

令和 5 年 6 月 14 日現在

機関番号：24303

研究種目：基盤研究(C)（一般）

研究期間：2020～2022

課題番号：20K08187

研究課題名（和文）鶏卵漿尿膜法を利用した横紋筋肉腫組織移植3Dモデルの作成

研究課題名（英文）In ovo chorioallantoic membrane assay as a xenograft model for pediatric rhabdomyosarcoma

研究代表者

菊地 顕（Kikuchi, Ken）

京都府立医科大学・医学（系）研究科（研究院）・特任講師

研究者番号：40453104

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,300,000円

研究成果の概要（和文）：現在のがん創薬医療では、免疫不全マウスを用いた異種移植モデルの利用が中心であるが、1) 作成や管理、品質維持などにかなりの費用と時間を要する、2) 動物実験の倫理的な問題、3) 移植箇所を可視化できないなどの欠点がある。そこで、我々は血管新生性が高く、かつ免疫系の確立が不完全であるため、短時間かつ安価に腫瘍モデルが作成できるとされるニワトリの有精卵内の尿漿膜（Chorioallantoic membrane（CAM））を利用したCAM assayに着目し、CAM assayが小児がんにおけるプレシジョン医療の開発を支える新しい治療モデルになり得るかヒト横紋筋肉腫細胞株を用いて検討した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

横紋筋肉腫細胞株のCAM上における3次元的な組織構築を確認し、CAM assayのプロトコルを確立した。さらにCAM上でのVCRの横紋筋肉腫細胞株に対する抗腫瘍効果が示され、治療モデルとしても有用性であることを確認した。

個々の患者の腫瘍遺伝学的な背景に着眼した治療法の開発が未だ充分でない小児がんにおいて、CAM assayを用いた治療モデルの確立は患者特異的な分子標的薬によるプレシジョン医療の開発につながり、難治性の小児がんの新しい治療方法の開発に寄与すると期待できる。

研究成果の概要（英文）：Immunodeficient mouse-derived xenograft models have been widely used as therapeutic models in the development of precision medicine; however, these models have some limitations. The chorioallantoic membrane (CAM) assay, which uses the extraembryonic membrane of fertilized chicken eggs, has many advantages over mouse models, mainly due to high vascularization and immature immune system. In the field of pediatric cancer, including rhabdomyosarcoma (RMS), treatment strategies based on patient genetic backgrounds have not been adequately developed because of the rarity and diversity. The present study aimed to examine the feasibility of using the CAM assay as a novel therapeutic model in the development of precision medicine approaches for treating pediatric cancer.

研究分野：小児がん

キーワード：CAMアッセイ 鶏卵漿尿膜 横紋筋肉腫 小児がん

1. 研究開始当初の背景

横紋筋肉腫 (RMS) は小児で最も多い軟部肉腫で、近年の集学的治療の進歩により約 80% の長期生存が望めるようになったが、治療の合併症による性腺機能不全や恒常的な臓器機能欠損が深刻な問題となっており、副作用の少ない特異的な治療の開発が望まれている。

近年、患者の個人差を考慮し、遺伝子診断などによって得られた遺伝子情報に基づきその患者に有効と考えられる特異的で副作用の少ない治療法を設定するプレジジョン医療が積極的に議論されるようになってきた。日本でも、がん研究会にがんプレジジョン医療研究センターが設立され、がんゲノム検査に保険適用されるようになるなど進展をみせている。一方、小児がんの分野では、腫瘍遺伝的バックグラウンドの多様性から、本来プレジジョン医療の適応があると考えられるが、その希少性からいまだ十分に検討が行われているとはいえない。

がん創薬研究におけるモデルとしては、いまだゲノム情報だけでは十分ではなく、細胞株 (Cell line) を用いた *in vitro* 試験と、そこで効果を認めた細胞株系を免疫不全マウスに移植した Cell line-derived xenograft (CDX) モデルが使われている。CDX モデルの重要性は、特に固形腫瘍では 3D 構築された腫瘍組織での評価が必要だからであり、実際 *in vitro*、*in vivo* での結果が変わることはよく観察される。一方最近、がん細胞株は元のがん組織の特性が失われている可能性があること、また腫瘍、患者間での多様性、さらに異種性のためこのモデルでは抗がん剤の正確な治療効果を予測できない可能性があり、がん患者由来がん組織を直接免疫不全マウスに移植し腫瘍を再現する患者腫瘍組織移植 Patient-derived xenograft (PDX) モデルの利用が推進されている。しかし、PDX の樹立・品質保証・維持等には多額の費用が必要となり、またモデル作成に時間がかかる点からいまだ一般的な方法とはなっていない。

