

令和 3 年 6 月 24 日現在

機関番号：14501

研究種目：若手研究

研究期間：2019～2020

課題番号：19K17169

研究課題名(和文)患者個別がん幹細胞を得る免疫ヒト化・異種移植マウスモデルを用いた放射線応答の研究

研究課題名(英文)Radioresponce evaluation by using cancer stem cell in PDX mouse

研究代表者

モハメド モハメド (Mohamed, Mohamed)

神戸大学・医学研究科・外国人研究員

研究者番号：00833378

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,000,000円

研究成果の概要(和文)：放射線治療の効果を予測するシステムは確立していない。我々は患者由来のがん組織をマウスで増殖させるPatient-Derived Xenograftモデル(PDXモデル)を作製に取り組んできた。このPDX腫瘍モデルは、患者由来の新鮮な腫瘍組織を用いているため、従来のがん細胞株をヌードマウスに移植した動物モデルとは全く異なる特徴を持ち、より実臨床に近い重要な情報を検討できる。乳がんや大腸がん等の様々ながん種の患者のがん組織を超免疫不全マウス(NOD/SID/IL2rgK0マウス：NSG)に直接移植し、放射線治療の効果を判定することを試みた。

研究成果の学術的意義や社会的意義

放射線治療の効果を治療前に予測することが可能になれば、がん治療の治療選択にも役立ち、より低侵襲な治療を提供することが可能である。しかしながら現況では、組織型や文化度など、僅かな判断基準があるだけで実際には効果予測は難しい。近年登場したPDXマウスモデルは患者の組織を直接NSGマウスモデルを用いて直接再現できるため、新たな診断ツールになりえると思われる。我々は乳がんや大腸がんではそのモデルの作成に成功し、放射線効果を判定することを試みた。今後さらに多種類のがん組織を用いて、本システムが実用可能かを判定していく。

研究成果の概要(英文)：Methods to predict radiation effects remain undetermined. We engaged to establish

patient-Derived Xenograft (PDX) mouse models using patients samples. The PDX mouse model shows quite different characteristics from xenografts using nude mice, and the PDX mouse model express more similar to patients conditions. We injected breast cancer or colon cancer samples to NOD/SID/IL2rgK0 (NSG) mice. Using these models, we have challenged to evaluate radiation effects in the NSG mice models.

研究分野：放射線腫瘍学

キーワード：PDXマウス 放射線増感 がん

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

放射線治療は手術・抗がん剤に並ぶがん治療の三本柱の1つであるが、放射線抵抗性の難治性癌では従来の放射線治療のみでは治癒することが難しく、再発例や無効例が多い。放射線照射により細胞内外で活性酸素種 (Reactive Oxygen Species, ROS) が発生することで細胞死を導くが、放射線抵抗性の腫瘍では多くの場合、ROS 除去作用をもつ還元系分子が過剰発現しており、生成された ROS を消去してしまうことが難治性の原因の1つである。

がん幹細胞は放射線治療の効果を決定する重要な因子の一つであるが、患者個別のがん幹細胞を確認し、治療効果を予測するシステムは確立していない。我々はこれまで、前臨床試験モデルとして、患者由来のがん組織をマウスで増殖させる Patient-Derived Xenograft モデル (PDX モデル) を作製に成功してきた。この PDX 腫瘍モデルは、患者由来の新鮮な腫瘍組織を用いているため、従来のがん細胞株をヌードマウスに移植した動物モデルでとは全く異なる特徴を持ち、より実臨床に近い重要な情報を検討することができる。本研究では、頭頸部がん症例からの腫瘍組織を採取し、放射線感受性と、ヒトがん免疫応答を再現できる新規動物実験モデルを開発し、がん幹細胞や、その他の免疫応答に関連する新たな腫瘍抗原の探索など新規の放射線免疫療法の開発に取り組む。このモデルは、患者個別の放射線感受性、ヒトがん免疫応答の研究のみならず、放射線療法と免疫チェックポイント阻害薬の併用療法の前臨床試験などトランスレーショナルリサーチを実行可能にするものである。患者のがん組織を超免疫不全マウス (NOD/SID/IL2rgKO マウス : NSG マウス) に直接移植して継代培養する「患者由来がん異種移植マウスモデル (Patient-Derived Xenograft (PDX) mouse model)」が、広く活用されている。

