

令和 4 年 6 月 7 日現在

機関番号：14301

研究種目：若手研究

研究期間：2019～2021

課題番号：19K18581

研究課題名（和文）去勢抵抗性前立腺癌患者由来ゼノグラフト・オルガノイド群を用いた創薬スクリーニング

研究課題名（英文）Drug screening using xenografts and organoids derived from castration-resistant prostate cancer patients.

研究代表者

後藤 崇之（Goto, Takayuki）

京都大学・医学研究科・助教

研究者番号：90806605

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,200,000円

研究成果の概要（和文）：CRPC患者由来PDXモデルからのオルガノイド樹立：我々が作成したPDXモデルから、8系統中8系統でオルガノイド樹立に成功した。各オルガノイドからWBに十分な量の蛋白抽出は困難だったため、DNAやRNAを抽出し、各種シーケンスを行い元のPDXと型が一致するか確認中である。ドラッグスクリーニングの条件検討として樹立したオルガノイドに前立腺癌治療薬の投薬実験を行い、薬剤感受性の確認が可能であった。

CRPCオルガノイドを用いたドラッグスクリーニング：我々が作成したアンドロゲン非依存性前立腺癌細胞株AI-LINCAPとAI-VCAPを用いたが、いずれもドラッグスクリーニングには適さなかった。

研究成果の学術的意義や社会的意義

去勢抵抗性前立腺癌(CRPC)の病態は多様であり、個々の症例に応じた新規治療法や、個別治療法の開発が求められている。近年リキッドバイオプシーによる個別化医療の実践がすすめられているが、薬剤投与等の効果判定は困難である。

本研究で新たに樹立したオルガノイドモデルは、CRPCの臨床的特徴を反映した貴重な研究モデルであり、これまで臨床検体から樹立が困難であった問題点を克服しうる方法を構築した。今回はドラッグスクリーニングの実施には至らなかったが、他にもCRPCの病態研究、治療薬開発のために多様な研究に有効利用が可能であり、今後の前立腺癌研究を推進し、前立腺癌死の減少に寄与することが期待される。

研究成果の概要（英文）：(1) Organoid establishment from PDX models derived from CRPC patients: We have successfully established organoids in 8 out of 8 lines from our PDX models. Since it was difficult to extract a sufficient amount of protein from each organoid for WB, we are now extracting DNA and RNA and sequencing them to see if they match the type of the original PDX. We are now confirming the drug sensitivity of the established organoids to the drugs for prostate cancer as a condition for drug screening.

(2) Drug screening using CRPC organoids: Our two androgen-independent prostate cancer cell lines, AI-LINCAP and AI-VCAP, were not suitable for drug screening.

研究分野：前立腺癌

キーワード：去勢抵抗性前立腺癌 ゼノグラフト オルガノイド ドラッグスクリーニング

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

前立腺癌の罹患率は、高齢化社会の到来や診断技術の向上に伴い増加傾向にあり、さらにその10-20%が進行性前立腺癌であるとされる。進行性前立腺癌の標準的治療はアンドロゲン除去療法(ADT)を用いた全身治療を行うことであり、大半の癌は一旦ADTに反応するが、やがて治療抵抗性となり去勢抵抗性前立腺癌(CRPC)に進展する。CRPCでは血中アンドロゲンが減少していても、多様なメカニズムによりアンドロゲン受容体(AR)の転写活性が亢進していることが知られている(Kita, Goto Cancers 2018)。

近年ではAR経路をより強力に阻害するエンザルタミドなどのARTAが開発され臨床応用されているが、CRPCに対してARTAを投与しても短期間で治療抵抗性となることが多く、その予後は不良である。CRPCの病態自体に多様性があるためARTA耐性獲得の機序も十分解明されておらず、CRPCの多様性に合わせた新たな治療薬と患者個別治療法の開発が求められている。一方でLNCaPやPC3など既存の前立腺癌細胞株や細胞株から作成したゼノグラフト(CDX)モデルには、CRPCの臨床的特徴を十分に反映していると言えるものが依然存在せず課題となっている。

そこで我々はCRPC患者由来癌組織を免疫不全マウスに移植したPDXモデル(KUCaPシリーズ)を独自に樹立し、様々な報告をしてきた(Yoshikawa, Goto Prostate 2016 Inoue Nat Rev Urol 2017)。現在までに16系統のPDXモデルを樹立し、腫瘍増殖速度、去勢反応性、遺伝子発現プロファイルに多様性があることを確認しており、臨床でのCRPCの多様性を反映したモデルと言える。

しかしPDXは生体内環境に近い腫瘍組織を十分量、また繰り返し採取が可能であり、治療抵抗性獲得前後で採取可能であるという長所を有するが、遺伝子操作やハイスループットなドラッグスクリーニングが困難であるという欠点も有する。近年これらの問題点を解決する手段としてオルガノイドが注目されている。オルガノイドは元の腫瘍の遺伝型・表現型を忠実に反映したin vitroモデルで、標的遺伝子の強制発現やノックダウンなどの遺伝子操作やドラッグスクリーニングなどの実験手法との組合せが可能である。前立腺癌においては、臨床検体からの樹立成功率が15-20%と低いことが課題であったが、最近、前立腺癌PDXからはオルガノイドが極めて高率に樹立可能であるとの報告がなされた(Beshiri Clin Cancer Res 2018)。そこで、今回新たにPDXからの前立腺癌オルガノイドを樹立したうえでそのオルガノイドを治療薬スクリーニングに用いて、結果をPDXモデルに還元することで、難治性CRPCの多様性に対応した新規治療開発に繋がるのではないかと考えられた。

