

令和 2 年 6 月 15 日現在

機関番号：15501

研究種目：基盤研究(B) (一般)

研究期間：2017～2019

課題番号：17H04330

研究課題名(和文) 前立腺癌3D-organoid骨微小環境モデルの開発と骨転移機序の解明

研究課題名(英文) Investigation of bone microenvironment using 3D-organoid model.

研究代表者

松山 豪泰 (MATSUYAMA, Hideyasu)

山口大学・大学院医学系研究科・教授

研究者番号：70209667

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 13,100,000円

研究成果の概要(和文)：キトサンをコートしたウェルにヒト骨髄由来間葉系幹細胞より誘導した骨芽細胞をシート状に増殖させた3D in vitroモデルを作成し、ウェル上にGFPを導入した去勢抵抗性前立腺癌株(C4-2)を播種させ、培養15日目よりアンドロゲン除去培地で各種薬剤(アパルタミド、エンザルタミド、アビラテロン、D4A、アビラテロンとデュタステリドの併用)の抗腫瘍効果を検討した。アビラテロンとデュタステリド併用群、ダロルタミド、アビラテロン、エンザルタミド、アパルタミドの順でIC50値が低値であった。また併用群とD4AとのIC50値はほぼ一致しており、併用療法の抗腫瘍効果がD4Aであることが示唆された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

開発した本モデルを用いることにより、進行性・転移性前立腺癌に対する新規薬剤の薬剤スクリーニングが可能である。また非転移性去勢抵抗性前立腺癌(mCRPC)における各種薬剤の感受性に関連する遺伝子群の解明が可能となり、新規薬剤開発にも役立つと思われる。また本モデルは特許申請をしており、産学連携のトランスレーショナルリサーチとして発展させることが期待できる。

研究成果の概要(英文)：We established a novel 3D in vitro culture, a mimicry of bone microenvironment (GFP-transferred C4-2 [CRPC cell line] onto RFP-transferred human osteoblast differentiated from human-mesenchymal stem cell in chitosan nanofiber-coated culture plate). After 15 days incubation, drug susceptibilities of enzalutamide, apalutamide, darolutamide, and abiraterone (Abi) with/without dutasteride (Duta) were evaluated under androgen deprivation condition. As for IC50 of each drug, Abi+Duta combination was the lowest, and darolutamide, Abi, enzalutamide, apalutamide was lower in order. IC50 of Abi+Duta combination was identical to that of delta-4 abiraterone, a metabolite of Abi. These data suggest colony inhibition effect of combination was attributable to delta-4 abiraterone.

研究分野：泌尿器科

キーワード：去勢抵抗性前立腺癌前立腺 骨微小環境 薬剤感受性 ARAT delta 4 abiraterone

1. 研究開始当初の背景

前立腺癌の後発転移部位は骨であり、前立腺癌死の前には約 80%に骨転移がみられる。前立腺癌の治療にはホルモン療法が有効であるが、3 - 5 年で無効となり去勢抵抗性前立腺癌と呼ばれる状態に移行する。近年アンドロゲン受容体シグナルを遮断する新規ホルモン療法剤(アパルタミド、ダロルタミド、エンザルタミド)が登場し、骨転移のない去勢抵抗性前立腺癌において転移が出現するまでの期間を延長することにより生存期間を延長させ、臨床でも使用されている。これらの機序を解明するには骨微小環境の解明が必須であるが、現在骨微小環境を反映した in vitro 骨転移モデルは存在しない。新規薬剤のスクリーニングや drug repositioning による既知薬剤の骨転移病変評価のために in vitro 骨転移モデルの開発は喫緊の課題である。われわれはマトリゲルを用いた癌幹細胞表現型である spheroid 作成や患者末梢血単核球を下層に播種した二層軟寒天培地を用いた 3 次元初代培養による薬剤感受性試験の有用性を報告してきたが、更なる改善が必要であった。しかし、最近開発された 3D オルガノイド培養法は、がん幹細胞としての性質を保持し、長期間の培養による人工的な変異導入が少ない組織用構造を形成し、原発巣や転移巣ときわめて類似した分子マーカー発現パターンと病理組織構造を有する。本研究では、研究分担者の小川が開発したマイクロ流体システムを用いて培養 6 ヶ月後でも生存可能な器官培養法に着目した。

アビラテロンは去勢抵抗性前立腺癌に有効な薬剤であるが、その代謝体であるデルタ 4 アビラテロン(以下 D4A)はさらに強い抗腫瘍活性を有すること、D4A は 5 α reductase により不活性化されることが報告されている。そこで 5 α reductase 阻害薬のデュタステリドを併用することにより、抗腫瘍効果が上昇するのではないかと臨床的仮説を立て、これを証明する in vitro モデルの開発が必要と考えた。

