

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 30 年 6 月 7 日現在

機関番号：10101

研究種目：研究活動スタート支援

研究期間：2016～2017

課題番号：16H06601

研究課題名(和文)3次元 in vitro 転移モデルの開発

研究課題名(英文)The development of 3D in vitro metastasis model

研究代表者

大澤 崇宏(Osawa, Takahiro)

北海道大学・大学病院・助教

研究者番号：60374443

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,100,000円

研究成果の概要(和文)：本研究では、腫瘍微小環境を再現したin vitro転移モデルの開発・転移のメカニズムを解明することを目的とした。このモデルでは原発巣としてヒト前立腺がん細胞(PC3-GFP)とコラーゲンIの混合塊を原発巣ディッシュ上に静置し、転移巣としてヒト骨髄間質細胞(HS-5)とコラーゲンIの混合塊を別の転移巣ディッシュ上に静置し37℃でインキュベートして固定化し、それぞれのディッシュをPolyethyleneチューブで接続し、蠕動ポンプを用いて培地を循環させた。転移巣と見立てたディッシュには原発巣ディッシュ由来のPC3-GFPが確認され3次元 in vitro 転移モデルの最適化および確立がなされた。

研究成果の概要(英文)：Metastasis is a complex cascade that involves both intravasation and extravasation. In this study, we developed the 3D in vitro metastasis model for creating primary tumor site and metastatic sites. The primary tumor and metastatic sites were connected with a blood vessel-mimicking channel or tube and cell culture media was circulated among the sites using a peristaltic pump. Prostate carcinoma cells (PC3-GFP) were seeded into primary tumor site containing biomimetic collagen extracellular matrix within 6-well tissue culture plate. Bone stromal cells (HS-5) were seeded into metastatic site. We observed intravasation and circulation of the tumor cells and found tumor cells at the metastatic site. In summary, we have developed the 3D systems that mimic key steps of the metastatic cascade. Such systems will allow both exploration of mechanisms of metastasis and development of therapeutics.

研究分野：泌尿器科

キーワード：医療・福祉 腫瘍/転移

1. 研究開始当初の背景

がんの微小転移は、転移能を有するごくわずかながん細胞により、比較的早い時期から形成されることが知られている。近年の測定法の進歩により、末梢血循環がん細胞 (Circulating tumor cell: CTC) や骨髄遊離癌細胞 (Disseminated tumor cell: DTC) といったわずかな遊離がん細胞の高感度な検出が可能となった。中でも CTC は、がんの再発および予後予測因子としての有用性が報告されている。

このようなごくわずかな CTC は、現在の画像診断で検出することが困難であるため、細胞診に高感度な分子生物学的手法を加えて検出されているものの、ヒトの臨床検体を用いた研究には限界がある。このような中で、マウスなどの実験動物を用いた、転移メカニズムの研究は非常に有用であるが、一方で動物実験以外の方法への変更や使用動物数の削減に世界中で取り組むべきであるという動きも看過できない (国際動物実験代替法会議)。

このような問題を解決するべく、海外では Tissue Engineering 技術や Microfluidics モデルを用いて、がん細胞を医用材料で立体的に構築された 3 次元 Scaffold に播種し、がんのメカニズムを解明しようという試みが急速に進んでいる。この方法により in vitro において生体内環境を再現することが可能となりつつあるが、本邦からのこのような in vitro のがん転移モデルを用いた研究報告は殆ど見られない (Carvalho MR et al. Trends Biotechnol. 2015)。

2. 研究の目的

がん細胞の転移は、Intravasation や Extravasation など複雑な段階を経て起こることが知られている。様々な画像撮影機器やその解析により in vivo での転移研究が確立されてきたが、いまだにがん細胞の転移の背景にあるメカニズムには不明な点が多い。

本研究の目的は、腫瘍微小環境を再現した in vitro 転移モデルを開発し、転移能を持つ微量がん細胞をこのモデルから検出・採取し、転移のメカニズムを解明することを目的とする。

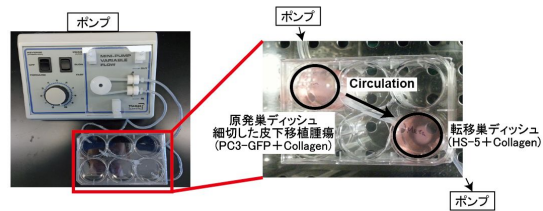
3. 研究の方法

まず、マウスの皮下移植腫瘍 (PC3-GFP) を原発巣ディッシュに用いる 3 次元 in vitro 転移モデルを最適化し、実験方法を確立させる。次に、実際のヒト腫瘍を原発巣ディッシュに用いる 3 次元 in vitro 転移モデルを実現し、よりヒトの生体内に近い腫瘍微小環境を再現する。このモデルにおいて転移のメカニズムを解明するため、転移巣ディッシュにおける微量遊離がん細胞の遺伝子発現および生物学的解析を行い、治療薬剤に対する微量遊離がん細胞への反応を評価する。

