニチニブ、SUTENT（登録商標）、Pfizer）；ペリホシン、COX-2阻害剤（例えば、セレコキシブまたはエトリコキシブ）、プロテオソーム阻害剤（例えば、PS341）；ボルテゾミブ（VELCADE（登録商標））；CCI-779；チピファルニブ（R11577）；ソラフ

エニブ、ABT510；オブリメルセンナトリウム（GENASENSE（登録商標））などの、Bcl-2阻害剤；ピキサントロン；EGFR阻害剤（後述の定義を参照のこと）；チロシンキナーゼ阻害剤（後述の定義を参照のこと）；ラパマイシン（シロリムス、RAPAMUNE（登録商標））などの、セリン-スレオニンキナーゼ阻害剤；ロナファルニブ（SCH 6636、SARASAR（商標））などの、ファルネシルトランスフェラーゼ阻害剤；ならびに上記の任意のものの薬学的に許容される塩、酸、または誘導体；ならびに上記の2つまたはそれ以上の組み合わせ、例えばシクロホスファミド、ドキソルビシン、ピンクリスチンおよびプレドニゾロンの併用療法の略称であるCHOP；および5-FUおよびロイコボリンと組み合わせたオキサリプラチン（ELOXANTIN（商標））による処置レジメンの略称であるFOLF0X。

[0022] 本明細書で定義される化学療法剤は、がんの成長を促進し得るホルモンの作用を調節、減少、阻止、または阻害するよう作用する「抗ホルモン剤」または「内分泌治療剤」を含む。それらは、ホルモンそのものであってもよく、これらに限定されるものではないが以下を含む：タモキシフェン（NOLVADEX（登録商標））、4-ヒドロキシタモキシフェン、トレミフェン（FARESTON（登録商標））、イドキシフェン、ドロロキシフェン、ラロキシフェン（EVISTA（登録商標））、トリオキシフェン、ケオキシフェン、およびSERM3などの選択的エストロゲン受容体調節剤（selective estrogen receptor modulator：SERM）を含む、アゴニスト／アンタゴニスト混合プロフィールを有する抗エストロゲン；フルベストラント（FASLODEX（登録商標））、およびEM800などの、アゴニスト特性を有さない純粋な抗エストロゲン（そのような薬剤はエストロゲン受容体（estrogen receptor：ER）の二量体化を阻止し得、DNAの結合を阻害し得、ERのターンオーバーを増加させ得、および／またはERレベルを抑制し得る）；フォルメスタンおよびエキセメスタン（AROMASIN（登録商標））などのステロイドアロマターゼ阻害剤、ならびに、アナストラゾール（ARIMIDEX（登録商標））、レトロゾール（FEMARA（登録商標））、およびアミノグルテチミドなどの非ステロイドアロマターゼ阻害剤、ならびに

、ボロゾール（RIVISOR（登録商標））、酢酸メゲストロール（MEGASE（登録商標））、ファドロゾール、および4(5)-イミダゾールを含む他のアロマターゼ阻害剤を含む、アロマターゼ阻害剤；ロイプロリド（LUPRON（登録商標））およびELIGARD（登録商標））、ゴセレリン、ブセレリン、ならびにトリプトレリンを含む、黄体形成ホルモン放出ホルモンアゴニスト；酢酸メゲストロールおよび酢酸メドロキシプロゲステロンなどのプロゲスチン、ジエチルスチルベストロールおよびプレマリンなどのエストロゲン、ならびに、フルオキシメステロン、全トランス型レチノイン酸、およびフェンレチニドなどのアンドロゲン／レチノイドを含む、性ステロイド；オナプリストン；抗プロゲステロン；エストロゲン受容体下方制御剤（estrogen receptor down-regulator: ERD）；フルタミド、ニルタミド、およびピカルタミドなどの、抗アンドロゲン；ならびに上記の任意のものの薬学的に許容される塩、酸、または誘導体；ならびに上記の2つまたはそれ以上の組み合わせ。

[0023] 抗がん剤処理

本開示においては、がん組織またはがん組織に類似した組織は、立体培養される前に予め抗がん剤で処理される。たとえば、がん組織またはがん組織に類似した組織を抗がん剤と接触させると、抗がん剤で処理することができる。がん組織に類似した組織を人工的に形成させる場合、例えばがん幹細胞から培養して作製する場合は、適切な条件下でがん幹細胞を培養し、数日から10日程度で組織を形成する。その後、培養系に抗がん剤を添加して、がん幹細胞から形成された組織を、抗がん剤で処理することができる。抗がん剤処理時間は、抗がん剤や、がん組織またはがん組織に類似した組織の組み合わせ等に応じて、最終的に培養対象とするがん組織またはがん組織に類似した組織を与える適切な条件を選択することができる。たとえば、1日～1週間の間、がん組織またはがん組織に類似した組織を抗がん剤で処理することができる。

抗がん剤は、単独で組織を処理することもできるし、異なる種類の抗がん剤を組み合わせることで組織を処理することもできる。たとえば、実際の臨床現場

において、組み合わせて投与される抗がん剤の組み合わせは、組織を処理するための抗がん剤の組み合わせとして有用である。また、抗がん剤は、がん細胞の増殖を阻害し得るものであれば、生体に投与される化合物であっても良いし、その代謝物などの誘導体であることもできる。疾患治療剤が培養液に溶解しにくい場合には、溶解助剤を利用することができる。たとえば、ジメチルスルホキシド(Dimethyl sulfoxide; DMSO)は、細胞毒性が低く水との混和性に優れる溶解助剤として広く利用されている。

抗がん剤は、各抗がん剤ががんに作用しうる条件下でがん幹細胞由来組織に接触させることが望ましい。したがって、抗がん剤の抗がん作用を得るために補助的な因子を要求する場合には、必要な因子とともに組織と接触させることができる。たとえば、抗体の細胞傷害作用には、各種のサイトカインや補体、あるいは捕食細胞などが必要となる場合がある。

[0024] 抗がん剤処理後の立体培養

本開示は、抗がん剤で処理したがん組織またはがん組織に類似した組織をさらに立体培養する工程を含む。たとえば付着培養においては、通常、平面上に二次元方向へ細胞が増殖するのに対し、立体培養においては3次元方法への細胞の形成を促す。具体的には、液体中や細胞外マトリクス中でがん幹細胞由来組織を培養すれば、立体培養が可能である。特に細胞外マトリクス内にがん幹細胞由来組織を保持する場合は、3次元方向に自由に培養を促すことができる。液体中では、培養容器壁によって細胞の増殖方向が物理的に制限される可能性が有るため、細胞外マトリクス内での培養は、本開示の立体培養のための培養条件として好ましい。本開示において、立体培養は、通常、*in vitro*で行われる。

本開示の好ましい態様において、立体培養は、がん組織またはがん組織に類似した組織を処理した抗がん剤を除去したのちに開始することができる。抗がん剤で処された組織を洗浄することで、抗がん剤を除去することができる。その後、立体培養は、好ましくは、抗がん剤の非存在下で継続される。抗がん剤を除去するには、組織を、生理食塩水やDMEM/F12等の新鮮な基礎培

地で洗浄すればよい。

[0025] 洗浄によって抗がん剤を除去した組織は、抗がん剤を含まない新しい細胞外マトリックスと混合することができる。そして、組織と細胞外マトリックスの混合物の上に、抗がん剤を含まない新しい培地（第1の培地）を乗せることで、組織の立体培養の好ましい条件を与えることができる。あるいは、細胞外マトリックスの上にがん組織を置き、その上から新たな細胞外マトリックスを載せることもできる。更に、細胞外マトリックス内に癌組織を挿入することによって立体培養することもできる。

[0026] たとえば、大腸がん由来するがん幹細胞株であるPLR123から培養した組織（オルガノイド）を、大腸がんの一般的な治療剤であるイリノテカン（irinotecan : CPT-11）が体内で分解されて生じる活性型分子（SN-38）で処理する場合、0.1～10 μ Mを培地に添加し、1日～5日程度処理することができる。好ましい処理時間は、例えば3日程度（72時間）である。処理後のオルガノイドを洗浄し、増殖可能な条件下で再度立体培養すれば抗がん剤に対して治療抵抗性の細胞塊を形成する。

[0027] 立体培養培地

本開示の立体培養に使用可能な培地（第一の培地）は、細胞や組織を立体培養するのに使用できる培地であれば特に限定されるものではなく、例えば従来公知の基礎培地または基礎培地に添加物を加えた培地を用いることができる。

公知の基礎培養液としては、がん幹細胞のもととなるがん細胞の培養に適したものであれば特に限定されないが、例えばDMEM/F12、DMEM、F10、F12、IMDM、EMEM、RPMI-1640、MEM、BME、Mocoy's 5A、MCDB131等が挙げられる。

