

令和 4 年 6 月 9 日現在

機関番号：33920

研究種目：挑戦的研究（萌芽）

研究期間：2019～2021

課題番号：19K21599

研究課題名（和文）高齢前立腺がん患者のQOLを維持する、個別化医療を基にした新規分子標的薬の開発

研究課題名（英文）Development of novel molecular target drug based on precision medicine associated with maintaining the quality of life in elderly prostate cancer cases

研究代表者

曽我 倫久人（Soga, Norihito）

愛知医科大学・公立大学の部局等・客員研究員

研究者番号：60332714

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 4,900,000円

研究成果の概要（和文）：社会の高齢化とともに前立腺がんが急増しているが、現在は画一的な治療が行われているため医療のミスマッチによるQOLの低下が潜在している。今後急増する高齢前立腺がん患者が社会と共生するには、個別化医療に適した新規分子標的薬の開発を通じた効率的なQOLの維持・向上が社会課題でもある。このため、泌尿器がんを専門とする代表者は分担研究者（猪子誠人）らと共同し、個々人の前立腺がんの個性を体外で見つける新しいシステムとして、針生検検体からのフィーダーフリー安定細胞培養法を阻害剤を用いて確立した。これをもとに高精度のマルチオミックスDry解析とシームレスなWet細胞評価系の創出、症例の層別化を試みた。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究の成果として、（1）研究終了までにおよそ40症例の前立腺生検検体を回収・凍結保存した。その中には生検の診断基準であるグリソングレードのすべての悪性度を含むことができた。（2）また安定細胞培養のマルチオミックス解析やWet細胞解析からは、癌としてのバリデーションだけでなく、新規な分子・パスウェイ特性も示された。（3）さらに、固定サンプルでは難しいシームレスなWet検証との接続の可能性も、生細胞ゆえの細胞生物学的実験結果によって示された。これらのことから、本培養システムは、新規分子標的薬スクリーニングの層別化評価系として今後の開発と共に期待が持てると思われた。

研究成果の概要（英文）：Prostate cancer is increasing rapidly in the aging of society. Yet, there is a potential medical mismatch due to uniform treatment, that reduces the quality of life (QOL). The development of new personalized drugs is necessary for the rapidly increasing elderly prostate cancer patients to coexist with society and maintain and improve QOL efficiently.

For this reason, a representative specializing in urinary cancer (Norihito Soga) collaborated with a cell biologist (Akihito Inoko) and established a new cell culture system from a prostate biopsy by using inhibitors instead of traditional feeder cells. In fact, this system is suitable for discovering the individuality of each prostate cancer. By using this system, we attempted high-precision multi-omics “Dry” analysis, creation of a seamless “Wet” cell evaluation system, and stratification of cases.

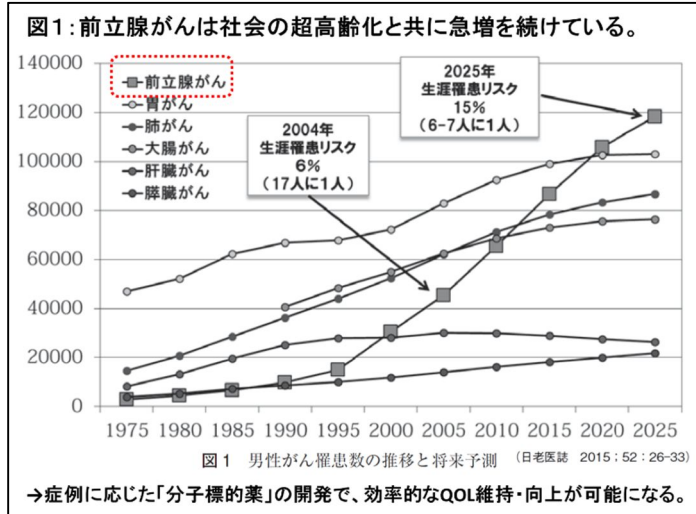
研究分野：泌尿器科学

キーワード：前立腺癌 超高齢社会 持続可能社会 がん生物学 細胞生物学 上皮幹細胞 分子標的薬 精密医療

科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属します。

1. 研究開始当初の背景

社会の高齢化とともに前立腺がんが急増している(図1)。前立腺癌は他のがん種と比較すると進展行程は緩徐とされているが、実際は個々の患者で進展形式は様々である。現在は画一的な治療が行われているため、過剰な手術や、アンドロゲン経路を標的とした薬物治療の作用によるQOLの低下が潜在している。しかしながら、今後超高齢化で急増する前立腺がん患者が社会と共生するには、効率的なQOL維持を目指した新規特効薬の開発が社会課題解決上必要である。