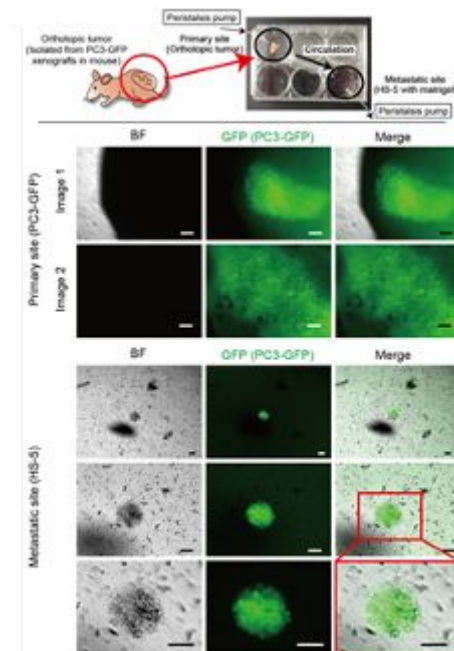
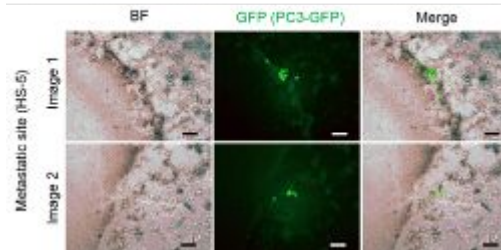
4. 研究成果

本研究では、腫瘍微小環境を再現した in vitro 転移モデルを開発し、転移のメカニズムを解明することを目的とした。この転移モデルでは、原発巣としてヒト前立腺がん細胞 (PC3-GFP) のマウス皮下移植腫瘍の細切片とコラーゲン I の混合塊を原発巣ディッシュ上に静置し、転移巣としてヒト骨髄間質細胞 (HS-5) とコラーゲン I の混合塊を、別の転移巣ディッシュ上に静置し 37 °C でインキュベートして固定化したあと、それぞれのディッシュを Polyethylene チューブで接続し、蠕動ポンプを用いて培地を循環させた。転移巣と見立てたディッシュには原発巣ディッシュ由来の PC3-GFP が確認され、3 次元 in vitro 転移モデルの最適化および確立がなされた。

3次元 Micro-fluidic 装置



転移巣ディッシュ内のHS-5を含むコラーゲン塊表面に確認された原発巣ディッシュ由来のPC3-GFP細胞



原発巣・転移巣ともにコラーゲン塊表面を血管内皮細胞による被覆 (より忠実に生体内

現象を再現)や画像イメージングの取得においてまだ不十分な点があるが、この invitro モデルの開発により(1)微量遊離がん細胞から、遺伝子発現解析(ALDH、CD133、CD44 などの幹細胞マーカー)や、(2)治療剤(アビラテロン、エンザルタミド、ドセタキセル、カバジタキセル)の効果を予測することが今後期待される。

去勢抵抗性前立腺がん患者に対して国内で保険収載されている薬物治療薬はアビラテロン、エンザルタミド、ドセタキセル、カバジタキセルと多数存在する。一方で、これらの薬剤の治療効果予測マーカーは依然として存在していないため、個々の患者の遺伝子変異型、分子生物学的特徴に基づいた個別化の医療が切に求められている。この invitro のモデルを応用することで、投与前の薬物治療の効果を予測することができるならば、患者の負担軽減につながるだけでなく、去勢抵抗性前立腺がん患者の予後の改善に大きく寄与するものと考えられる。

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

〔雑誌論文〕(計6件)

Detailed pathologic analysis on the co-occurrence of non-seminomatous germ cell tumor subtypes in matched orchiectomy and retroperitoneal lymph node dissections.

Spratt DE, Suresh K, Osawa T, Schipper M, Jackson WC, Abugharib A, Lebastchi A, Smith D, Montgomery JS, Palapattu GS, Priya Kunju L, Wu A, Lew M, Tomlins SA, Chinnaiyan AM, Weizer AZ, Hafez KS, Kaffenberger SD, Udager A, Mehra R
Medical oncology (Northwood, London, England) 35(3) 21 2018年1月 [査読有り]

Tumor Endothelial Cells with High Aldehyde Dehydrogenase Activity Show drug resistance.

Hida K, Maishi N, Akiyama K, Ohmura-Kakutani H, Torii C, Ohga N, Osawa T, Kikuchi H, Morimoto H, Morimoto M, Shindoh M, Shinohara N, Hida Y
Cancer science 2017 Nov;108(11):2195-2203 [査読有り]

Potential Implications of Shortening Length of Stay Following Radical Cystectomy in a Pre-ERAS Population.

Osawa T, Ambani SN, Olugbade K Jr, Skolarus TA, Weizer AZ, Montgomery JS, He C, Hafez KS, Hollenbeck BK, Lee CT, Montie JE,

Palapattu GS, Morgan TM
Urology 102 92-99 2017年4月 [査読有り]

Author Reply.