添加物として、EGF、bFGF、hLIF、HGF、NGF、NSF-1、TGF β 、TNF α 、Heparin等のgrowth factor、抗生物質、Sodium BicarbonateやHEPES等の緩衝材、Glucose、Glutamine、BSA、insulin、Transferrin、Putrescine、Selenite、Progesterone、Hydrocortisone、N-acetylcysteine、N-2 SupplementやB-27 Supplement等の複合サプリメントを用いることができる。

EGFの濃度は特に限定されないが、0.1~100ng/mL、好ましくは0.5~50ng/mL、より好ましくは1~20ng/mLである。bFGFの濃度は特に限定されないが、0.1~100ng/mL、好ましくは0.5~50ng/mL、より好ましくは1~20ng/mLである。hLIFの濃度は特に限定されないが、0.1~100ng/mL、好ましくは0.5~50ng/mL、より好ましくは1~20ng/mLである。HGFの濃度は特に限定されないが、0.1~100ng/mL、好ましくは1~50ng/mLである。NGFの濃度は特に限定されないが、0.1~100ng/mL、好ましくは1~50ng/mLである。NSF-1の濃度は特に限定されないが、0.1~100ng/mL、好ましくは1~50ng/mLである。TGF β の濃度は特に限定されないが、0.1~100ng/mL、好ましくは1~50ng/mLである。TNF α の濃度は特に限定されないが、0.1~100ng/mL、好ましくは1~50ng/mLである。Heparinの濃度は特に限定されないが、10ng/mL~10 μ g/mL、好ましくは2~5 μ g/mLである。BSAの濃度は特に限定されないが、0.1~10mg/mL、好ましくは1~8mg/mLである。Insulinの濃度は特に限定されないが、1~100 μ g/mL、好ましくは10~50 μ g/mLである。Transferrinの濃度は特に限定されないが、10~500 μ g/mL、好ましくは50~200 μ g/mLである。Putrescineの濃度は特に限定されないが、1~50 μ g/mL、好ましくは10~20 μ g/mLである。Seleniteの濃度は特に限定されないが、1~50nM、好ましくは20~40nMである。Progesteroneの濃度は特に限定されないが、1~50nM、好ましくは10~30nMである。Hydrocortisoneの濃度は特に限定されないが、10ng/mL~10 μ g/mL、好ましくは100ng/mL~1 μ g/mLである。D-(+)-Glucoseの濃度は特に限定されないが、1~20mg/mL、好ましくは2~10mg/mLである。Sodium Bicarbonateの濃度は特に限定されないが、0.1~5mg/mL、好ましくは0.5~2mg/mLである。HEPESの濃度は特に限定されないが、0.1~50mM、好ましくは1~20mMである。L-Glutamineの濃度は特に限定されないが、0.1~10mM、好ましくは1~5mMである。N-acetylcysteineの濃度は特に限定されないが、1~200 μ g/mL、好ましくは10~100 μ g/mLである。

[0028] 本発明の方法で使用される立体培養培地（第一の培地）には、あらゆる細胞培養培地が含まれる。好ましい細胞培養培地は、炭酸系の緩衝液で7.4のpH

(好ましくは7.2~7.6の間または少なくとも7.2であり7.6以下)に緩衝化されている規定の合成培地であり、一方で、この細胞は、5%~10%の間のCO₂または少なくとも5%および10%以下のCO₂、好ましくは5%CO₂を含む雰囲気下で培養される。

[0029] 以上のような培地組成は、がん組織またはがん組織に類似した組織の培養に好適である。組織が生存や増殖に増殖因子などを必要とする場合には、培地に増殖因子も添加することができる。これらの培地で組織を立体培養するには、通常、上記培地に加え、細胞外マトリクスが利用される。細胞外マトリクスは、上記のような培地に加えて用いられることで、培養組織や細胞に足場を与え、細胞の維持増殖と組織形成を支える作用を持つ。たとえば、基底膜マトリクスに各種の成長因子などを配合した細胞外マトリクスが「Matrigel」等の商品名で商業的に供給されている。

[0030] 細胞外マトリックス

本発明の立体培養培地(第一の培地)は細胞外マトリックス(ECM)の中に拡散されてもよい。好ましい本発明の方法において、単離された組織断片または単離された上皮幹細胞はECMに取り付けられる。ECMは、様々な多糖、水、エラスチン、および糖タンパク質からなる。糖タンパク質は、コラーゲン、エンタクチン(ナイドジェン)、フィブロネクチン、およびラミニンを含む。ECMは結合組織細胞によって分泌される。異なるタイプの糖タンパク質および/または糖タンパク質の異なる組み合わせを含む異なる組成物を含む異なるタイプのECMが公知である。前記ECMは、入れ物の中でECM産生細胞、例えば、線維芽細胞を培養した後に、これらの細胞を取り出し、単離された組織断片または単離された上皮幹細胞を添加することによって提供することができる。細胞外マトリックス産生細胞の例は、主にコラーゲンおよびプロテオグリカンを産生する軟骨細胞、主にIV型コラーゲン、ラミニン、間質プロコラーゲン、およびフィブロネクチンを産生する線維芽細胞、ならびに主にコラーゲン(I型、III型、およびV型)、コンドロイチン硫酸プロテオグリカン、ヒアルロン酸、フィブロネクチン、およびテネイシン-Cを産生する結腸筋線維芽細胞

胞である。または、前記ECMは商業的に供給されている。市販の細胞外マトリックスの例は、細胞外マトリックスタンパク質(Invitrogen)およびEngelbreth-Holm-Swarm(EHS)マウス肉腫細胞に由来する基底膜調製物(例えば、Matrigel(登録商標)(BD Biosciences))である。ProNectin(SigmaZ378666)などの合成細胞外マトリックス材料が用いられてもよい。所望であれば、細胞外マトリックス材料の混合物が用いられてもよい。幹細胞を培養するためにECMを使用すると、幹細胞の長期生存および未分化幹細胞の継続的存在が強化される。ECMの存在下では、ECMの非存在下では培養することができない三次元組織オルガノイドを培養することができる。細胞外マトリックス材料は、通常、細胞が懸濁されたディッシュの底に沈んでいる。典型的には、マトリックスが37°Cで凝固する時に、培地が加えられ、ECMの中に拡散する。培地中の細胞は、ECMの表面構造と相互作用することによって、例えば、インテグリンと相互作用することによってECMに固着する。細胞培養容器をコーティングするために、約1 $\mu\text{g}/\text{cm}^2$ で用いられる約1mg/ml(原液)、または約1 $\mu\text{g}/\text{cm}^2$ ~約250 $\mu\text{g}/\text{cm}^2$ 、または約1 $\mu\text{g}/\text{cm}^2$ ~約150 $\mu\text{g}/\text{cm}^2$ のフィブロネクチン溶液が用いられてもよい。一部の態様において、細胞培養容器は8 $\mu\text{g}/\text{cm}^2$ ~125 $\mu\text{g}/\text{cm}^2$ のフィブロネクチンでコーティングされる。

[0031] 本開示中の培養方法において使用するためのECMの一例は、ラミニンなどの少なくとも1種類の糖タンパク質を含む。

[0032] 本開示中の培養方法において使用するための好ましいECMは、少なくとも2種類の別個の糖タンパク質、例えば、2つの異なるタイプのコラーゲンまたはコラーゲンおよびラミニンを含む。ECMは合成ヒドロゲル細胞外マトリックスまたは天然ECMでもよい。さらに好ましいECMはMatrigel(登録商標)(BD Biosciences)によって提供される。Matrigel(登録商標)(BD Biosciences)は、ラミニン、エンタクチン、およびコラーゲンIVを含む。一部の態様において、細胞外マトリックスは、Matrigel(登録商標)(BD Biosciences)などのラミニン含有細胞外マトリックスである。

[0033] 一部の態様において、単一の幹細胞、細胞集団、または組織断片はMatrige

l(登録商標)(BD Biosciences)に埋め込まれる。Matrigel(登録商標)(BD Biosciences)は任意で増殖因子が少ない、および/またはフェノールレッドフリーである。

[0034] 一部の態様において、培養培地はECMの上部に配置される。次いで、必要に応じておよび必要な時に、培養培地を除去および補充することができる。一部の態様において、培養培地は、1日ごとに、2日ごとに、3日ごとに、4日ごとに、5日ごとに、6日ごとに、または7日ごとに補充される。成分が「加えられる」のであれば、または培地から「除去される」のであれば、これは、一部の態様において、培地それ自体がECMから除去され、次いで、「加えられる」成分を含有する新たな培地、または「除去される」成分が排除された新たな培地がECM上に配置されることを意味する。

[0035] 一部の態様において、本開示に用いられる培養培地は、細胞外マトリックス、または細胞膜タンパク質、例えば、インテグリンと相互作用することによって細胞外マトリックスを模倣する3Dマトリックスと接触している。