2. 研究の目的

本研究の目的は、マイクロ流体システムと 3D-organoid 器官培養法を応用し、in vitro 骨微小環境ニッチモデルを樹立することである。同モデルを用いて播種腫瘍細胞の骨髄ニッチ生着から転移にいたる機序を解明し、新規 AR シグナル阻害薬の骨転移に対する治療効果を検討することにより、骨微小環境下の in vitro 感受性試験の構築を目指している。また上記仮説を証明するためにアビラテロンとデュタステリドの併用効果の有無を本システムを用いて検討することである。

3. 研究の方法

三次元マトリックス構造のキトサンをコートしたウェルにヒト骨髄由来間葉系幹細胞より誘導した骨芽細胞をシート状に増殖させ、レンチウイルスを用いて GFP を導入したホルモン感受性前立腺がん継代培養株(LNCaP)、ホルモン抵抗性株(DU-145, PC-3)および去勢抵抗性前立腺癌株(C4-2)を作成後、ウェル上に播種(1x10⁶個)させ、培養 15 日目よりアンドロゲン除去培地下で各種薬剤(アパルタミド、エンザルタミド、アビラテロン、D4A、アビラテロンとデュタステリドの併用)の抗腫瘍効果(50nM)を検討した(図1)。

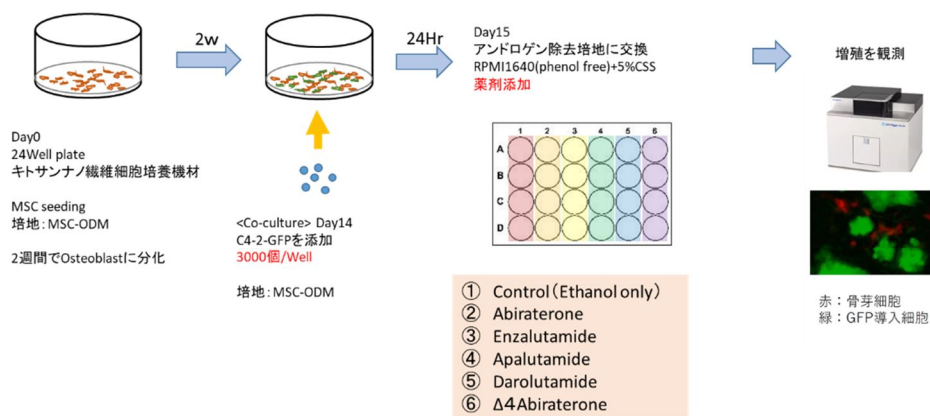


図1 骨微小環境モデルの作成法と薬物抗腫瘍効果評価

4. 研究成果

平成 29 年度は in vitro モデル作成のために、研究分担者の小川毅彦(横浜市立大)の研究室に大学院生の清水宏輔が研修に行き、器官培養モデル作成のためのノウハウを習得した。当研究室では、三次元マトリックス構造のキトサンをコートしたシャーレにヒト骨髄由来間葉系幹細胞より誘導した骨芽細胞をシート状に増殖させ、その上にスフェロイド化した前立腺がん培養細胞(LNCaP)を播種させ、増殖させることに成功した。また 3D 細胞スキャナー(Cell

iMager、本科研費にて購入)を用いたコロニー中の細胞数カウントに成功し、スフェロイドの培養を継続させつつ細胞数の増減を検討することが可能となった。

平成 30 年度は GFP を導入したホルモン感受性前立腺がん継代培養株 (LNCaP)、ホルモン抵抗性株 (DU-145, PC-3)および去勢抵抗性前立腺癌株 (C4-2)を用いて以下の実験をおこなった。GFP 導入培養細胞株は 2 レーザーシステムによる蛍光観察が可能な Cell Imager を用いて観察したところ、30 日以上にわたって持続的に増殖することを確認した (図 1 右写真)。

アパルタミド、エンザルタミドとも両細胞株に対して有意の増殖抑制効果を認めた。一方アピラテロンとデュタステリドは単剤では弱い増殖抑制効果を認めたのみであったが、併用群はアパルタミド、エンザルタミドより有意の増殖抑制効果を認めた。また併用群の培養上清に D4A の存在を確認した。

令和元年度は、去勢抵抗性前立腺癌株 (C4-2) に対する各種薬剤の IC50 を測定し、アピラテロンとデュタステリド併用群、ダロルタミド、アピラテロン、エンザルタミド、アパルタミドの順で IC50 値が低値であった (図 2)。また D4A とアピラテロンとデュタステリド併用群の IC50 値はほぼ一致しており、併用療法の抗腫瘍効果が D4A であることが示された (図 3)。