2. 研究の目的

申請者はこれまで、がん幹細胞 (CSC) の研究に従事してきた。CSC は、放射線抵抗性のために癌治療の抵抗性の主要な原因と考えられ、腫瘍の再発をもたらす。癌幹細胞の自己再生特性を左右する Pten、p53 および Rb などの重要な腫瘍抑制遺伝子を欠失させると、幹様活性を上昇させる方法を確立した。さらに、前立腺癌の Primary culture システムを設計し、マイクロアレイの研究に始まり、プロスタスフェア、コロニー形成、生存率、およびシグナル伝達経路を含む細胞の特徴を詳細に研究した。

3. 研究の方法

1) 患者検体がん PDX モデルの作成 : 神戸大学倫理委員会の承認を得たプロトコールに基づき、がん手術検体を採取する。がん検体はコラゲナーゼにて処理した後、マトリゲルを加えてペーストを作成し、NSG マウスに皮下移植して PDX モデルとする。移植後に増大した腫瘍は、研究室にて摘出し、P1 (継代番号 1) として液体窒素に保存、もしくは新たに NSG マウスに再移植し (P2)、継代する。

2) 同一患者の末梢血単核球の保存 : 術前に同一患者より末梢血を採取し、単核球分離後に液体窒素にて保存する。この単核球を移植した PDX モデルに尾静脈より注入することにより、同一の患者由来の免疫提示細胞として腫瘍免疫の獲得を PDX モデル内で作成する。

3) 患者検体がん PDX モデルに対する放射線照射の効果と腫瘍内免疫細胞の解析 : 腫瘍組織の一部を免疫染色のためにパラフィンブロックを作製し、残りの腫瘍組織からは腫瘍感作された T 細胞を分離

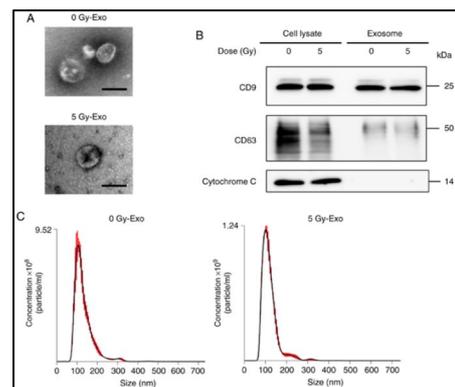
し、その分画や特徴を解析する。腫瘍特異的 T 細胞エクソソーム単離法、T 細胞の培養法、T 細胞からのエクソソーム単離法、腫瘍特異的 T 細胞の標的細胞への障害評価試験に関しては既に予備実験でその手法に関しては確立できている。また、脾臓からも T 細胞を分離し、腫瘍内の T 細胞と脾臓の T 細胞との分画を比較する。

4) PDX モデルからのがん患者のがん幹細胞分離：PDX モデルで腫瘍が 2cm 大に増殖した時点で腫瘍を摘出し、トリプシンで細胞を分離した上で、セルソーターを用いてがん幹細胞を分離する。初回の分離には既報告のある CD44v3 と ALDH1 の表面マーカーを用いて双方の高発現分画をがん幹細胞がリッチに含まれる分画として分離培養する。さらにヒアルロン酸の添加によりがん幹細胞の増殖を促進させる。

4. 研究成果

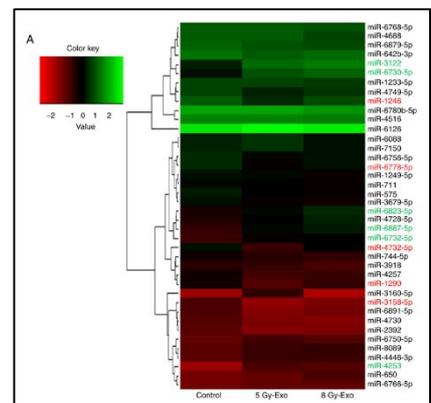
1) 腫瘍特異性エクソソームの単離

超遠心を用いた分離法と、カラムを用いた吸着法の双方の方法で、腫瘍から良好にエクソソームが単離できることを確認した。エクソソームの膜蛋白である CD9 や CD63 が発現していること、細胞質内の増運剤 Cytochrome C が単離したエクソソーム分画に含まれていないことなどから、エクソソームが良好に単離できていることを確認し、また Nanosight を用いた粒径分布から、Microvesicles 等の細胞外小嚢胞が含まれていないことを確認し得た (Nakaoka A, Mohamed M et al. Exosome-mediated radiosensitizing effect on neighboring cancer cells via increase in intracellular levels of reactive oxygen species, *Oncol Reports*, 45; 13: 2021)。