[0036] 培養条件

本開示のがん組織またはがん組織に類似した組織の培養方法において、特に望ましい培養条件として、以下のような例を示すことができる：

組織を50% Matrigelに埋め込み、

DMEM/F12 (HEPESとグルタミン含有)

penicillin/streptomycin

N2 supplement (インスリン含有)

B27 supplement (インスリン含有)

N-アセチルシステイン

37°C

5% CO₂

20% O₂

[0037] 一般的な培養条件でがん組織やがん組織に類似した組織を立体培養し、治療抵抗性細胞塊を誘導するには、2日～10日程度の培養期間を要する。治

療抵抗性細胞塊を形成したことは、細胞塊の形態的な特徴の変化や、分化細胞の形成などを指標に知ることができる。たとえば、大腸がん由来の幹細胞株PLR123から培養されたオルガノイドを抗がん剤で処理し、本開示の培養方法で更に立体培養する場合は、上記のような培養条件で2～10日の培養後に、抗がん剤耐性の大腸がん組織の特徴を備え、かつ分化細胞を含む治療抵抗性細胞塊が形成される。

[0038] がん組織

本開示の培養方法において、がん病巣中に生じたがん組織を抗がん剤で処理した後、培養することができる。たとえば、外科的に切除されたがん病巣中のがん組織や、がん病巣内に形成されたがん幹細胞を含む構造も、本開示の培養方法を使用して培養することができる。患者から得たがん組織を利用することにより、患者に固有の特徴を備えた治療抵抗性細胞塊の形成が期待できる。

[0039] がん組織に類似した組織

本開示のがん組織に類似した組織として、がん幹細胞由来組織を使用することができる。がん幹細胞由来組織は、がん幹細胞の増殖と分化の進行に伴って形成される、多細胞の細胞塊である。培養条件を整えることにより、通常、同じがん幹細胞からは共通の組織化学的な特徴を有するがん幹細胞由来組織、または同じがん幹細胞から分化して異なる特徴を有する細胞を含むがん幹細胞由来組織が形成される。

本開示において、がん組織に類似した組織またはがん幹細胞由来組織は、例えば、がん幹細胞やがん幹細胞を含む細胞群を培養することにより、作製することができる。所定の期間培養後に、組織としての形態的な特徴や、幹細胞や分化細胞のマーカーとなる遺伝子の発現状態を通じて、がん組織に類似した組織またはがん幹細胞由来組織が形成されたことを知ることができる。

[0040] がん幹細胞を含む細胞群としては、SV40などのがんウイルス遺伝子若しくはRasなどのがん遺伝子を導入した細胞、がん組織から株化した細胞

などを用いることができる。

- [0041] がん幹細胞を含む細胞群としては、がん組織の階層構造を再現する細胞群を用いることが好ましく、例えば採取したがん組織を用いることができるが、好ましくは非ヒト動物にがんを移植し継代して作製した樹立がん細胞株で、さらに好ましくは免疫不全動物にがんを移植し継代して作製した樹立がん細胞株で、最も好ましくはNOGマウスにがん組織を移植し継代して作製したNOG樹立がん細胞株を用いることができる。
- [0042] さらに、がん幹細胞を含む細胞群としては、スフェロイド培養により形成されたスフェロイドでもよいし、又は、がん幹細胞マーカーCD24、CD29、CD34、CD44、CD49f、CD56、CD90、CD117、CD133、CD135、CD166、CD184、CD271、CD326、Aldefluor、ABCG2、ABCG5、LGR5、及びMsi1から選択される少なくとも1つ以上のマーカーが陽性である細胞を含む細胞群でもよい。
- [0043] 細胞群の由来は特に限定されず、ヒト、サル、チンパンジー、イヌ、ウシ、ブタ、ウサギ、ラット、マウス等の哺乳動物等に由来するものを用いることができるが、ヒト由来のものが好ましい。
- [0044] NOG樹立がん細胞株は当業者に知られた方法で作製することができ、例えば Fujii E. et al., Pathol int. 2008; 58: 559-567に記載された方法などを用いることができ、外科手術で摘出したヒト大腸がん、胃がん、肺がん、乳がん、膵臓がんなどをハサミで物理的にミンスし、NOGマウスに皮下移植・継代することにより樹立できる。NOG樹立がん細胞株では継代を経てもオリジナルヒトがん組織の特徴が維持される。
- [0045] 一つの態様において、開示のがん組織に類似した組織は、がん幹細胞またはがん幹細胞から主に構成された組織の断片を立体培養する工程によって作製または得られた、細胞集団または前記がん幹細胞を含む1つもしくは複数のオルガノイドである。前記のがん幹細胞またはがん幹細胞から主に構成された組織の断片は、少なくとも1日間、好ましくは、少なくとも2日間、3日間、4日間、5日間、6日間、7日間、8日間、9日間、10日間、またはそれより長く培養されている。

[0046] 一つの態様において、開示のがん組織に類似した組織は、がん幹細胞またはがん幹細胞から主に構成された組織の断片を浮遊培養する工程によって作製または得られた、細胞集団または前記がん幹細胞を含む1つもしくは複数のスフェロイド (spheroid) である。前記のがん幹細胞またはがん幹細胞から主に構成された組織の断片は、少なくとも1日間、好ましくは、少なくとも2日間、3日間、4日間、5日間、6日間、7日間、8日間、9日間、10日間、またはそれより長く培養されている。

[0047] 生体外で形成されたがん組織に類似した組織は、特にオルガノイドやスフェロイドがある。がん組織に類似した組織またはがん幹細胞由来組織を生体外で得るために行う培養は、特にプレ培養工程と言う。

[0048] プレ培養

本開示の培養方法で培養するがん組織に類似した組織をプレ培養工程で培養する場合に使用する培地 (第二の培地) は、細胞や組織を培養するのに使用できる培地であれば特に限定されるものではなく、例えば従来公知の基礎培地または基礎培地に添加物を加えた培地を用いることができる。第二の培地は、プレ培養の態様に応じて、立体培養に適した培地とそうでない培地から選択することができる。また、プレ培養が立体培養の場合、第二の培地は、第一の培地と同構成の培地であっても良い。

公知の基礎培養液としては、がん幹細胞のもととなるがん細胞の培養に適したものであれば特に限定されないが、例えばDMEM/F12、DMEM、F10、F12、IMDM、EMEM、RPMI-1640、MEM、BME、Mocoy's 5A、MCDB131等が挙げられる。

添加物として、EGF、bFGF、hLIF、HGF、NGF、NSF-1、TGF β 、TNF α 、Heparin等のgrowth factor、抗生物質、Sodium BicarbonateやHEPES等の緩衝材、Glucose、Glutamine、BSA、insulin、Transferrin、Putrescine、Selenite、Progesterone、Hydrocortisone、N-acetylcysteine、N-2 SupplementやB-27 Supplement等の複合サプリメントを用いることができる。

EGFの濃度は特に限定されないが、0.1~100ng/mL、好ましくは0.5~50ng/mL、より好ましくは1~20ng/mLである。bFGFの濃度は特に限定されないが、0.

1~100ng/mL、好ましくは0.5~50ng/mL、より好ましくは1~20ng/mLである。hLIFの濃度は特に限定されないが、0.1~100ng/mL、好ましくは0.5~50ng/mL、より好ましくは1~20ng/mLである。HGFの濃度は特に限定されないが、0.1~100ng/mL、好ましくは1~50ng/mLである。NGFの濃度は特に限定されないが、0.1~100ng/mL、好ましくは1~50ng/mLである。NSF-1の濃度は特に限定されないが、0.1~100ng/mL、好ましくは1~50ng/mLである。TGF β の濃度は特に限定されないが、0.1~100ng/mL、好ましくは1~50ng/mLである。TNF α の濃度は特に限定されないが、0.1~100ng/mL、好ましくは1~50ng/mLである。Heparinの濃度は特に限定されないが、10ng/mL~10 μ g/mL、好ましくは2~5 μ g/mLである。BSAの濃度は特に限定されないが、0.1~10mg/mL、好ましくは1~8mg/mLである。Insulinの濃度は特に限定されないが、1~100 μ g/mL、好ましくは10~50 μ g/mLである。Transferrinの濃度は特に限定されないが、10~500 μ g/mL、好ましくは50~200 μ g/mLである。Putrescineの濃度は特に限定されないが、1~50 μ g/mL、好ましくは10~20 μ g/mLである。Seleniteの濃度は特に限定されないが、1~50nM、好ましくは20~40nMである。Progesteroneの濃度は特に限定されないが、1~50nM、好ましくは10~30nMである。Hydrocortisoneの濃度は特に限定されないが、10ng/mL~10 μ g/mL、好ましくは100ng/mL~1 μ g/mLである。D-(+)-Glucoseの濃度は特に限定されないが、1~20mg/mL、好ましくは2~10mg/mLである。Sodium Bicarbonateの濃度は特に限定されないが、0.1~5mg/mL、好ましくは0.5~2mg/mLである。HEPESの濃度は特に限定されないが、0.1~50mM、好ましくは1~20mMである。L-Glutamineの濃度は特に限定されないが、0.1~10mM、好ましくは1~5mMである。N-acetylcysteineの濃度は特に限定されないが、1~200 μ g/mL、好ましくは10~100 μ g/mLである。