特に前立腺がんは、乳がんや肺がんのようなドライバー遺伝子がないため、新たに前立腺がん特有の個性や弱点となる遺伝子・タンパク質を個人レベルで発見し、それを狙ってがんを叩く「精密医療・個別化医療」を志向した「新たな分子標的薬」の開発が必要である。

2. 研究の目的

そのための新規トランスレーショナル・リサーチとして、泌尿器がんを専門とする代表者(曾我倫久人)は医系細胞生物学を専門とする分担研究者(猪子誠人)と共同研究体制を確立した。すなわち、数cm長の小さな前立腺針生検検体から安定して細胞を長期培養する方法を、複数の阻害剤を用いることでフィーダー細胞フリーにて開発した(参考文献も参照)。これを個々人の前立腺がんの個性を体外で見つける全く新しいシステムとし、高齢患者のQOL維持に最適化された個別の治療方法・治療薬を分析・選択できる方法の新規開発を目指す。これにより、生産者も高齢者も共に社会参加できる、生きがいのある新たな共生社会が見えてくる。

3. 研究の方法(図2)

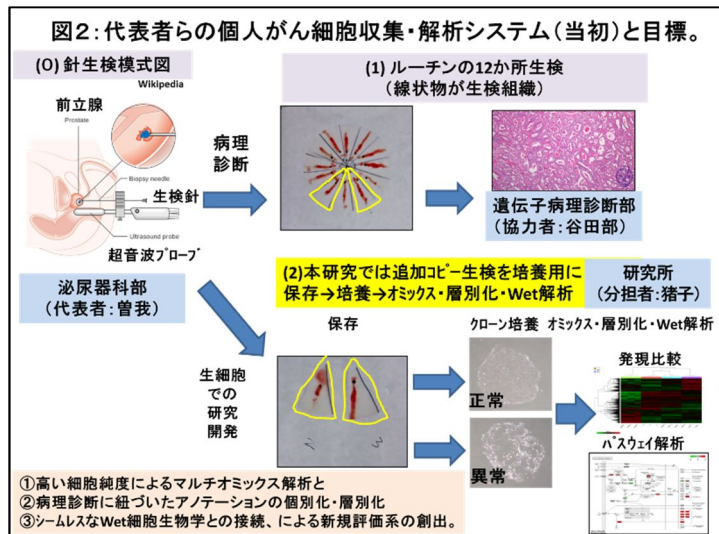
本研究体制は、当初愛知県がんセンターで患者を診療し術前生検を行う代表者(曾我)、病理診断を行う研究協力者(谷田部、他)、診療記録と紐づけされたコピー生検からがん幹細胞を取り出し詳しく解析する研究分担者(猪子)で開始された(図2)。この体制で収集した様々な個人のがん細胞を以下の方法で層別化することで、医療開発の標的分子や新規薬を個別に探索できる評価系を確立する。

- (1) 「様々な悪性度の前立腺がん幹細胞の収集・凍結保存」
- (2) 「個人レベルの細胞・蛋白質・遺伝子変異解析」
- (3) 「個別化治療・診断の基礎開発」

