

令和 3 年 6 月 20 日現在

機関番号：16101

研究種目：若手研究

研究期間：2019～2020

課題番号：19K18562

研究課題名(和文) PDXを用いた難治性尿路上皮癌の病態解明と開明的な薬剤耐性メカニズムの解明

研究課題名(英文) Elucidation of the pathogenesis of refractory urothelial carcinoma using PDX models

研究代表者

福原 弥生 (FUKUHARA, Yayoi)

徳島大学・大学院医歯薬学研究部(医学域)・学術研究員

研究者番号：10632490

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,200,000円

研究成果の概要(和文)：難治性尿路上皮癌の病態解明と薬剤耐性メカニズムの解明を行うために尿路上皮癌 Patient derived Xenograft(PDX)モデルの作製に取り組んだ。その中で治療抵抗性で予後不良である Histological VariantのMicropapillary-variantモデルについて中心に研究を進めた。Micropapillary-variantモデルは網羅的解析からEGFR,HER2,HER3が活性化していることが示唆された。従来の抗がん剤であるシスプラチン、ゲムシタビン、パクリタキセルに加えてEGFR阻害薬を用いたところ、EGFR阻害薬が濃度依存性に抗腫瘍効果を示した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

希少癌で難治性のHistological VariantのMicropapillary-variantモデルについて中心に研究を進めた。適切な治療モデルがないことから、独自で疾患モデルを作製し、網羅的遺伝子解析、化合物ライブラリーを用いたHTSから、治療薬候補薬となりうる化合物を数種類同定した。HTS法を通じてドラッグリポジショニングを行うことで本研究にて治療法がない症例についての患者由来の組織を培養し、より効果のある治療薬を選択した治療選択が可能となると考えている。本研究は標準治療法がない希少癌に対する新規治療法を同定するための研究手法を行ったことに関して重要な意義があると考えられる。

研究成果の概要(英文)：In order to elucidate the pathogenesis of refractory urothelial carcinoma and the mechanism of drug resistance, we have developed a patient derived Xenograft (PDX) model of urothelial carcinoma. We focused on the micropapillary-variant model of Histological Variant, which is resistant to treatment and has a poor prognosis.

In addition to conventional anticancer drugs such as cisplatin, gemcitabine, and paclitaxel, EGFR inhibitors were used in the spheroid model using 96-well plates from the PDX model, and EGFR inhibitors showed concentration-dependent antitumor effects. Oral administration of EGFR inhibitors in a micropapillary-variant PDX model showed an antitumor effect.