[0049] 本発明の方法で使用される第二の培地には、あらゆる細胞培養培地が含まれる。好ましい細胞培養培地は、炭酸系の緩衝液で7.4のpH（好ましくは7.2~7.6の間または少なくとも7.2であり7.6以下）に緩衝化されている規定の合成培地であり、一方で、この細胞は、5%~10%の間のCO₂または少なくとも5%お

よび10%以下のCO₂、好ましくは5%CO₂を含む雰囲気下で培養される。

[0050] 以上のような培地組成は、がん幹細胞の培養に好適である。組織が生存や増殖に増殖因子などを必要とする場合には、培地に増殖因子も添加することができる。これらの培地で組織を立体培養するには、通常、上記培地に加え、細胞外マトリクスが利用される。細胞外マトリクスは、上記のような培地に加えて用いられることで、培養組織や細胞に足場を与え、細胞の維持増殖と組織形成を支える作用を持つ。たとえば、基底膜マトリクスに各種の成長因子などを配合した細胞外マトリクスが「Matrigel」等の商品名で商業的に供給されている。

[0051] プレ培養工程が立体培養の場合、本発明の第二の培地は細胞外マトリックス(ECM)の中に拡散されてもよい。好ましい本発明の方法において、単離された組織断片または単離された上皮幹細胞はECMに取り付けられる。ECMは、様々な多糖、水、エラスチン、および糖タンパク質からなる。糖タンパク質は、コラーゲン、エンタクチン(ナイドジェン)、フィブロネクチン、およびラミニンを含む。ECMは結合組織細胞によって分泌される。異なるタイプの糖タンパク質および/または糖タンパク質の異なる組み合わせを含む異なる組成物を含む異なるタイプのECMが公知である。前記ECMは、入れ物の中でECM産生細胞、例えば、線維芽細胞を培養した後に、これらの細胞を取り出し、単離された組織断片または単離された上皮幹細胞を添加することによって提供することができる。細胞外マトリックス産生細胞の例は、主にコラーゲンおよびプロテオグリカンを生産する軟骨細胞、主にIV型コラーゲン、ラミニン、間質プロコラーゲン、およびフィブロネクチンを生産する線維芽細胞、ならびに主にコラーゲン(I型、III型、およびV型)、コンドロイチン硫酸プロテオグリカン、ヒアルロン酸、フィブロネクチン、およびテネイシン-Cを生産する結腸筋線維芽細胞である。または、前記ECMは商業的に供給されている。市販の細胞外マトリックスの例は、細胞外マトリックスタンパク質(Invitrogen)およびEngelbreth-Holm-Swarm(EHS)マウス肉腫細胞に由来する基底膜調製物(例えば、Matrigel(登録商標)(BD Biosciences))である。ProNectin(SigmaZ3

78666)などの合成細胞外マトリックス材料が用いられてもよい。所望であれば、細胞外マトリックス材料の混合物が用いられてもよい。幹細胞を培養するためにECMを使用すると、幹細胞の長期生存および未分化幹細胞の継続的存在が強化される。ECMの存在下では、ECMの非存在下では培養することができない三次元組織オルガノイドを培養することができる。細胞外マトリックス材料は、通常、細胞が懸濁されたディッシュの底に沈んでいる。典型的には、マトリックスが37℃で凝固する時に、培地が加えられ、ECMの中に拡散する。培地中の細胞は、ECMの表面構造と相互作用することによって、例えば、インテグリンと相互作用することによってECMに固着する。細胞培養容器をコーティングするために、約 $1\mu\text{g}/\text{cm}^2$ で用いられる約 $1\text{mg}/\text{ml}$ (原液)、または約 $1\mu\text{g}/\text{cm}^2$ ～約 $250\mu\text{g}/\text{cm}^2$ 、または約 $1\mu\text{g}/\text{cm}^2$ ～約 $150\mu\text{g}/\text{cm}^2$ のフィブロネクチン溶液が用いられてもよい。一部の態様において、細胞培養容器は $8\mu\text{g}/\text{cm}^2$ ～ $125\mu\text{g}/\text{cm}^2$ のフィブロネクチンでコーティングされる。

- [0052] 本開示中の培養方法において使用するためのECMの一例は、ラミニンなどの少なくとも1種類の糖タンパク質を含む。
- [0053] 本開示中のプレ培養において使用するための好ましいECMは、少なくとも2種類の別個の糖タンパク質、例えば、2つの異なるタイプのコラーゲンまたはコラーゲンおよびラミニンを含む。ECMは合成ヒドロゲル細胞外マトリックスまたは天然ECMでもよい。さらに好ましいECMはMatrigel(登録商標)(BD Biosciences)によって提供される。Matrigel(登録商標)(BD Biosciences)は、ラミニン、エンタクチン、およびコラーゲンIVを含む。一部の態様において、細胞外マトリックスは、Matrigel(登録商標)(BD Biosciences)などのラミニン含有細胞外マトリックスである。
- [0054] 一部の態様において、単一の幹細胞、細胞集団、または組織断片はMatrigel(登録商標)(BD Biosciences)に埋め込まれる。Matrigel(登録商標)(BD Biosciences)は任意で増殖因子が少ない、および/またはフェノールレッドフリーである。
- [0055] 一部の態様において、培養培地はECMの上部に配置される。次いで、必要に

応じておよび必要な時に、培養培地を除去および補充することができる。一部の態様において、培養培地は、1日ごとに、2日ごとに、3日ごとに、4日ごとに、5日ごとに、6日ごとに、または7日ごとに補充される。成分が「加えられる」のであれば、または培地から「除去される」のであれば、これは、一部の態様において、培地それ自体がECMから除去され、次いで、「加えられる」成分を含有する新たな培地、または「除去される」成分が排除された新たな培地がECM上に配置されることを意味する。

[0056] 一部の態様において、本開示に用いられる第二の培地は、細胞外マトリックス、または細胞膜タンパク質、例えば、インテグリンと相互作用することによって細胞外マトリックスを模倣する3Dマトリックスと接触している。

[0057] 本開示のプレ培養ががん幹細胞を立体培養する場合において、特に望ましい培養条件として、以下のような例を示すことができる：

組織を50% Matrigelに埋め込み、
DMEM/F12（HEPESとグルタミン含有）
penicillin/streptomycin
N2 supplement（インスリン含有）
B27 supplement（インスリン含有）
N-アセチルシステイン
37°C
5% CO₂
20% O₂

[0058] 幹細胞

幹細胞は成体ヒトおよびマウスの多くの臓器において見出される。個々の組織における成体幹細胞の正確な特徴に大きなばらつきがある場合があるが、成体幹細胞は少なくとも以下の特徴を共有する：未分化表現型を保持していること；子孫が、関連組織に存在する全ての系列に分化できること；一生を通じて自己維持能を保持していること；および損傷後に関連組織を再生できること。幹細胞は幹細胞ニッチという特殊な位置に存在する。幹細胞ニッ

チは、前記幹細胞集団を維持するための適切な細胞間接着およびシグナルを提供する。本開示中の幹細胞は好ましくはLGR5を発現する。

[0059] がん幹細胞

本開示におけるがん幹細胞の由来は特に限定されるものではないが、ヒト腫瘍組織やヒト細胞株由来であることが好ましい。

[0060] 本発明において「がん」とは、典型的には制御されない細胞増殖により特徴づけられる哺乳動物の生理学的状態を意味し、又はかかる生理学的状態を言う。本発明において、がんの種類は、特に限定されるものではないが、次のものが挙げられる：癌腫（上皮がん）としては、膵臓がん、前立腺がん、乳がん、皮膚がん、消化管のがん、肺がん、肝細胞がん、子宮頸がん、子宮体がん、卵巣がん、卵管がん、膣がん、肝臓がん、胆管がん、膀胱がん、尿管のがん、甲状腺がん、副腎がん、腎臓がん、又はその他の腺組織のがんが挙げられる。肉腫（非上皮がん）としては、脂肪肉腫、平滑筋肉腫、黄紋筋肉腫、滑膜肉腫、血管肉腫、線維肉腫、悪性末梢神経腫瘍、消化管間質系腫瘍、類腱腫、ユーイング肉腫、骨肉腫、軟骨肉腫、白血病、リンパ腫、骨髄腫、その他の実質臓器の腫瘍、例えばメラノーマ又は脳腫瘍が挙げられる（Kumar V, Abbas AK, Fausto N, Robbins and Cotran Pathologic Basis of Disease, 7th Ed, Unit I: General Pathology, 7: Neoplasia, Biology of tumor growth: Benign and malignant neoplasms, 269-342, 2005）。本発明におけるがん幹細胞は、上記の上皮がん由来の腫瘍組織由来のものであってもよい。あるいは、がん幹細胞から樹立された細胞株であることもできる。

