

令和 3 年 6 月 24 日現在

機関番号：16101

研究種目：挑戦的研究（萌芽）

研究期間：2019～2020

課題番号：19K22689

研究課題名（和文）鶏卵を用いた次世代患者由来がんモデルの作製と薬剤スクリーニング法の確立

研究課題名（英文）Development of a next-generation patient-derived cancer model using chicken eggs and establishment of a drug screening method

研究代表者

金山 博臣（KANAYAMA, Hiroomi）

徳島大学・大学院医歯薬学研究部（医学域）・教授

研究者番号：10214446

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 5,000,000円

研究成果の概要（和文）： 癌組織の鶏卵への移植法確立、移植腫瘍の病理学的評価、鶏卵への抗がん剤の毒性試験、抗がん剤の抗腫瘍効果検討の4項目に関する実験を確立した。病理学的評価ではオリジナルの手術検体やPDX腫瘍検体のHE染色像、ヒト上皮性腫瘍マーカーのCK AE1/AE3による免疫染色像を比較した。鶏卵への移植腫瘍はオリジナル腫瘍組織の形態と非常に類似した形態を呈しており、またCK AE1/AE3が染色され、ヒト由来の癌腫瘍組織であることが確認できた。PDXマウスモデルでも薬剤感受性試験を行い、鶏卵移植モデルでの抗腫瘍効果と比較検討し、PDXマウスモデル、鶏卵移植モデルでの効果の相関を認めた。

研究成果の学術的意義や社会的意義

今後の高齢化社会にむけてがん医療の対策は非常に重要である。個別化医療による「適切な患者へ」、「適切な薬剤を」選択するパイプラインの開発は急務である。患者由来の個別化医療のモデルには患者由来検体を使用した免疫不全マウスを使用したPDXモデルの構築やバンク化が進んでいる。本研究で目指している鶏卵モデルによる薬剤スクリーニング法の確立は「コスト」、「時間」、「投薬量」の面で非常に有益である。我々が目指す検査体制は最終的にはAIを導入し、医師が手術または腫瘍生検後、10日で薬剤スクリーニング結果を報告され、AIが患者情報から適切な治療メニューを提案する医療を構築する予定である。

研究成果の概要（英文）： The following four experiments were established: (1) establishment of a method for transplanting cancerous tissues into chicken eggs, (2) pathological evaluation of transplanted tumors, (3) toxicity testing of anticancer drugs on chicken eggs, and (4) investigation of antitumor effects of anticancer drugs. In the pathological evaluation, we compared the HE stained images of the original surgical specimens and PDX tumor specimens, and the immunostained images of CK AE1/AE3, human epithelial tumor markers. Tumors transplanted into hens' eggs showed a morphology very similar to that of the original tumor tissue and were stained for CK AE1/AE3, confirming that they were human-derived cancer tumor tissue. The results showed a correlation between the effects in the PDX mouse model and the egg transplant model.