研究分野：尿路上皮癌

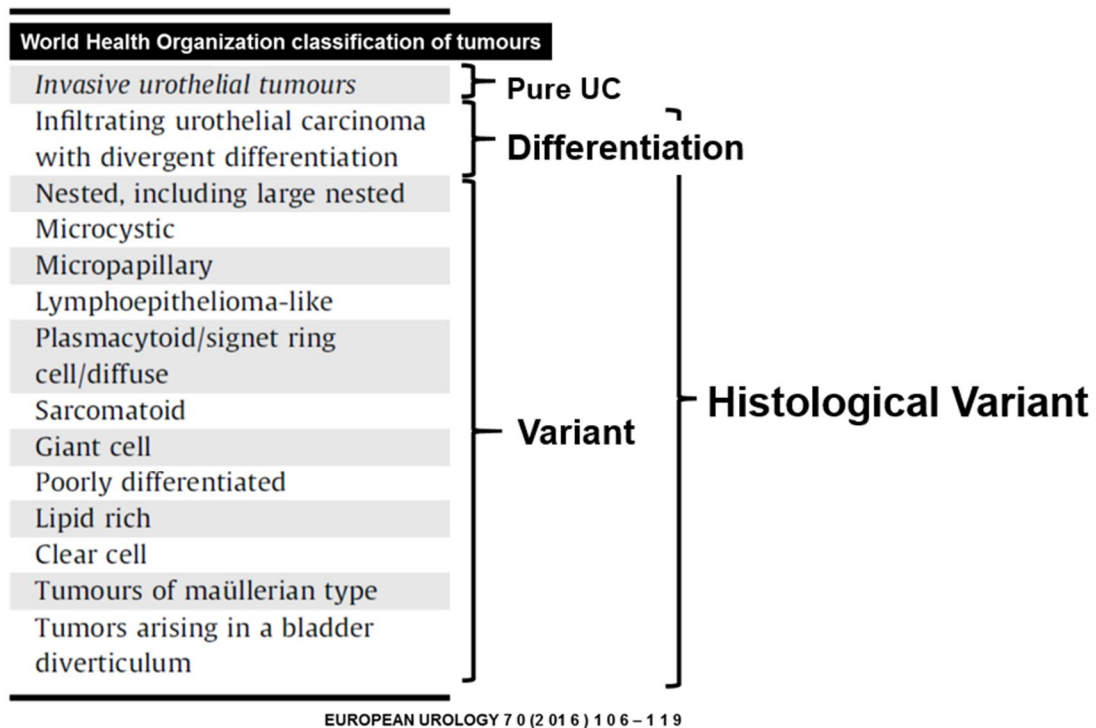
キーワード：尿路上皮癌 PDX 微小乳頭癌 薬剤スクリーニング

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

### 1. 研究開始当初の背景

転移性尿路上皮癌症例の標準治療は全身化学療法や免疫チェックポイント阻害薬による全身治療であるが、薬剤抵抗性症例が多い。尿路上皮癌の薬剤感受性について網羅的遺伝子発現解析を行っている研究(Clinical Cancer Research 11: 2625-2636 (2005))や、最近では遺伝子発現パターンによってサブタイプ分類され、Basal, luminal type、p53 like、SCC like に分類され抗がん剤感受性を予測するモデルが提唱されている(Translational Andrology and Urology, Vol 6, No 6 December 2017)。しかし薬剤抵抗性メカニズムの解明が詳細にはわかっておらず、その解明は急務である。また尿路上皮癌の病理所見と分子生物学的最新事項をまとめた WHO 分類第4版 (EUROPEAN UROLOGY 70 (2016) 106-119)で示されている浸潤性膀胱癌の組織型の亜型分類には通常の浸潤性尿路上皮癌、扁平上皮化生や腺化生、病理像が特徴的な様々な Histological Variant がある。Histologic variant を伴う膀胱癌は比較的稀である。2004年にWHOの膀胱腫瘍組織分類が改訂されてから病理医や泌尿器科医に Histological Variant が浸透してきたことや免疫組織化学染色が進歩したことから近年、増加傾向であり、病勢進行が早く予後不良であることが多い。また、HV を伴う膀胱癌は初診時に局所進行や遠隔転移を認める症例が多く、全身化学療法や BCG 膀胱内注入の有効性について不明な点も多い。そのため、Histological Variant を病理学的に診断することは予後をふまえた治療方針の決定において重要である。最近では Plasmacytoid-variant について次世代シーケンス解析を行い CDH1 の変異が約 84% であり、遊走能に関与することが報告されている(Nat Genet. 2016 Apr;48(4):356-358.)。このように病理学的所見に着目した分子細胞学的な病態解明のアプローチが行われている研究は少ない。そこで研究代表者は PDX モデルによる研究が有用であると考えた。すでに国立がんセンターでは国立研究開発法人日本医療研究開発機構 (AMED)「がん医療推進のための日本人がん患者由来 PDX ライブラリー整備事業」が 2018 年より開始されているが対象は 5 大がん (肺がん、大腸がん、乳がん、胃がん、子宮がん) や前立腺がん、膵がん等の難治性がんであり尿路上皮癌は明確には記載されていない。