[0061] 本開示において、がん幹細胞とは、以下の i) 及び／又は ii) に記載された能力を有する細胞をいう。

i) 自己複製能を保有する。自己複製能とは、分裂した2つの娘細胞のどちらか1つ又は両方の細胞が、細胞系譜上、親細胞と同等の能力及び分化程度を保持している細胞を産出できる能力をいう。

ii) がん細胞塊を構成する複数種のがん細胞へ分化できる。がん幹細胞から分化した複数種のがん細胞は、正常幹細胞と同様に、細胞系譜上、がん幹細胞

胞を頂点とする階層構造を形成する。がん幹細胞から段階的に多種がん細胞が産出されることにより多様な特徴を有するがん細胞塊が形成される。

- [0062] がん幹細胞とはがん形成能をもち、正常幹細胞と同様に多分化能と自己複製能を持つがん細胞である。また、がん幹細胞マーカーCD24、CD29、CD34、CD44、CD49f、CD56、CD90、CD117、CD133、CD135、CD166、CD184、CD271、CD326、Aldefluor、ABCG2、ABCG5、LGR5、及びMsi1から選択される少なくとも1つ以上のマーカーが陽性である場合があるが、必ずしも陽性である必要はない。好ましくは、CD326、CD133、CD44、ALDH、LGR5から選択される少なくとも1つ以上のマーカーが陽性であり、さらに好ましくは、CD326、CD133、CD44、ALDH、LGR5から選択される少なくとも2つ以上のマーカーが陽性であり、さらに好ましくは、CD326、CD133、CD44、ALDH、LGR5から選択される少なくとも3つ以上のマーカーが陽性であり、最も好ましくはCD326、CD133、CD44、ALDH、LGR5すべてが陽性である。

本開示において、がん幹細胞は、がん組織から得られた幹細胞に加え、それらの幹細胞から樹立された細胞株であることもできる。ヒト大腸がん由来の幹細胞株であるPLR59やPLR123(STEM CELLS 2012; 30: 2631-2644)は、代表的ながん幹細胞株である。細胞株を出発材料とする場合には、目的とする細胞塊を、高い再現性で均質な状態で得ることができる。

[0063] 細胞塊の形成方法

本開示によって、疾患治療剤に対して治療抵抗性の細胞塊の形成方法が提供される。該方法は、抗がん剤により処理されたがん組織またはがん組織に類似した組織を立体培養する工程を含む。本開示の方法の各工程は、先に、がん組織はたま癌組織に類似した組織の培養方法として詳述した方法に準じて実施することができる。すなわち本開示は、抗がん剤により処理されたがん組織またはがん組織に類似した組織を立体培養する工程を含む、抗がん剤に対して治療抵抗性の細胞塊の製造方法に関する。本開示において、最終的に形成される細胞塊は、抗がん剤の処理後に生存していた細胞から形成されたものである。したがって、その処理に利用した抗がん剤に対する抵抗性を

備えた組織である。なお本開示における抗がん剤に対して治療抵抗性の細胞塊の製造方法は、その好ましい態様において、がん組織の立体培養の後に、立体培養によって誘導された抗がん剤に対して治療抵抗性の細胞塊を培養系から単離する工程を含む。

本開示において、「細胞塊」は、抗がん剤処理後の組織を立体培養して形成されたオルガノイドを含む。

[0064] 治療抵抗性細胞塊

このようにしてがん組織またはがん組織に類似した組織を培養することから形成された抗がん剤に対して耐性を有する細胞塊（治療抵抗性細胞塊）は、具体的には、次のような組織化学的特徴を少なくとも一つを備えている。

単層から重層の立方状細胞で構成された組織表面に凸部を示す；

細胞塊内や管腔内にcell debrisを多く含んだ、大型円形-長円形の細胞で構成される；

腫瘍細胞塊の区画化が認められる；

それらの区画化構造から、その後新たな腺構造が形成される；

LGR5(Uniprot ID: 075473、Refseq accession No. NP_003658)の発現はいったん減少し、その後回復する；

同じく幹細胞マーカーとされるCD44 (Uniprot ID: P16070)、特にCD44v9 (CD44v8-10、CD44Eともいう、Uniprot ID: P16070-10、Refseq accession No. NP_001001390.1, NM_001001390.1) も陽性；

以上のような組織化学的特徴は、化学療法剤を投与した大腸がん患者組織に見られるsmall cluster構造とよく一致する。

[0065] また本開示は、以上の方法によって形成された抗がん剤に対して治療抵抗性の細胞塊に関する。本開示の細胞塊は、その形成において利用された抗がん剤に対する耐性を有する。本開示の細胞塊は、好ましい態様において、がん幹細胞マーカーを発現する。また本開示の細胞塊は、好ましい態様において、がん幹細胞マーカーであるLGR5やCD44v9を発現する。また別の態様において、本開示の細胞塊は、GPX2等のグルタチオン代謝酵素をも発現する。本

開示の細胞塊は、更なる態様において、Vimentin (Uniprot ID: P08670、Refseq accession No. NP_003371) 及びZEB1(Uniprot ID: P37275、Refseq accession No. NP_110378)の発現は陰性である。更に好ましい態様において、本開示の細胞塊は、上皮系マーカーであるE-カドヘリン (E-cadherin、Uniprot ID: P12830、Refseq accession No. NP_004351) が弱陽性である。あるいは組織学的には、本開示の細胞塊は、10-30個の細胞から構成され、典型的には100 μ m以下の大きさを持つ。また好ましい態様において、当該細胞塊は細胞の分化とともに腺(gland)構造を備えるようになる。

これらの特徴は、実際に化学療法を経た大腸がん患者組織中に見出されたsmall clusterの特徴とよく一致することを意味する。したがって、本開示の細胞塊の観察によって、抗がん剤治療時にがん組織内に生じる抗がん剤耐性を獲得した組織の特徴を知ることができる。

[0066] 細胞塊の用途

すなわち本開示は、本開示によって形成された細胞塊を構成する細胞を対象として、遺伝子発現プロファイル、遺伝子発現量、タンパク質発現プロファイル、タンパク質発現量、タンパク質修飾、タンパク質局在、エピゲノム、およびメタボロミクス等の状態を分析する方法にも関する。本開示によって形成された細胞塊は、化学療法を経たがん組織内に生じる抗がん剤耐性組織の特徴を備えたモデルである。したがって、その性状を観察し、たとえば抗がん剤応答性のがん組織の特徴と比較することによって、抗がん剤耐性を獲得した組織に特異的な変化を同定することができる。あるいは、本開示の細胞塊が形成される過程において、これらの性状の変化を追跡することで、抗がん剤耐性組織が形成されていく過程を理解することができる。

[0067] 細胞塊を用いた遺伝子発現／プロファイル解析

本開示において、遺伝子発現プロファイルや遺伝子発現量の解析には、DNAマイクロアレイが有用である。ヒト遺伝子の大部分をカバーするマイクロアレイを利用することによって、細胞内の遺伝子発現状態を網羅的に解析することができる。解析対象をmRNAとするときには、cDNAマイクロアレイが用い

られる。あるいはmiRNAの解析には、miRNA用のプローブを搭載したマイクロアレイが利用される。マイクロアレイによる発現解析の結果、対照と比較して、抗がん剤耐性を獲得した組織に特異的な発現パターン（情報または下方制御）が観察された遺伝子を、抗がん剤耐性の獲得に特徴的な遺伝子として同定することができる。この場合、対照としては、例えば、同じ抗がん剤に対して感受性の組織を用いることができる。好ましい態様において、対照は、通常、抗がん剤感受性以外の条件を、できるだけ共通となるようにすることによって、耐性獲得に特異的な変化を容易に見出すことができる。共通とする条件としては、例えば、組織や細胞の種類、培養条件などを挙げることができる。あるいはタンパク質発現プロファイルやタンパク質発現量を比較するには、各種液体クロマトグラフィーや質量分析計を利用して、網羅的な解析が可能である。その他にも、遺伝子の欠損（ノックダウン、あるいはノックアウト）による表現型の変化から、欠損遺伝子の機能を解析する手法（loss of function）も知られている。遺伝子の欠損には、たとえばshRNAとCRISPRを混ぜて細胞に導入する方法を利用することができる。shRNAのライブラリーを利用すれば、多様な遺伝子を網羅的に欠損させることができる。遺伝子の欠損により何らかの細胞機能が失われる、あるいは付与されることがあれば、その遺伝子の役割を知ることができる。

以上のような解析を通じて見出すことができる、特定のタンパク質に着目して、その修飾や局在を解析することも行われる。たとえば、受容体のリン酸化や脱リン酸化や、細胞内シグナリング因子のユビキチン化の変化から、細胞シグナリングの変化を明らかにできる。