2) 腫瘍特異性エクソソーム内の放射線応答 miRNA の網羅的解析：

PDX マウスの献体を用いる為の方法論を確立するために培養細胞を用いて、その培液中からエクソソームを単離し、エクソソームに含まれる miRNAs 群に関して Microarray を用いて解析した。その結果、5 Gy と 8 Gy の照射において共に増加している miRNA が 6 個、共に減少している miRNA が 5 個検出され、TargetsCan における分子検索を実施した結果、SOD と関連する miRNA が見つかった。



3) PDX マウスの樹立：今回の研究期間では、頭頸部癌の検体採取におけるサンプルの確定、確保が困難な状況が生じたため、トリプルネガティブ乳癌の検体を用いて PDX マウスの継代の実行可能性を検証した。さいわいなことに、同サンプルは NSG マウスに良好に定着し、PDX マウスモデルを樹立するに至ったが、個体差が大きく、マウス間における腫瘍発育がまちまちであることが確認できた。今後は放射線感受性などを検証する予定であるが、同時に複数匹の PDX マウスモデルを作成するためには、いくつか条件設定を必要である。



5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計3件（うち査読付論文 3件/うち国際共著 3件/うちオープンアクセス 3件）

1. 著者名 Salah Mohammed, Osuga Saki, Nakahana Makiko, Irino Yasuhiro, Shinohara Masakazu, Shimizu Yasuyuki, Mukumoto Naritoshi, Akasaka Hiroaki, Nakaoka Ai, Miyawaki Daisuke, Ishihara Takeaki, Yoshida Kenji, Okamoto Yoshiaki, Sasaki Ryohei	4. 巻 23
2. 論文標題 Elucidation of gastrointestinal dysfunction in response to irradiation using metabolomics	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Biochemistry and Biophysics Reports	6. 最初と最後の頁 100789 ~ 100789
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.bbrep.2020.100789	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 該当する

1. 著者名 Hassan Mennaallah, Nakayama Masao, Salah Mohammed, Akasaka Hiroaki, Kubota Hikaru, Nakahana Makiko, Tagawa Tatsuichiro, Morita Kenta, Nakaoka Ai, Ishihara Takeaki, Miyawaki Daisuke, Yoshida Kenji, Nishimura Yuya, Ogino Chiaki, Sasaki Ryohei	4. 巻 10
2. 論文標題 A Comparative Assessment of Mechanisms and Effectiveness of Radiosensitization by Titanium Peroxide and Gold Nanoparticles	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Nanomaterials	6. 最初と最後の頁 1125 ~ 1125
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3390/nano10061125	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 該当する

1. 著者名 Nakaoka Ai, Nakahana Makiko, Inubushi Sachiko, Akasaka Hiroaki, Salah Mohammed, Fujita Yoshiko, Kubota Hikaru, Hassan Mennaallah, Nishikawa Ryo, Mukumoto Naritoshi, Ishihara Takeaki, Miyawaki Daisuke, Sasayama Takashi, Sasaki Ryohei	4. 巻 45
2. 論文標題 Exosome-mediated radiosensitizing effect on neighboring cancer cells via increase in intracellular levels of reactive oxygen species	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Oncology Reports	6. 最初と最後の頁 1 ~ 1
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3892/or.2021.7964	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 該当する

〔学会発表〕 計1件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 Mennaallah Alsayed, Masao Nakayama, Hiroaki Akasaka, Mohammed Salah, Makiko Nakahana, Kenta Morita, Naritoshi Mukumoto, Chiaki Ogino, Takeaki Ishihara and Ryohei Sasaki
2. 発表標題 Radiosensitization by metal nanoparticles: A comparison of titanium peroxide nanoparticles with gold nanoparticles
3. 学会等名 The 7th Japan-Taiwan Radiation Oncology Symposium
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
---------	---------