4. 研究成果

(1) 「様々な悪性度の前立腺がん幹細胞の収集・凍結保存」

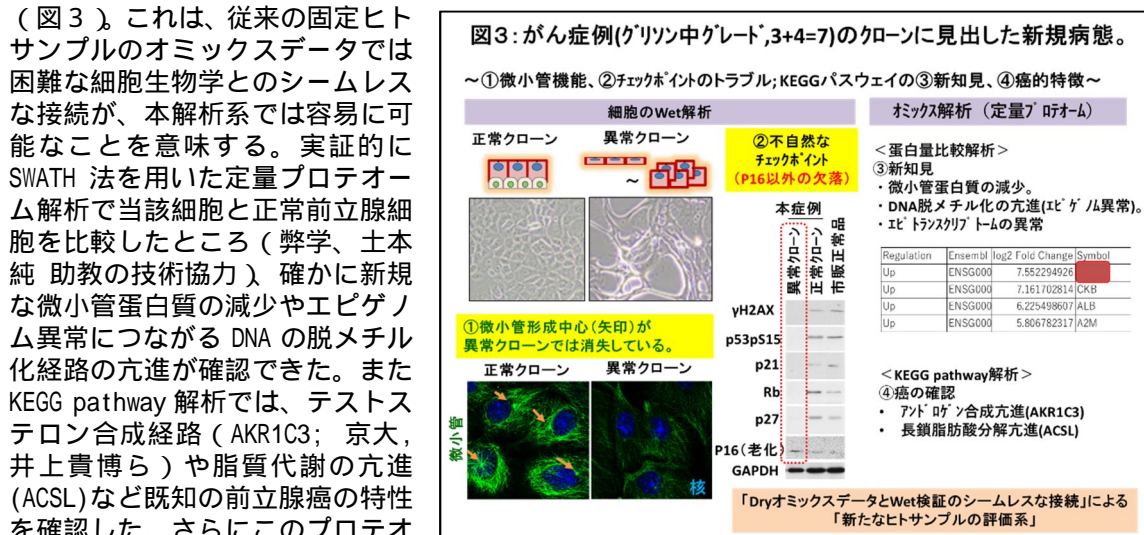
途中で多少メンバーの異動等があったが、大枠はかわらず、本課題の終了までにおよそ40症例の前立腺生検検体を回収・凍結保存した。その中には生検の診断基準であるグリソングレードのすべての悪性度を含むことができた。細胞の安定培養増幅に関しては、途中で増幅が弱まるトラブルがあったが、馴化培地の適用や化合物・成長因子による増殖シグナル・幹細胞シグナルの調整により、可及的に



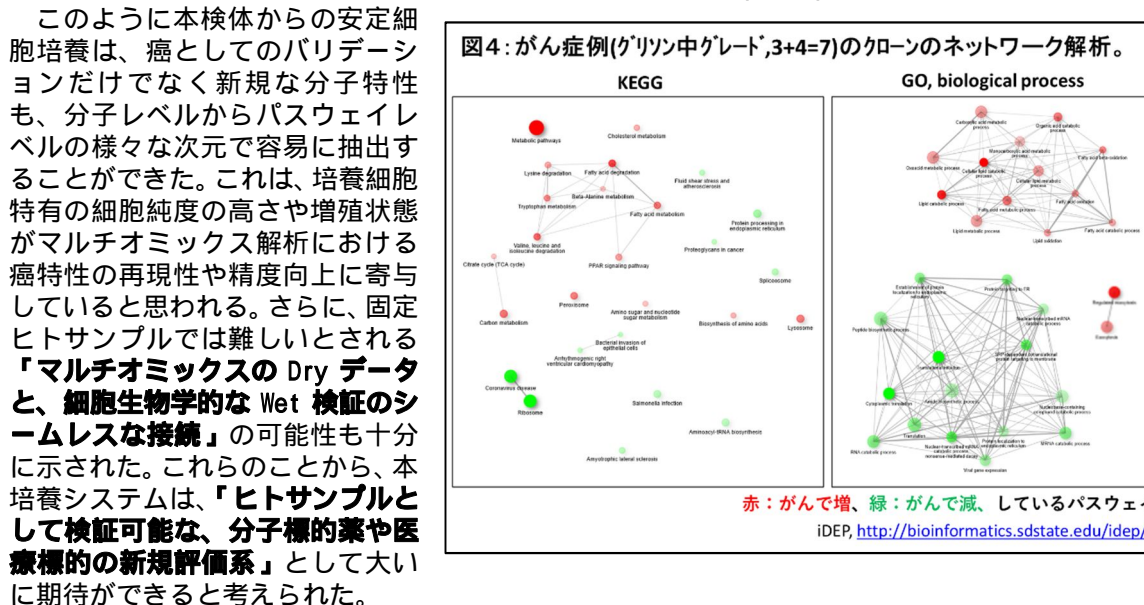
難をしのいだ。現在はマルチオミックスによるパスウェイ解析の増強により、さらに細胞毎に対応した安定培養系の最適化に取り組んでいる。