[0068] 細胞塊を用いたエピゲノム解析

更に細胞や組織の中の遺伝子発現調節状態を知るには、エピゲノム解析が有用である。エピゲノム解析によって、ゲノムDNAのメチル化やヒストンの修飾を介する、遺伝子発現調節メカニズムの変化と抗がん剤耐性獲得の関連性を見出すことができる。がん細胞の幹細胞性(stemness)や分化性(differentiation)がエピゲノムの変化によって制御されている側面もあると言われている。

る。

その他にも、解糖系や酸化的リン酸化(OXPHOS)等の細胞のエネルギー代謝状態は、がん幹細胞と分化細胞で異なることが知られている。したがって、本開示の細胞塊あるいは組織のメタボロミクスの状態を解析することで、細胞のエネルギー代謝状態と、抗がん剤耐性獲得メカニズムの関係を明らかにすることができる。

[0069] 本開示によって得ることができる細胞塊は、医薬品のターゲット分子探索方法、医薬品の評価方法に使用することができる。医薬品の評価方法としては医薬品のスクリーニング方法や抗がん剤のスクリーニングなどが挙げられる。医薬品には、がん細胞が獲得した抗がん剤耐性を解除する作用を有するものや、抗がん剤耐性の獲得を阻害するものが含まれる。

[0070] ターゲット分子探索方法として、Gene-chip解析を用いたがん幹細胞で高発現するDNAやRNAなどの遺伝子（例えば、がん幹細胞のマーカー）の同定方法、プロテオミクスを用いたがん幹細胞で高発現するタンパク質、ペプチド又は代謝産物の同定方法などが挙げられるが、これらに限定されるものではない。

[0071] ターゲット分子探索のスクリーニング方法として、低分子ライブラリー、抗体ライブラリー、マイクロRNAライブラリー、RNAiライブラリーからcell growth inhibition assayでがん幹細胞の増殖を抑制する物質をスクリーニングする方法などが挙げられる。抑制する物質を取得後、標的を明らかにすることができる。

[0072] 本開示の細胞塊やその構成細胞を免疫し抗体を取得後、ELISAで結合抗体をスクリーニング、又はcell growth inhibition assayで増殖を抑制する抗体をスクリーニングすることもできる。結合抗体、機能抗体取得後、抗原を同定してターゲット分子を明らかにすることができる。

[0073] 本開示の細胞塊を用いれば、既存薬剤や開発中の薬剤を用いて細胞塊への効果を評価し、新たな薬効を見出すこともできる。

すなわち本開示は、本開示細胞塊を利用する、抗がん剤耐性のがんに対す

る治療効果を有する薬剤の同定方法、あるいはスクリーニング方法に関する。

- [0074] 本開示の方法における「被験物質」あるいは「試験薬剤」としては、特に制限はなく、例えば、天然化合物、有機化合物、無機化合物、タンパク質、抗体、ペプチド、アミノ酸等の単一化合物、並びに、化合物ライブラリー、遺伝子ライブラリーの発現産物、細胞抽出物、細胞培養上清、発酵微生物産生物、海洋生物抽出物、植物抽出物、原核細胞抽出物、真核単細胞抽出物若しくは動物細胞抽出物等を挙げることができる。これらは精製物であっても、また植物、動物又は微生物等の抽出物等のように粗精製物であってもよい。また被験物質の製造方法も特に制限されず、天然物から単離されたものであっても、化学的又は生化学的に合成されたものであっても、また遺伝子工学的に調製されたものであってもよい。
- [0075] 上記被験試料は必要に応じて適宜標識して用いることができる。標識としては、例えば、放射標識、蛍光標識等を挙げることができる。また、上記被験試料に加えて、これらの被験試料を複数種混合した混合物も含まれる。
- [0076] 本方法において、非ヒト動物モデルに対する被験物質の投与方法も特に制限されない。投与する被験物質の種類に応じて、経口投与又は皮下、静脈、局所、経皮若しくは経腸（直腸）などの非経口投与を適宜選択することができる。
- [0077] 本方法において、被験物質で細胞塊を処理する方法も特に制限されない。当該処理は、細胞塊の培養液又は該細胞抽出液に被験試料を添加することにより行うことができる。被験試料がタンパク質の場合には、例えば、該タンパク質をコードするDNAを含むベクターを、がん幹細胞集団へ導入する、又は該ベクターをがん幹細胞集団の細胞抽出液に添加することで行うことも可能である。また、例えば、酵母又は動物細胞等を用いた2ハイブリッド法を利用することも可能である。
- [0078] 具体的には、本開示は、以下のような薬剤の同定方法を提供する：
疾患に対する治療活性を有する薬剤を同定する方法であって；

- (i) 少なくとも一つの試験薬剤を選択することと；
- (ii) 本開示の細胞塊を前記試験薬剤と接触させることと；
- (iii) 前記薬剤の前記細胞塊または組織に含まれる細胞に対する細胞傷害活性を測定することを含む、方法。

好ましい態様において、本開示は、さらに付加的に、(iv)対照と比較して細胞傷害活性が大きかった試験薬剤を選択する工程を含む。

[0079] 本開示の同定方法は、以下の工程によって実施することもできる；

疾患に対する治療活性を有する薬剤を同定する方法であって、

- (i) 少なくとも一つの試験薬剤を選択することと；
- (ii) 本開示の細胞塊を前記試験薬剤と接触させることと；
- (iii) 前記薬剤の存在及び非存在下で前記細胞塊に含まれる細胞のタンパク質発現を比較することを含む、方法。

好ましい態様において、上記方法は、さらに付加的に、(iv)対照と比較してタンパク質発現が変化した試験薬剤を選択する工程を含むことができる。

[0080] また本開示は、以下の工程を含む細胞傷害活性の決定方法に関する；

薬剤の細胞傷害活性を決定する方法であって；

- (i) 試験薬剤を本開示の細胞塊に接触させる工程を含む方法。

好ましい態様において、上記方法は、さらに付加的に、(ii)対照と比較して細胞傷害作用が大きかった場合に、試験薬剤の細胞傷害作用が検出される工程を含む。

[0081] 本開示は、以下の工程を含む薬剤作用機序の同定方法に関する；

薬剤の作用機序を同定する方法であって、

- (i) 少なくとも一つの試験薬剤を選択することと；
- (ii) 本開示の細胞塊を前記試験薬剤と接触させることと；
- (iii) 前記薬剤の存在及び非存在下で前記細胞塊に含まれる細胞のタンパク質発現を比較することを含む方法。

本開示の好ましい態様において、上記方法は、さらに付加的に、(iv)対照と比較してタンパク質発現が変化した場合に、当該タンパク質を前記薬剤の

標的であると同定する工程を含むことができる。上記の同定方法において、たとえば試験薬剤が、予め本開示の細胞塊に対する細胞傷害活性が見出された薬剤であれば、その作用によって発現が変化する分子は、当該薬剤の標的分子である可能性が有る。こうして同定された分子は、薬剤耐性を獲得したがんの治療標的、あるいは薬剤耐性獲得を阻害するための標的分子として有用である。

[0082] 更に本開示は、次の同定方法に関する；

薬剤の併用組み合わせを同定する方法であって、

- (i) 第一の試験薬剤に対して治療抵抗性を有する細胞塊を提供する工程と；
- (ii) 提供された細胞塊を(i)とは異なる第二の試験薬剤と接触させる工程と；
- ；
- (iii) 第二の試験薬剤の(i)の細胞塊に含まれる細胞に対する細胞傷害活性を測定することを含む、方法。

上記方法は、好ましい態様において、さらに付加的に、(iv) 対照と比較して、細胞傷害活性が大きかった試験薬剤と第一の試験薬剤との併用組み合わせを決定する工程を含むことができる。上記方法において、工程(i)の細胞塊は本開示の細胞塊であることができる。

本開示によって提供される以上のような各スクリーニング方法において、対照(control)は、目的に応じて適宜選択することができる。一般に、対照は、治療抵抗性以外の条件ができるだけ等しい組織や細胞とするのが望ましい。各性状の評価の目的に応じて、当業者は、適切な対象を設定しうる。

[0083] 本開示を次の方法によって実施することもできる；

薬剤の併用組み合わせを同定する方法であって、

- (i) 第一の試験薬剤に対して治療抵抗性を有する細胞塊を提供する工程と；
- (ii) 提供された細胞塊を(i)とは異なる第二の試験薬剤と接触させる工程と；
- ；
- (iii) (ii)の試験薬剤の存在及び非存在下で前記細胞塊に含まれる細胞のタンパク質発現を比較することを含む、方法。

上記方法は、好ましい態様において、さらに付加的に、(iv)第二の試験薬剤の存在下と非存在下とで、タンパク質発現が異なる場合に、第一の試験薬剤と第二の試験薬剤の併用組み合わせを決定する工程を含むことができる。上記方法において、工程(i)の細胞塊として、本開示の細胞塊を用いることができる