研究分野：泌尿器癌

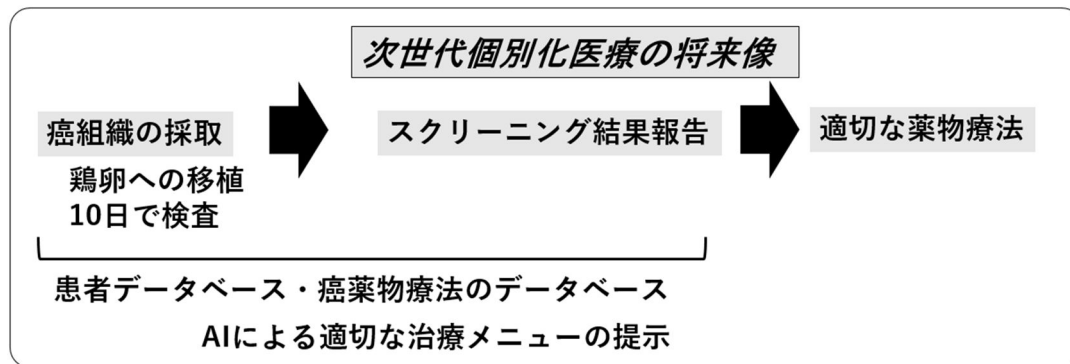
キーワード：腎細胞癌 尿路上皮癌 PDX 鶏卵

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

日本は高齢化社会を迎え、がん患者数はさらに増加していくことが予想される。転移・進行性のがん治療で行う薬物治療において患者ごとの個別化医療を行うために、より有用な薬剤スクリーニング方法を作ることには急務である。検査精度はもちろんのこと「コスト」、「簡便さ」、「検査結果の速さ」が重要である。そこで今回我々が提案する鶏卵を用いた薬剤スクリーニング法は次世代の個別化医療の中心的存在となる可能性が期待される。現在、個別化医療に向けて使用されている動物モデルは多くがマウスやラットであるが、これらは薬剤スクリーニングする上で「コストが高い」、「時間がかかる」という問題点がある。鶏卵実験は実は古くからあるモデルであるが、「低コスト(現時点で1個税込み約70円)」に加えて移植した腫瘍は鶏卵の血管を利用して安定的な増殖が得られ、患者由来の環境を維持したまま培養可能であることが報告されている。さらに経静脈的な薬剤投与が可能で薬剤スクリーニングの条件を満たしている。100化合物使用した場合で、マウス(1匹約5000円)だと約50万円のところ、鶏卵のコスト(1個税込み約70円)は約7000円とマウス1匹のコストに等しい。本研究は次世代の個別化医療の画期的な方法として期待される。

図1



2. 研究の目的

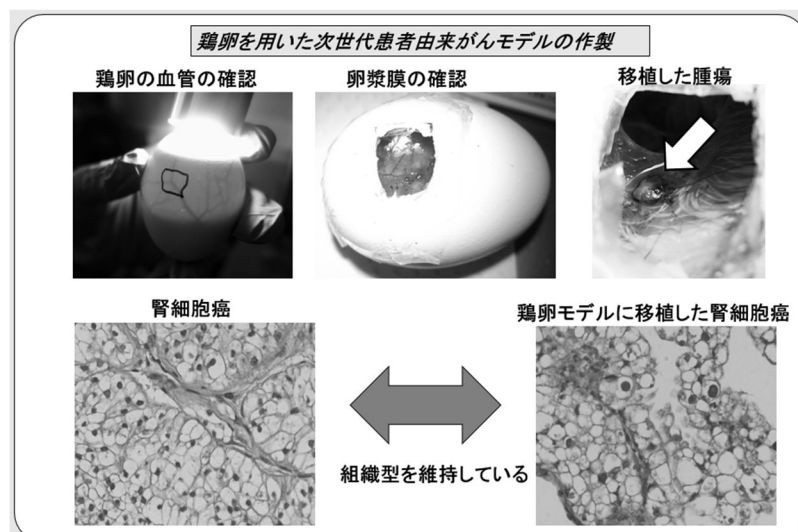
本研究の目的は患者由来組織の鶏卵モデルでの移植条件の設定および鶏卵モデルによる薬剤スクリーニング法の確立である。今後の高齢化社会にむけてがん医療の対策は非常に重要であり個別化医療による「適切な患者へ」、「適切な薬剤を」選択するパイプラインの開発は急務である。

3. 研究の方法

泌尿器系の腫瘍組織(手術検体、マウス PDX モデル継代腫瘍)を移植に用いた。発育鶏卵は湿度を保った 37.6 のインキュベータ内で培養した。移植法の検討として、血管が成熟し始める転卵開始 11 日目の発育鶏卵に対し、切片もしくはミンス状にした腫瘍組織を漿尿膜上に移植した。7 日後に腫瘍の形成を確認し、摘出後ホルマリン固定を行い、Hematoxylin Eosin (HE) 染色およびヒト上皮がん細胞を認識する Cytokeratin (CK) AE1/AE3 染色により腫瘍の構造を評価した。

薬剤感受性の評価は、尿路上皮がん治療に使用される抗がん剤である Cisplatin および Gemcitabine に感受性を持つ患者由来の腎盂がん組織を用いた。腫瘍移植した 15 日目の鶏卵に対し、Cisplatin (2.5 µg/egg), Gemcitabine (50 µg/egg), Paclitaxel (10 µg/egg) をそれぞれ静脈注射により投与した。薬剤感受性の評価は、摘出した腫瘍重量および増殖細胞マーカーである Ki-67 で染色を行い、顕微鏡で切片を撮像し、染色された細胞数のカウントで行った。