2. 研究の目的

本研究で用いる CAM assay (鶏卵漿尿膜法: chorioallantoic membrane assay) とは、有精卵を約 1 週間培養し、卵殻に窓をあけ、鶏の胚をとり囲んでいる CAM 上に細胞を植えつけ、その成長を観察する方法である。栄養の高い CAM の環境と免疫系がまだ完全に確立されていないことにより、非常に早く効率的に、また安価に腫瘍組織 3D 構築モデルが作成できることが報告されている。今回我々はこの CAM assay を用い、希少癌である RMS の CAM-PDX モデルを作成することを目的に以下の 3 つの実験計画を立てた。

- ・ CAM assay の確立
- ・ CAM assay を用いた抗腫瘍薬評価方法の検討
- ・ CAM assay を用いた PDX モデルの作成

3. 研究の方法

- ・ CAM assay の確立

当研究室にある様々な遺伝的バックグラウンドを持つ RMS 細胞株を用い、安定した CAM assay 手技を確立させるため、鶏卵ハンドリング方法、細胞接種方法等を検討する。また作成された腫瘍の組織学的評価を行う。

- ・ CAM assay を用いた抗腫瘍薬評価方法の検討

各種 RMS 細胞株を CAM 上に接種、実体顕微鏡を用い腫瘍サイズの継時的変化を測定する。RMS 細胞株に GFP 遺伝子を導入、安定細胞株を作成する。CAM に接種後、蛍光実体顕微鏡で GFP 蛍光強度の継時的変化を測定する。RMS 細胞株にルシフェラーゼ遺伝子を導入、安定細胞株を作成する。CAM に接種後、ルシフェラーゼ活性の継時的変化を測定する。薬剤投与後の変化を測定する。

- ・ CAM assay を用いた PDX モデルの作成

小児がん拠点病院の一つである当京都府立医科大学小児科には新規の RMS 患者が年間 5 例前後発生する。これらを用い CAM assay を用いた PDX モデルの作成法を検討する。