[0084] 上記の、同定方法において、疾患は、具体的にはがんであることができる。更に具体的には、がんは、大腸がん、肺がん、乳がん、前立腺がん、すい臓がんからなる群から選択することができる。また上記工程で比較される「タンパク質発現の変化」には、タンパク質の発現プロファイルやタンパク質の発現レベルの変化が含まれる。タンパク質の発現プロファイルの変化を知ることによって、試験薬剤や、その併用組み合わせにおける、治療標的の候補を選択することができる。あるいは特定のタンパクの発現レベルの変化は、試験薬剤やその併用組み合わせによって、ある遺伝子の発現阻害をもたらされたことがわかる。そして、例えばそのタンパク質が細胞増殖シグナリングに関与する因子であれば、タンパクの発現変化によって試験薬剤や併用組み合わせのがんの治療効果を知ることができる。あるいは、がんの増殖や薬剤耐性との関与が予測されている因子であれば、その阻害によって、増殖阻害や薬剤耐性の解除等の作用を期待できる。更に、上記同定方法によって治療標的であることが決定されたタンパク質であれば、そのタンパク質を標的とする治療剤の候補として同定することができる。

一方、以上の方法を通じて同定された試験薬剤や、その併用組み合わせについて、その後、実際に臨床的に薬剤耐性がんと判定されたがん組織や、それに由来する細胞における増殖阻害効果や、耐性解除作用を評価することができる。

あるいは、試験薬剤が標的とした分子を同定した場合には、同定された標的分子の活性を調節する化合物を選択することにより、抗がん剤耐性の獲得を予防、あるいは解除する薬剤のスクリーニングが可能となる。

[0085] なお、前述する本開示のスクリーニング方法により、選抜されるヒトがん

疾患に対する予防有効物質又は治療有効物質は、必要に応じて、さらに他の薬効試験や安全性試験などを行うことにより、またさらにヒトがん疾患患者への臨床試験を行うことにより、より効果の高い、また実用性の高い予防有効物質又は治療有効物質として選別することができる。

[0086] このようにして選別される予防有効物質又は治療有効物質は、さらにその構造解析結果に基づいて、化学的合成、生化学的合成（発酵）又は遺伝子学的操作によって、工業的に製造することもできる。

なお本明細書において引用された全ての先行技術文献は、参照として本明細書に組み入れられる。

実施例

[0087] 実施例1 がん幹細胞オルガノイドの作製と評価

1-1. がん幹細胞オルガノイドの作製

PLR123細胞は既報(Stem Cells, 30, 2631-2644 (2012))に従い、stem cell medium (DMEM/F12 (Cat#11330-057)、1× Antibiotic-Antimycotic、1× N-2 Supplement、4 mg/mL AlbuMAX I Lipid-Rich BSA、20 ng/mL human EGF、20 µg/mL human insulin (以上Thermo Fisher Scientific)、2.9 mg/mL glucose (Merck)、4 µg/mL heparin (Merck)、10 ng/mL human FGF2 (リプロセル))で37℃、5%CO₂環境下にて2D培養した。

[0088] 次に、2D培養した細胞を立体(3D)培養しPLR123オルガノイドを形成させた。具体的には、2D培養した細胞をAccutase (Innovative Cell Technologies)にて処理することにより単細胞懸濁液を調製した後Matrigel (Cat#356231, Corning)で懸濁し、250細胞/50 µL Matrigel droplet/ウェルの量で24ウェルプレートに播種した。37℃でMatrigelをゲル化させた後、650 µL/ウェルのorganoid culture medium (Advanced DMEM/F12、penicillin/streptomycin、10 mM HEPES、2 mM Glutamax-I、1× B-27 Supplement、1× N-2 Supplement (以上Thermo Fisher Scientific)、1 mM N-acetylcysteine (Merck)) (Gastroenterology, 141, 1762-1772 (2011))を添加し37℃、5%CO₂環境下にて立体培養し、オルガノイドを作製した(図1)。CellTiter-Glo 3D Cell Viability A

ssay (Promega)を用いてオルガノイドの増殖を測定したところ、day7以降にオルガノイドが大きく増殖することが確認された(n=3、図2)。

[0089] 1-2. がん幹細胞オルガノイドの遺伝子発現解析

実施例1-1で作製したオルガノイドの遺伝子発現をRNA-seqにより解析した。まず、実施例1-1で2D培養した細胞および立体培養したオルガノイド(day10)から、TRIzol Reagent (Cat#15596018, Thermo Fisher Scientific)を用いてtotal RNAを調製した。精製したtotal RNAの品質については、Agilent 2100 Bioanalyzer (Agilent)を用いてRNA integrity number (RIN)を測定し、RINが9より大きいことを確認した。次に、SMART-Seq v4 Ultra Low Input RNA Kit for Sequencing (Takara Bio)を用いて1 ngのtotal RNAからcDNAを合成および増幅した。続いて、Nextera XT DNA Library Prep kit (Illumina)を用いてライブラリーを調製し、NextSeq500 system (Illumina)を用いて75 bp paired-end readsにてシーケンスを行った。得られた配列情報はRSEMソフトウェア(v1.2.31)を用いてNCBI RefSeq transcript sequenceにマッピングし、遺伝子発現量をFPKM (Fragments Per Kilobase of exon model per Million mapped reads)にて算出した。

[0090] 解析の結果、立体培養されたオルガノイド(day10)では幹細胞マーカーLGR5、CD44、PRDM14の発現が低下、分化マーカーKRT20、VIL1、FABP1、CA1、CDX1、CDX2、CDH17、GPA33の発現が増加し、細胞が分化していることが推察された(n=3、図3)。

[0091] 1-3. がん幹細胞オルガノイドの構造解析及びLGR5発現解析

実施例1-1で作製されたオルガノイドの構造を詳細に観察するために、既報(J. Toxicol. Pathol. 31, 81-85 (2018))に従って病理解析を行った。具体的には、立体培養の培養物(day 7, day10, day 12, day13)からそれぞれ培養上清を取り除いた後、4%パラホルムアルデヒド・りん酸緩衝液(Cat#09154-14, ナカライテスク)を加え、室温にて30分間固定化した。ピペッティングによりMatrigelを分解し、オルガノイドを遠沈管に回収、洗浄した。続いて加温した2%アガロース水溶液(agarose, Type IX, Cat#A5030, Merck)にオルガ

ノイドを懸濁し、遠心後、氷上で冷やすことによりアガロースをゲル化させた。これをAMeX法により処理しパラフィン包埋した。パラフィンブロックを薄切し、標準的な方法によりhematoxylin and eosin (HE)染色またはAlcian blue-Periodic acid-Schiff (AB-PAS)染色を行った。パラフィンブロックの切片に対して、さらに抗LGR5抗体（クローン2U2E-2 (Stem Cells, 30, 2631-2644 (2012))および抗Ki-67抗体（クローンMIB-1, Cat#M7240, Agilent)を用いた免疫蛍光染色を行った。LGR5についてはpolymer-horseradish peroxidase標識二次抗体(Cat#K4001, Agilent)およびAlexa Fluor 488標識tyramide (Cat#T20912, Thermo Fisher Scientific)を用いた(Acta Histochemica et Cytochemica, 48, 159-164 (2015))。その結果、オルガノイドの内部に管腔構造および粘液の貯留が確認されるとともに、立体培養day10以降、オルガノイドにおいて幹細胞マーカーLGR5の発現が低下していた(図4)。以上から、PLR12 3オルガノイドでは分化型大腸がん特有の形質が再現され、臨床大腸がんをよく反映するモデルであることが示された。

[0092] 実施例2 再増殖がん幹細胞オルガノイドの作製と評価

2-1. 再増殖がん幹細胞オルガノイドの作製

がんの化療剤耐性メカニズムについて解析するために、がん幹細胞オルガノイドを抗がん剤処理し、その後再培養を行い、再増殖オルガノイドを作製した。

[0093] 具体的に、実施例1-1で作製されたオルガノイド(day10)に7-Ethyl-10-hydroxycamptothecin (SN-38, Cat#H0165, Merck)を300 nMの濃度で添加し3日間培養した(SN-38処置)。培養後Dispase I (Cat#386-02271, 富士フイルム和光純薬)を用いてMatrigelを分解することによりオルガノイドを回収し、Cellot ion (Cat#CB051, 日本全薬工業)を用いて洗浄後、洗浄されたオルガノイドを新しいMatrigelに懸濁させ、予め20-30 μ L/ウェルのMatrigelをゲル化させた96ウェルプレートに20 μ L/ウェルずつ分注した。分注後すぐに遠心することで、オルガノイドを単一平面に揃え、顕微鏡観察しやすくした。Matrigelを37°Cでゲル化させた後、200 μ L/ウェルのorganoid culture medium (実施