## WHO分類第4版で示されている浸潤性膀胱癌の組織型の亜型



### 2. 研究の目的

PDX は患者由来の癌組織を免疫不全マウスへ移植し、患者由来の組織形態の維持が可能である。薬剤スクリーニングやバイオマーカー研究による薬剤予測など近年、非常に注目されている。本研究では尿路上皮癌を主に対象として研究を行い、浸潤性膀胱癌の組織型の亜型分類には通常の浸潤性尿路上皮癌、扁平上皮化生や腺化生、病理像が特徴的な様々な Histological Variant に着目した病態解明と薬剤抵抗性の解明を行うことが目的である。

### 3. 研究の方法

#### (1) 尿路上皮癌 PDX ライブラリーの構築

手術及び生検で得られた癌組織を免疫不全マウスへ移植する。継代時に凍結検体の保管し、再度移植することでも患者組織の維持が可能である。

#### (2) 原発組織及び PDX 組織での網羅的遺伝子発現・変異・CNV 解析

原発組織及び PDX 組織を用いて RNA や DNA を抽出する。RNA を用いて RNA シークエンス法にて網羅的遺伝子発現解析を行う。DNA を用いてエクソームシーケンス法にて遺伝子変異解析を行う。CGH アレイ法にて CNV 解析を行い、コピーナンバーについて解析する。それぞれの組織像に合わ

せた特徴を GSEA 解析及び GO 解析にてバイオインフォマティクス解析を用いて検証する。またリン酸化アレイ法を用いたリン酸化シグナルの評価を行う。

(3) 構築した PDX モデルから 3 次元培養モデルの確立

3 次元培養モデルによる増殖能、浸潤能、遊走能に関する解析を行う。

(4) 抗がん剤・分子標的薬治療による薬剤感受性評価

尿路上皮癌で現在、標準治療で用いられている抗がん剤の感受性を 3 次元培養モデルと PDX モデルで評価する。使用する抗がん剤はシスプラチン、ゲムシタピン、パクリタキセルである。さらに分子標的治療薬である EGFR 阻害薬を用いて各リン酸化シグナル抑制による抗腫瘍効果を検討する。

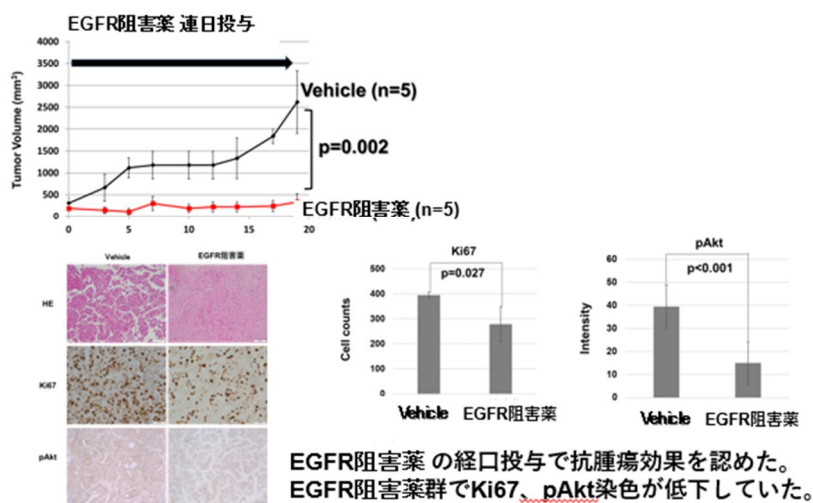
(5) 薬剤抵抗性因子や感受性因子の探索

オルガノイドモデルと PDX モデルで得られた薬剤抵抗性モデルから遺伝子変異解析と遺伝子発現解析を通じて薬剤抵抗性因子や感受性因子を探索する。GSEA 解析及び GO 解析にてバイオインフォマティクス解析を用いて検証する。最終的には浸潤性膀胱癌の組織型の亜型分類(通常の浸潤性尿路上皮癌、扁平上皮化生や腺化生、病理像が特徴的な様々な Histological Variant) についてそれぞれの遺伝子変異・発現・CNV 結果、薬剤感受性情報をまとめる。