4. 研究成果

- ・ CAM assay の確立

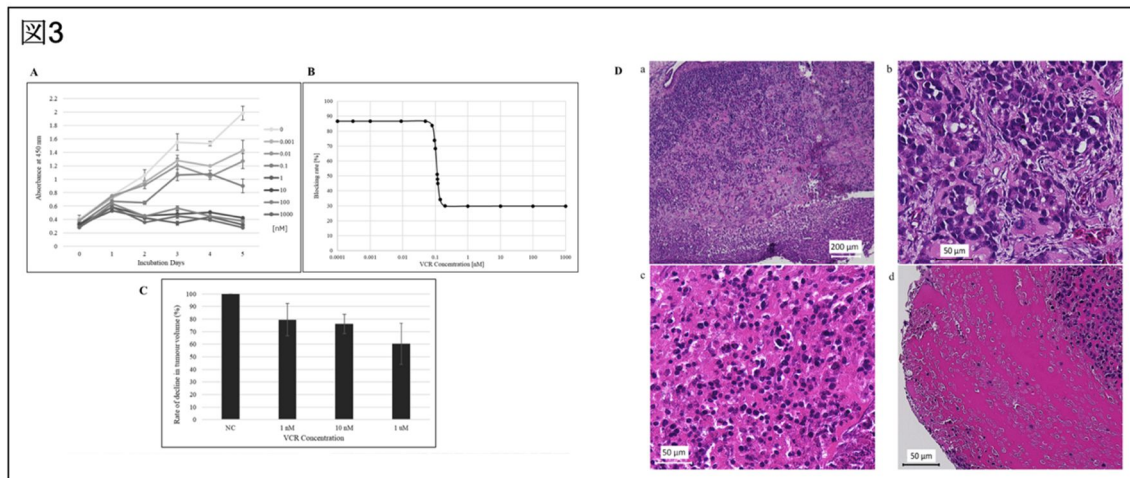
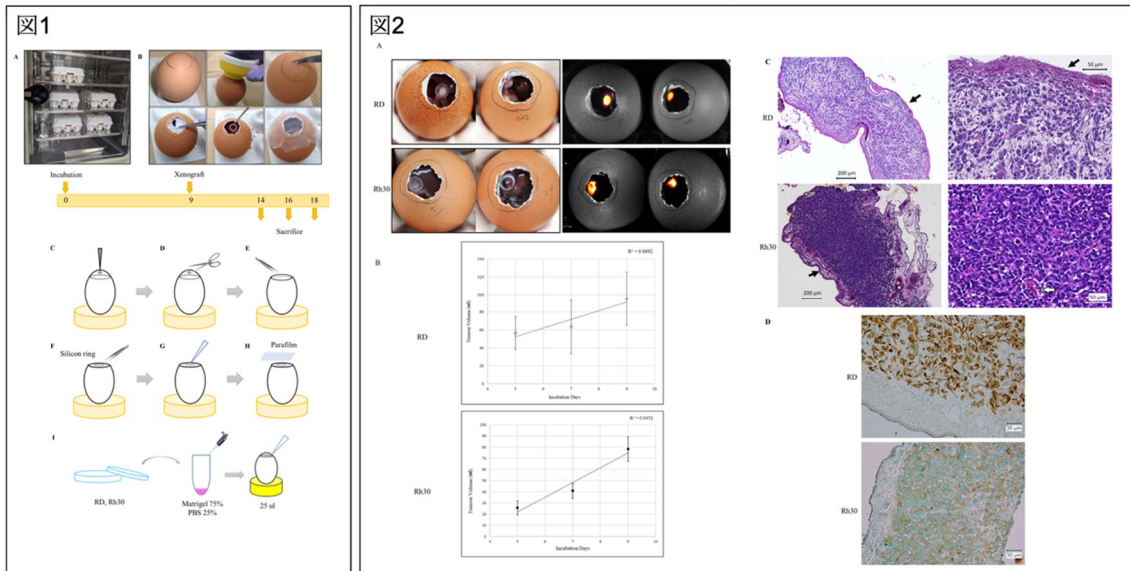
小児横紋筋肉腫細胞株を用い、CAM assay のプロトコールを作成した (図 1)。胎児型横紋筋肉腫細胞株 RD、胞葉型横紋筋肉腫細胞株 Rh30 とともに CAM 上での時系列の増殖を確認できた (図 2A、B)。次に HE 染色 (図 2C)、免疫染色 (ヒト vimentin 抗体、図 2D) による組織学的検討で三次元組織構築を確認できた。

- ・ CAM assay を用いた抗腫瘍薬評価方法の検討

横紋筋肉腫細胞株に対する *in vitro* での VCR の IC50 を確認後 (図 3A、B)、CAM 上で増殖している横紋筋肉腫細胞に対し直接 VCR を投与し、その効果を確認した。VCR 濃度依存的に抗腫瘍効果を示し (図 3C)、その効果は組織学的にも確認できた (図 3D)。この結果は CAM assay が抗腫瘍

薬評価方法として適当であることを示していると考えた。

以上の結果を論文にまとめ報告した。



5. 主な発表論文等

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

1. 著者名 Shoji Chika, Kikuchi Ken, Yoshida Hideki, Miyachi Mitsuru, Yagyu Shigeki, Tsuchiya Kunihiko, Nakaya Takaaki, Hosoi Hajime, Iehara Tomoko	4. 巻 49
2. 論文標題 <i>In?ovo</i> chorioallantoic membrane assay as a xenograft model for pediatric rhabdomyosarcoma	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 Oncology Reports	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.3892/or.2023.8513	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -

〔学会発表〕 計0件

〔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	柳生 茂希 (Yagyu Shigeki) (10572547)	京都府立医科大学・医学（系）研究科（研究院）・助教 (24303)	
研究分担者	吉田 秀樹 (Yoshida Hideki) (10643546)	京都府立医科大学・医学（系）研究科（研究院）・助教 (24303)	
研究分担者	家原 知子 (Iehara Tomoko) (20285266)	京都府立医科大学・医学（系）研究科（研究院）・教授 (24303)	

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