例1-1)を添加し37℃、5%CO₂環境下にて再培養した。継時的に顕微鏡観察を行ったところ、再培養day2にオルガノイド表面に微細な隆起が観察され、再培養day6以降にオルガノイドの成長が見られた(図5、6)。

[0094] 2-2. 再増殖がん幹細胞オルガノイドの構造解析及びLGR5発現解析

実施例1-3と同様の方法で病理解析にて再増殖オルガノイドの構造を解析した。解析の結果、SN-38処置後にSN-38処置によりオルガノイド構造が一旦崩れ、再培養時に、生き残った細胞が起点となって新たな管腔構造が形成されることが観察された(図7)。特に再培養day2ではLGR5陽性細胞を含む小細胞塊が多く観察された(図9)。

[0095] 再増殖オルガノイドのLGR5発現をFACSで測定した。24ウェルプレートに50 μ L Matrigel droplet/ウェルでSN-38処置後のオルガノイド再懸濁液を分注し、再培養を行い、FACS用に再増殖オルガノイドを作製した。再増殖オルガノイドをDispase Iにて回収し、さらにAccutaseで処理することで単細胞懸濁液を調製した。得られた細胞を2 μ g/mLの抗LGR5抗体(クローン2L36 (Stem Cells, 30, 2631-2644 (2012)))またはコントロールマウスIgG2a抗体(クローンMG2a-53, Cat# 401502, BioLegend)と4℃にて1時間反応させた後、PE標識二次抗体(Cat#P-21139, Thermo Fisher Scientific)と4℃にて30分間反応させ、さらに7-AAD Viability Dye (Cat#A07704, Beckman Coulter)で死細胞を染色しフローサイトメーター(BD FACSAria III, BD Biosciences)で測定した。バッファーには2% fetal bovine serum、0.1% NaN₃を含むPBSを用いた。データはBD FACSDiva (version 8.0.1, BD Biosciences)およびFlowJo (version 7.6.5, BD Biosciences)を用いて解析した。SN-38処置直後のオルガノイドではLGR5発現がほぼ見られなかったのに対し、再増殖オルガノイドには一部の細胞がLGR5陽性になることが確認され、病理解析の結果が裏付けられた(図8)。

[0096] 実施例3 再増殖がん幹細胞オルガノイドにおけるGPX1/GPX2の寄与に関する解析

実施例1-1のオルガノイド(day10)および実施例2-1のSN-38処置オルガノイ

ドについて、実施例1-2と同様にRNA-seqにて遺伝子発現解析を行った(n=3)。ROS代謝関連遺伝子に着目したところ、glutathione antioxidant pathwayのGPX1とGPX2の発現がSN-38処置により2倍以上増加していた(図10)。

[0097] GPX1 (Uniprot ID:P07203、Refseq accession No. NP_000572) とGPX2 (Uniprot ID: P18283、Refseq accession No. NP_002074) のタンパク質発現をIHCで解析した。抗GPX1抗体(Cat# ab22604, Abcam, 0.5 μ g/mL)および抗GPX2抗体(Cat#ab137431, Abcam, 0.5 μ g/mL)を用い、Envision system (Cat#K4003, Agilent)およびperoxidase-diaminobezidine reactionを用いて、実施例1-1のオルガノイド(day10)、実施例2-1のSN-38処置オルガノイド、実施例2-1の再増殖オルガノイド(day2, day6)をそれぞれ染色した。IHC解析の結果、SN-38処置直後では、GPX1およびGPX2の発現が増加し、再増殖day2でも引き続き発現することが確認された(図11)。

[0098] オルガノイドの再増殖におけるGPX1とGPX2の寄与を確認するため、実施例2-1の再培養方法で、再培養時にgamma-glutamylcysteine synthetase阻害剤 L-Buthionine-sulfoximine (BSO, Cat#B2515, Merck, 200 μ M)およびthioredoxin reductase阻害剤 auranofin (AUR, Cat#A6733, Merck, 200 nM)を添加し、CellTiter-Glo 3D Cell Viability Assayにより細胞増殖を測定した(図12)。BSOはglutathione antioxidant pathway、AURはthioredoxin antioxidant pathwayをそれぞれ阻害するが、オルガノイドの再増殖は両阻害剤を併用した場合にのみ抑制された(n=4, 図13)。この結果から、オルガノイドの再増殖にはglutathione antioxidant pathwayだけでなくthioredoxin pathwayも関わっており、多様なメカニズムでROS代謝を制御していることが示唆された。

産業上の利用可能性

[0099] 今回、化学療法を施した患者のがん組織中に生じる特徴的な構造が見出された。本発明者らが見出したがん組織中の構造は、CSCの特徴的な表現型を有していた。更に本発明者らは、今回見出されたがん組織中の構造を、in vitroにおいて再構成することに成功した。すなわち本開示によって、がん患者の

中で見出された抗がん剤耐性獲得過程に見出される組織構造を、人為的に再構成することが可能となった。本開示に基づいて人為的に再構成された構造は、がんの抗がん剤耐性獲得過程で生じる組織構造の特徴を有するのみならず、遺伝子発現プロファイルをも高度に再現していた。したがって、本開示によって、がんの抗がん剤耐性獲得過程を、人為的に再構成された組織を通じて観察することが可能となる。更に、本開示によって構築される組織は、がんの抗がん剤耐性を標的とする、新たながんの治療技術の探索ツールとしても有用である。

請求の範囲

- [請求項1] 少なくとも一種類の抗がん剤より処理されたがん組織またはがん組織に類似した組織を立体培養する工程を含む、培養方法。
- [請求項2] 前記抗がん剤は、がん細胞の増殖を阻害する薬剤から選ばれる一種類または複数種類の抗がん剤である、請求項1に記載の方法。
- [請求項3] 前記立体培養工程は、前記少なくとも一種類の抗がん剤により処理されたがん組織またはがん組織に類似した組織を第一の細胞外マトリックスに接着させ、第一の培地を添加して培養する、請求項1または請求項2に記載の方法。
- [請求項4] 前記がん組織に類似した組織は、一つまたは複数のがん幹細胞を培養するプレ培養工程によって形成される、請求項1から請求項3のいずれか一項に記載の方法。
- [請求項5] 少なくとも一種類の抗がん剤より処理されたがん組織またはがん組織に類似した組織を立体培養する工程を含む、細胞塊の形成方法。
- [請求項6] 前記抗がん剤は、がん細胞の増殖を阻害する薬剤から選ばれる一種類または複数種類の抗がん剤である、請求項5に記載の方法。
- [請求項7] 前記立体培養工程は、前記少なくとも一種類の抗がん剤により処理されたがん組織またはがん組織に類似した組織を第一の細胞外マトリックスに接着させ、第一の培地を添加して培養する、請求項5または請求項6に記載の方法。
- [請求項8] 前記がん組織に類似した組織は、一つまたは複数のがん幹細胞を培養するプレ培養工程によって形成される、請求項5から請求項7のいずれか一項に記載の方法。
- [請求項9] 請求項5から請求項8のいずれか一項に記載の方法により形成された細胞塊。
- [請求項10] 前記細胞塊に含まれる細胞の少なくとも一つは、LGR5、CD44（CD44v9を含む）、CD34、CD133、Sca-1、CD24から選ばれる少なくとも一つのタンパクを発現している、請求項9に記載の細胞塊。

- [請求項11] 請求項9または請求項10に記載の細胞塊に含まれる細胞の遺伝子発現量、タンパク質発現量、タンパク質修飾、タンパク質局在、エピゲノム、またはメタボロミクス状態を分析する方法。
- [請求項12] がんに対する治療活性を有する薬剤を同定する方法であって、少なくとも一つの試験薬剤を選択することと、請求項9または請求項10に記載の細胞塊を前記試験薬剤と接触させることと、前記試験薬剤の前記細胞塊に含まれる細胞に対する細胞傷害活性を測定することを含む、方法。
- [請求項13] がんに対する治療活性を有する薬剤を同定する方法であって、少なくとも一つの試験薬剤を選択することと、請求項9または請求項10に記載の細胞塊を前記試験薬剤と接触させることと、前記薬剤の存在及び非存在下で前記細胞塊に含まれる細胞のタンパク質発現を比較することを含む、方法。
- [請求項14] 薬剤の作用機序を同定する方法であって、少なくとも一つの試験薬剤を選択することと、請求項9または請求項10に記載の細胞塊を前記試験薬剤と接触させることと、前記薬剤の存在及び非存在下で前記細胞塊に含まれる細胞のタンパク質発現を比較することを含む、方法。
- [請求項15] 抗がん剤と薬剤の併用組み合わせを同定する方法であって、特定の抗がん剤に対して耐性を有する細胞塊を提供する工程と、提供された細胞塊を試験薬剤と接触させる工程と、前記試験薬剤の前記細胞塊に含まれる細胞に対する細胞傷害活性を測定することを含む、方法。