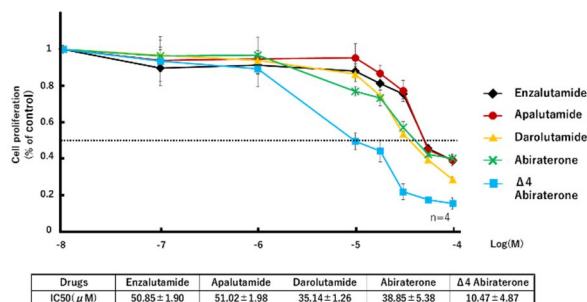


図 2 各種薬剤の薬剤感受性試験 (IC50)

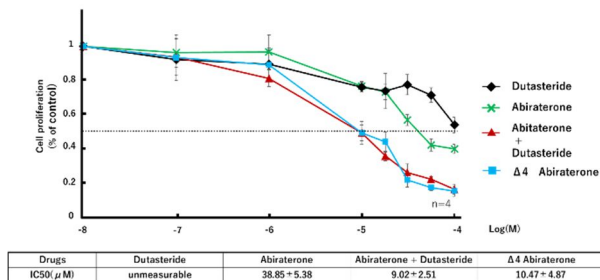


図 3 アピラテロン、デュタステリド、および併用群とデルタ 4 アピラテロンの薬剤感受性試験 (IC50)

C4-2 に PSMA (前立腺膜抗原) が高発現することを利用し、PSMA 吸着磁気ビーズを用いて本システムからの C4-2 分離に成功した (図 4)。今後分離した C4-2 を用いて遺伝子発現を比較することにより薬剤毎の感受性に関連する key molecule を解析予定である。

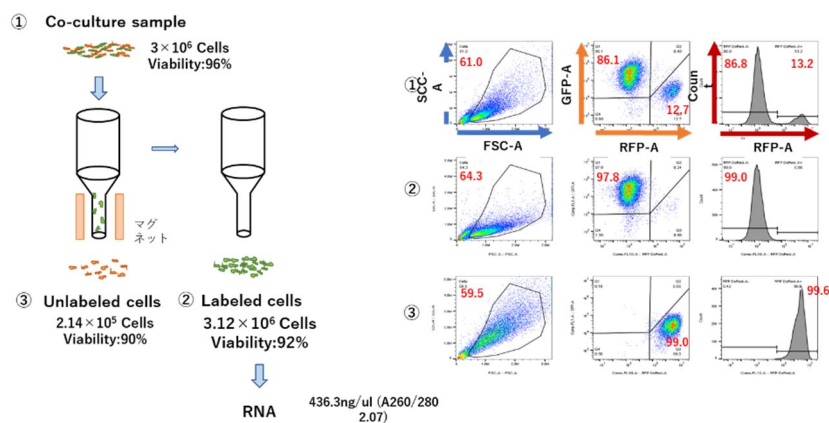


図 4 磁気ビーズ法による C4-2 の分離と FACS による確認

今後分離した C4-2 を用いて薬剤間の mRNA 発現解析を行い、感受性の違いとの関連を検討する予定である。

これらの結果は、2020 年 AACR (米国癌学会) annual meeting で演題採択され、発表 (COVID-19 感染のため Web 開催) 予定である。

上記結果を基に特許申請を行った (特願 2019-214945 (提出日:令和 1 年 11 月 28 日))。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計2件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 1件）

1. 発表者名 Masahiro Samoto, Hiroaki Matsumoto, Hiroshi Hirata, Koji Ueno, Junichi Mori, Ryo Inoue, Seiji Yano, Yoshiaki Yamamoto, Hideyasu Matsuyama
2. 発表標題 Novel bone microenvironment model of prostate cancer with chitosan fiber matrix and osteoblast in 3D culture.
3. 学会等名 AACR 2020 annual meeting (国際学会)
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 清水宏輔、松本洋明、松山豪泰ほか
2. 発表標題 前立腺癌におけるYAPの発現と役割
3. 学会等名 第106回日本泌尿器科学会総会
4. 発表年 2018年

〔図書〕 計0件

〔出願〕 計1件

産業財産権の名称 前立腺癌骨微小環境モデル、及び前立腺癌治療剤の薬効を評価する方法	発明者 佐本征弘、松山豪泰、松本洋明	権利者 山口大学
産業財産権の種類、番号 特許、特願2019-214945	出願年 2019年	国内・外国の別 国内

〔取得〕 計0件

〔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	浅岡 洋一 (ASAOKA Yoichi) (10436644)	山口大学・大学院医学系研究科・講師 (15501)	
研究分担者	清水 誠 (SEIKI Makoto) (50226619)	山口大学・大学院医学系研究科・教授 (15501)	

6. 研究組織（つづき）

	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	小川 毅彦 (OGAWA Takehiko) (50254222)	横浜市立大学・生命医科学研究科・教授 (22701)	
研究分担者	松本 洋明 (MATSUMOTO Hiroaki) (60610673)	山口大学・医学部附属病院・講師 (15501)	