#### 4. 研究成果

難治性尿路上皮癌の病態解明と薬剤耐性メカニズムの解明を行うために 2019 年度は尿路上皮癌の Patient derived Xenograft(PDX)モデルの作製に取り組んだ。その中で治療抵抗性で予後不良である Histological Variant の Micropapillary-variant モデルを 2 系統樹立した。その 2 系統を中心に研究を進めた。Micropapillary-variant モデルは遺伝子変異解析、リン酸化アレイ解析から EGFR,HER2,HER3 が活性化していることが示唆された。PDX モデルから 96well プレートを用いた 3 次元培養モデルで従来の抗がん剤であるシスプラチン、ゲムシタピン、パクリタキセルに加えて EGFR 阻害薬を用いたところ、EGFR 阻害薬が濃度依存性に抗腫瘍効果を示した。Micropapillary-variantPDX モデルを用いて EGFR 阻害薬経口投与を行ったところ抗腫瘍効果を認めた。

### PDXモデルでの経口投与実験



網羅的な遺伝子変異及びリン酸化解析から治療抵抗性で予後不良である Histological Variant の Micropapillary-variant モデルの有効な治療法の 1 つとして EGFR 阻害薬が期待される候補として示唆された。これらの成果は 2020 年日本がん分子標的治療学会で発表報告した。次世代シーケンス法から得られた網羅的な遺伝子変異・発現解析を通じて、2020 年度は FDA 承認されている化合物ライブラリーを用いたハイスループットスクリーニング(HTS)を行い、次世代シーケンス法の結果からバイオインフォマティクス解析の結果を通じて治療薬候補薬となりうる化合物を数種類同定した。薬剤感受性試験を行い、低濃度で抗腫瘍効果を認める化合物を同定した。さらに Patient derived Xenograft(PDX)モデルを 2 系統を用いて、in vivo での薬剤投与による抗腫瘍効果を検証し、低濃度で抗腫瘍効果を認める化合物を同定した。

本研究を通じて希少癌であり標準治療法では難治性の Histological Variant の Micropapillary-variant モデルについて中心に研究を進めた。適切な治療モデルがないことから、独自で疾患モデルを作製し、次世代シーケンス、リン酸化アレイ解析、化合物ライブラリーを用いた HTS から、治療薬候補薬となりうる化合物を数種類同定した。Micropapillary-variantPDX モデルにおける分子病態的な特徴を明らかにし、HTS 法を通じてドラッグリポジショニングを行うことで本研究にて治療法がない症例についての患者由来の組織を培養し、より効果のある治療薬を選択した治療選択が可能となると考えている。本研究は標準治療法がない希少癌に対する新規治療法を同定するための研究手法を行ったことに関して重要な意義があると考えられる。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計3件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 大豆本圭、福原弥生、尾崎啓介、津田恵、楠原義人、森英恭、布川朋也、山本恭代、山口邦久、福森知治、高橋正幸、金山博臣 上原久典
2. 発表標題 当科における患者腫瘍組織移植PDX (patient-derived xenograft)モデル作製の取り組みとMicropapillary urothelial carcinomaのPDX modelの樹立
3. 学会等名 日本泌尿器科学学会総会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 福原弥生、大豆本圭、布川朋也、上原久典、小和田実、福森知治、高橋正幸、金山博臣
2. 発表標題 淡明細胞型腎細胞癌のPDC (Patient-Derived Cell)の樹立
3. 学会等名 日本癌学会学術総会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 大豆本圭、福原弥生、上原久典、宇都義浩、小和田実、布川朋也、福森知治、高橋正幸、金山博臣
2. 発表標題 徳島大学病院におけるPDXモデルの確立と微小乳頭状尿路上皮癌における有効な治療法の開発
3. 学会等名 日本癌学会学術総会
4. 発表年 2019年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
---------------------------	-----------------------	----

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8 . 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------