図2

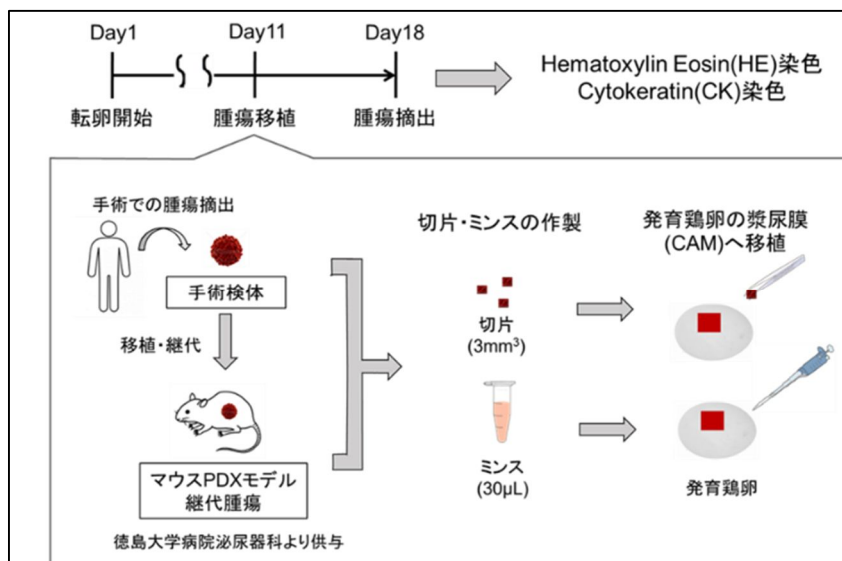


マウス PDX での実験は、免疫不全マウスの皮下に 5mm³ の腎盂がん組織を移植した。腫瘍移植後 5 日目および 12 日目に Cisplatin (5 mg/kg), Gemcitabine (100 mg/kg), Paclitaxel (20 mg/kg) をそれぞれ腹腔内投与し、15 日目にマウスを解剖して腫瘍を摘出し、Ki-67 染色を行った。

4. 研究成果

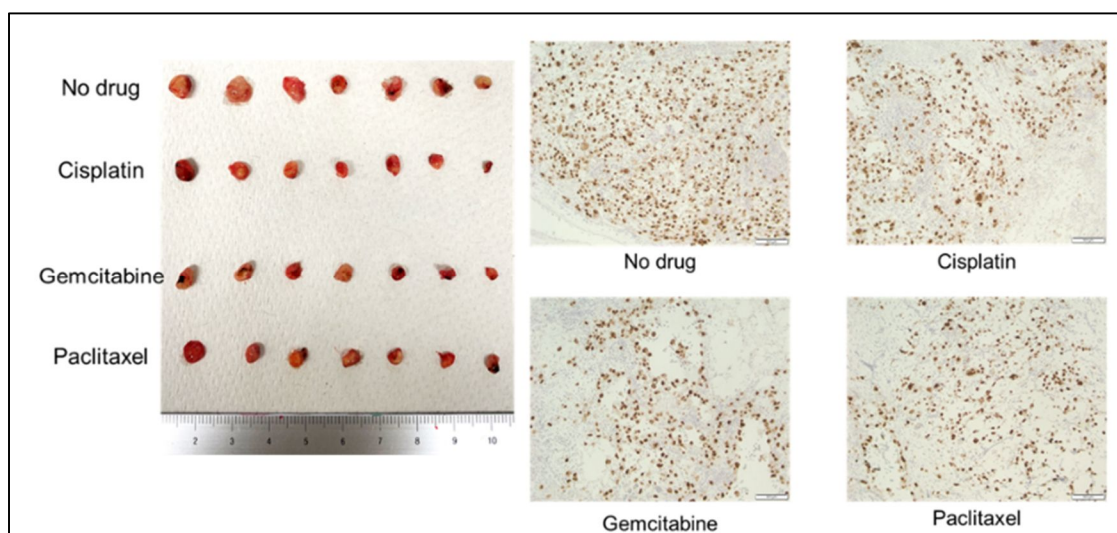
図 3

鶏卵の漿尿膜から抽出した腫瘍の HE 染色により、尿管がんや腎細胞がんの特徴的な構造が漿尿膜でも確認された。これらは CK AE1/AE3 により染色されたことから、ヒト上皮がん細胞の性質を保持していることがわかった。また、がん細胞だけでなく間質も見られた。一方、細胞株由来の腫瘍には間質が確認されないことから、この間質が患者由来であることが示された。なお、腫瘍の形成率から切片よりミンスでの移植がより適していた。