Osawa T, Ambani SN, Skolarus TA, Morgan TM
Urology 102 99 2017年4月 [査読有り]

Perioperative morbidity and mortality of octogenarians treated by radical cystectomy-a multi-institutional retrospective study in Japan.

Abe T, Takada N, Kikuchi H, Matsumoto R, Osawa T, Murai S, Miyajima N, Maruyama S, Shinohara N

Japanese journal of clinical oncology 1-7 2017年4月 [査読有り]

Providing prostate cancer survivorship care in Japan: Implications from the USA care model.

Osawa T, Wittmann D, Jimbo M, Keller ET, Namiki S, Abe T, Shinohara N, Skolarus TA
International journal of urology : official journal of the Japanese Urological Association 23(11) 915
2016年11月 [査読有り]

〔学会発表〕(計9件)

大澤崇宏
泌尿器癌治療 最近の話題～泌尿器癌の薬物療法
第8回 日本臨床腫瘍学会 北海道地区セミナー、2018/1/27、札幌

Takahiro Osawa MD, Stephen Robinson , Brendan Leung PhD2, Jinlu Dai PhD, Shuichi Takayama PhD, Nobuo Shinohara MD and Evan Keller DVM, PhD

MICRO- AND MACRO-FLUIDIC MODELS OF PROSTATE CANCER METASTASIS

18th Annual Meeting of the Society of Urologic Oncology Washington (11/29/2017 - 12/1/2017), Washington

大澤 崇宏、菊地央、松本隆児、宮島直人、土屋邦彦、丸山覚、安部崇重、村井祥代、篠原信雄

チェックリスト導入による TURBT の詳細な術中記録の試み

2017年日本泌尿器内視鏡学会 (2017/11/16-18) 徳島

大澤崇宏、篠原信雄

シンポジウム

前立腺癌患者の cancer survivorship と性機能 (米国での経験から)

2017年日本性機能学会 (2017/9/21-23) 東京

大澤 崇宏, 安部 崇重, 高田 徳容, 伊藤陽一, 菊地 央, 宮島 直人, 土屋 邦彦, 丸山 覚, 村井 祥代, Cheryl T. Lee, Todd M. Morgan, 篠原信雄

「日本人および米国人患者に対する膀胱全摘除術後周術期死亡予測ノモグラムの外的妥当性の検証」

2017年日本泌尿器科学会総会
(2017/4/21-24) 鹿児島

大澤 崇宏, 安部 崇重, 高田 徳容, 伊藤陽一, 菊地 央, 宮島 直人, 土屋 邦彦, 丸山 覚, Chery T. Lee, Todd M. Morgan, 村井 祥代, 篠原信雄

「日本人および米国人患者に対する膀胱全摘除術後周術期死亡予測ノモグラムの外的妥当性の検証」

第400回 北海道地方会 (2017/1/28)
札幌

大澤 崇宏, Jeffrey S. Montgomery, Alon Z. Weizer, 菊地 央, 宮島直人, 土屋邦彦, 丸山覚, 安部崇重, 篠原信雄

ロボット支援膀胱全摘除術における体腔内と体腔外回腸導管造設症例の比較～ミシガン大学泌尿器科での初期症例の検討～

2016年 泌尿器内視鏡学会 (2016/11/17-19)
大阪

Takahiro Osawa, Takashige Abe, Satoru Maruyama, Wittmann Daniela, Ted Skolarus, Hiroshi Kikuchi, Naoto Miyajima, Kunihiro Tsuchiya, Shunichi Namiki, Nobuo Shinohara

Providing prostate cancer survivorship care in Japan: implications from the US care model

第54回日本癌治療学会 (2016/10/20-22)
横浜

大澤 崇宏

Cancer Survivors in PC

第7回 Urological Expert Forum(2016/8/6)
滋賀

〔図書〕(計3件)

大澤崇宏

メディカルレビュー社

ニボルマブに関する臨床試験について
(Topics of RCC)

Year book of RCC 2016

2017年 P53-59

大澤崇宏

日本臨牀社

新腎・泌尿器癌(上) 基礎・臨床研究の進

歩

IV. 腎癌の浸潤・転移

1. 浸潤・転移機序: 概論

日本臨牀 75巻増刊号6(通巻1126号)

2017年 P59-62

大澤崇宏

日本臨牀社

「がん転移学—がん転移のメカニズムと治療戦略: その基礎と臨床—」

「 . 原発臓器別の転移性腫瘍の治療 腎細胞がん(G096)」

日本臨牀 2017年11月増刊

2017年 P231-237

〔産業財産権〕

出願状況(計 0件)

名称:

発明者:

権利者:

種類:

番号:

出願年月日:

国内外の別:

取得状況(計 0件)

名称:

発明者:

権利者:

種類:

番号:

取得年月日:

国内外の別:

〔その他〕

ホームページ等

6. 研究組織

(1) 研究代表者

大澤 崇宏 (Osawa Takahiro)
北海道大学・大学病院・助教

研究者番号: 60374443

(2) 研究分担者

なし