2. 研究の目的

様々なCRPC患者由来PDXモデルからオルガノイドを樹立すること

オルガノイドを用いたドラッグスクリーニングを行いCRPCの新規治療薬を開発すること、の2つを目的とした。

3. 研究の方法

オルガノイドの樹立については既報を参考に実施することとし、ドラッグスクリーニングについては当研究室で樹立した臨床のCRPCに比較的近似した細胞株を一次スクリーニングに用いて、絞られた化合物に対して様々なCRPCオルガノイドで二次スクリーニングを行い、各種用途の特性に合わせて個別化した化合物を探索する方針で研究を進めた。

4. 研究成果

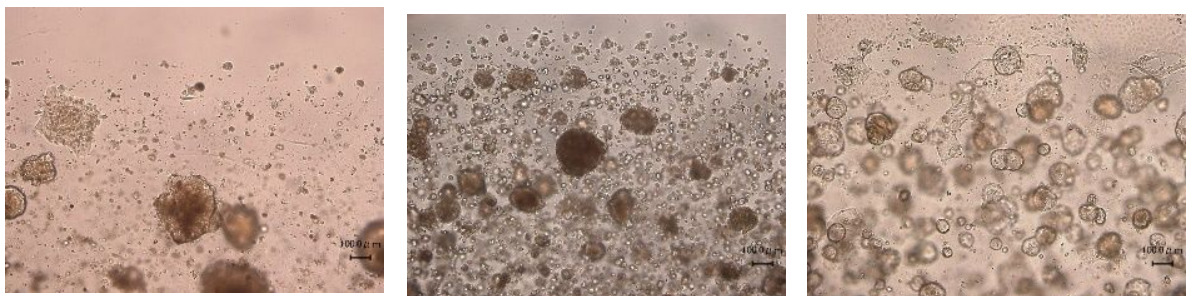
(1) 様々な CRPC 患者由来 PDX モデルからオルガノイドを樹立

既報(Drost J Nat Commun 2016, Beshiri Clin Cancer Res 2018)で既に確立したプロトコールが作成されており、これらのプロトコールにそって樹立を試みた。しかし、予想に反して樹立に難渋した。特に継代を行うことで細胞増殖能が低下するため、長期培養は困難な状況であった。そこで条件検討を重ね、一部プロトコールに改変を加えて最適化したところ、8系統中8系統でオルガノイドの樹立に成功した。(写真1、論文投稿準備中)

そして、作成した各オルガノイドの characterization を目指して、まず Western Blot (WB) による評価を試みたが、WB に十分な量の蛋白の抽出は困難であった。

そこで、次に DNA や RNA の抽出を行い、現在各種シーケンスを行い、もとの PDX と型が一致するか確認を進めている状況である。また、ドラッグスクリーニングの条件検討として樹立したオルガノイドに前立腺癌治療薬の投薬実験を行ったところ、実際に薬剤感受性が確認され、今後の投薬実験への応用が期待される結果が得られた。

(写真1 代表的な3系統のオルガノイドの写真)



CRPC オルガノイドを用いたハイスループットドラッグスクリーニング

オルガノイドを用いたドラッグスクリーニングに先立って、過去に当研究室でアンドロゲン感受性前立腺癌細胞株 LNCaP から樹立したアンドロゲン非依存性株 AI-LNCaP (Inoue Mol Endocrinol 2006)を用いて、CRPC に対する一次スクリーニングとして本学が保有する化合物ライブラリによるスクリーニングを行う方針とした。

まず、AI-LNCaP を用いた細胞実験を開始し、assay による細胞増殖ならびに薬剤投与の至適条件検討を進めたが、当初の予測に反し至適な細胞量や薬剤濃度の検討にいたらなかった。そこで、当初予定していた対応の通り、別の前立腺癌細胞株である VCaP を用いて条件検討実験を開始した。アンドロゲン除去培地を用いて VCaP 細胞株から AI-VCaP の作成には成功したものの、増殖速度が想定より遅く薬剤投与への感受性も良好でなかったことから、VCaP もドラッグスクリーニングには適していないと判断をした。

今後の展望：本研究により、臨床検体から樹立率が低いと報告されていた前立腺癌オルガノイドであるが、PDX を経由することで既報同様に樹立率が向上することがわかった。既存の細胞株では前立腺癌の多様性を反映することは困難であったが、オルガノイドを用いることで患者個別の臨床像を反映した研究が可能となることが期待される。

実例として大腸癌領域では、患者の癌検体から大腸癌オルガノイドを作成し治療反応予測を行っていることから、前立腺癌でも患者毎の異なる背景を反映した個別化医療の実践が可能となるのではないかと期待される。本研究ではまだドラッグスクリーニングの施行に至っていないが、既に投薬実験系の構築が可能であったことから、CRPC オルガノイドを直接用いて、より選別した候補薬によるドラッグスクリーニングを行うことが可能であると期待し、新たな展開を目指して準備をすすめている段階である。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計3件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 砂田 拓郎
2. 発表標題 Establishment of organoids from patients-derived xenografts of castration resistant prostate cancer.
3. 学会等名 第79回癌学会総会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 砂田 拓郎
2. 発表標題 去勢抵抗性前立腺癌移植マウスモデル由来オルガノイドの樹立
3. 学会等名 第109回日本泌尿器科学会総会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 砂田 拓郎
2. 発表標題 Establishment and application of organoids from patients-derived xenografts of castration resistant prostate cancer.
3. 学会等名 第80回癌学会総会
4. 発表年 2021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
---------	---------