次に、薬剤投与試験では、鶏卵から抽出した腫瘍重量において Cisplatin または Gemcitabine 群で減少がみられ、Ki-67 の免疫染色では陽性細胞数が有意に減少した。一方、マウスにおいては Ki-67 の免疫染色では変化が見られなかったが、コントロールおよび Paclitaxel 群と比較して Cisplatin または Gemcitabine 群において腫瘍体積の増加が抑制された。この理由として、鶏卵では死細胞が排除されずに腫瘍内に残るために Ki-67 陽性細胞の割合が低下したのに対し、マウスではコントロールおよび Paclitaxel 群における急速な腫瘍成長に血管新生が追い付かず死細胞が増加したことで、Ki-67 陽性細胞の割合が Cisplatin または Gemcitabine 群と同程度になったためだと考えられる。よって鶏卵とマウスにおける腫瘍の増殖速度の違いが今回の結果をもたらした原因であると思われる。なお両モデルにおいて、Cisplatin または Gemcitabine に対して感受性がみられたことは臨床での結果と一致していた。

図 4



我々が目指す検査体制は最終的には AI を導入し、医師が手術または腫瘍生検後、10 日で薬剤スクリーニング結果を報告され、AI が患者情報から適切な治療メニューを提案する医療を構築する予定である。がん患者の予後延長や医療コスト削減、臨床治験への応用など今後が大いに期待され、世界の医療を大きく転換する能力をもっている。以上より、個別化医療を実践した治療開発と応用に着眼した本研究は今後も大いに期待される。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計1件（うち査読付論文 0件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 0件）

1. 著者名 大豆本圭、金山博臣、上原久典、宇都義浩	4. 巻 46
2. 論文標題 鶏卵を用いた次世代患者由来がんモデルの開発	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Medical Science Digest	6. 最初と最後の頁 59-61
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） なし	査読の有無 無
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

〔学会発表〕 計8件（うち招待講演 0件/うち国際学会 1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 植村元秀、富田善彦、三宅秀明、畠山真吾、金山博臣、沼倉一幸、高木敏男、加藤智幸、江藤正俊、小原航、植村天受、Robert J Motzer、藤井陽介、亀井陽一、大家基嗣
2. 発表標題 1st line進行腎細胞癌患者におけるavelumab+axitinibの第3相試験：日本人subgroup解析
3. 学会等名 日本癌治療学会学術集会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 立神勝則、玉田聡、中井川昇、大澤崇宏、大家基嗣、金山博臣、近藤千紘、佐々直人、西村和郎、野澤昌弘、舛森直哉、三好康秀、木村丹香子、黒田晋吾、富田善彦
2. 発表標題 日本人進行性腎細胞癌を対象としたCabozantinibの第 Ⅲ 相試験：サブグループ解析
3. 学会等名 日本癌治療学会学術集会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 布川朋也、矢野哲弘、尾崎啓介、大豆本圭、佐々木雄太郎、上野恵輝、津田恵、楠原義人、山本恭代、山口邦久、高橋正幸、金山博臣
2. 発表標題 転移性腎癌に対する転移巣切除後の臨床的検討
3. 学会等名 西日本泌尿器科学会総会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 矢野哲弘、大豆本圭、上原久典、宇山直人、佐々木雄太郎、尾崎啓介、上野恵輝、津田恵、楠原義人、布川朋也、山本恭代、山口邦久、高橋正幸、金山博臣
2. 発表標題 当院における転移・再発をきたした乳頭状腎細胞癌の検討
3. 学会等名 西日本泌尿器科学会 四国地方会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 大豆本圭、矢野哲弘、佐々木雄太郎、尾崎啓介、上野恵輝、津田恵、楠原義人、森英恭、布川朋也、山本恭代、山口邦久、高橋正幸、金山博臣、住田智志、上原久典、宇山直人
2. 発表標題 病勢コントロールが困難であった前立腺原発yolk sac tumor の1例
3. 学会等名 西日本泌尿器科学会 四国地方会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 Tomoharu Fukumori, Kei Daizumoto, Megumi Tsuda, Keisuke Ozaki, Yoshito Kusahara, Hidehisa Mori, Tomoya Fukawa, Yasuyo Yamamoto, Kunihisa Yamaguchi, Masayuki Takahashi, Hiro-omi Kanayama,
2. 発表標題 Galectin-3 is involved in the tumor progression and drug resistance induced by taxane chemotherapy and poly(adenosine diphosphate [ADP]-ribose) polymerase (PARP) inhibitor in castration-resistant prostate cancer
3. 学会等名 AUA (国際学会)
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
研究分担者	大豆本 圭 (DAIZUMOTO Kei) (10745516)	徳島大学・大学院医歯薬学研究部(医学域)・助教 (16101)	
研究分担者	宇都 義浩 (UTO Yoshihiro) (20304553)	徳島大学・大学院社会産業理工学研究部(生物資源産業学域)・教授 (16101)	
研究分担者	上原 久典 (UEHARA Hisanori) (30263809)	徳島大学・病院・教授 (16101)	

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
---------	---------