(2) 「個人レベルの細胞・蛋白質・遺伝子変異解析」(図3、図4)

このようにして取得した安定培養細胞の形態の特徴として、まず中程度以上の悪性度を示すグリソンスコア 7 以上の生検検体の培養細胞のクローンからは、明らかな変形や病理組織同様の組織構築異常を認めた(図3)。また特定のがん症例を詳細に観察したところ、正確な細胞分裂に必要な微小管の脆弱性や、おそらくエピゲノムの異常によるチェックポイントタンパク質の広範な消失などの、従来の固定サンプルでは得られない増殖細胞としての Wet データを得た(図3)。これは、従来の固定ヒトサンプルのオミックスデータでは困難な細胞生物学とのシームレスな接続が、本解析系では容易に可能なことを意味する。実証的に SWATH 法を用いた定量プロテオーム解析で当該細胞と正常前立腺細胞を比較したところ(弊学、土本純 助教の技術協力) 確かに新規な微小管蛋白質の減少やエピゲノム異常につながる DNA の脱メチル化経路の亢進が確認できた。また KEGG pathway 解析では、テストステロン合成経路 (AKR1C3; 京大、井上貴博ら) や脂質代謝の亢進 (ACSL) など既知の前立腺癌の特性を確認した。さらにこのプロテオームデータを Web ベースで二次解析すると (iDEP, <http://bioinformatics.sdstate.edu/idep/>) がん症例から得られた細胞に特徴的なパスウェイがネットワークとしても抽出でき、症例の細胞内で起こっている現象を高い次元で俯瞰することも出来た(図4)。



このように本検体からの安定細胞培養は、癌としてのバリデーションだけでなく新規な分子特性も、分子レベルからパスウェイレベルの様々な次元で容易に抽出することができた。これは、培養細胞特有の細胞純度の高さや増殖状態がマルチオミックス解析における癌特性の再現性や精度向上に寄与していると思われる。さらに、固定ヒトサンプルでは難しいとされる「マルチオミックスの Dry データと、細胞生物学的な Wet 検証のシームレスな接続」の可能性も十分に示された。これらのことから、本培養システムは、「ヒトサンプルとして検証可能な、分子標的薬や医療標的の新規評価系」として大いに期待ができると考えられた。



(3) 「個別化治療・診断の基礎開発」(図5)

現在はさらなる細胞化を進めるとともに、汎用性の高い化合物評価系としての「悪性度別・層別化前立腺癌細胞パネル」の整備を進ようと、症例を追加している。具体的には病理診断に一致する p63 陰性クローンを複数症例から取得した。またプロテオーム解析だけでなく、トランスクリプトーム解析、全ゲノム解析といったマルチオミックス解析を細胞クローンで行い、個別のアノテーションを付加しつつ層別化しているところである。
 *現在の研究承認状況は文末参照。

並行して、癌細胞の簡便な特性評価方法の基礎を開発した。まず2層分化の正常モデルとして2Dおよび3Dでの分化培養法を代表的な前立腺および乳腺幹細胞で開発した(図5)。またその発現比較解析からいくつかの新たな癌関連遺伝子への注目を得、その siRNA スクリーニングにより生物学的効果を確認した。組織種に由来する多少の差はあるものの、2層上皮分化を促す

共通の遺伝子群として、具体的にはある種のカルシウムチャネルや、ある種の Wnt、上皮以外の増殖因子を見出した。また逆に分化を阻害するすなわち幹細胞性の維持に必要な遺伝子群として、Axin2、ある種のカリウムチャネル、モノアミン代謝酵素を見出した。これらの新規なものを含む分化・未分化関連因子群は、それぞれの状態次第では細胞増殖や未分化状態を促進し、細胞を癌化に傾ける可能性があると考えられた。成果の一部は現在レビュー中である。

実際のがん症例に由来する細胞では極性や分化マーカーの異常などアンバランスな分化・未分化状態を示していた(data not shown)。詳細なプロファイリングの層別化には今後評価系の最適化やマルチオミックス解析を併用した Dry & Wet 解析の追加が必要である。

また本研究の延長として、分担者(猪子)はヒトでの検証を目的とした AMED-FORCE の研究開発(代表:池ノ内順一)に分担者として採択された。

<参考文献>

Yamamoto, Nat Commun.7:10380, 2016

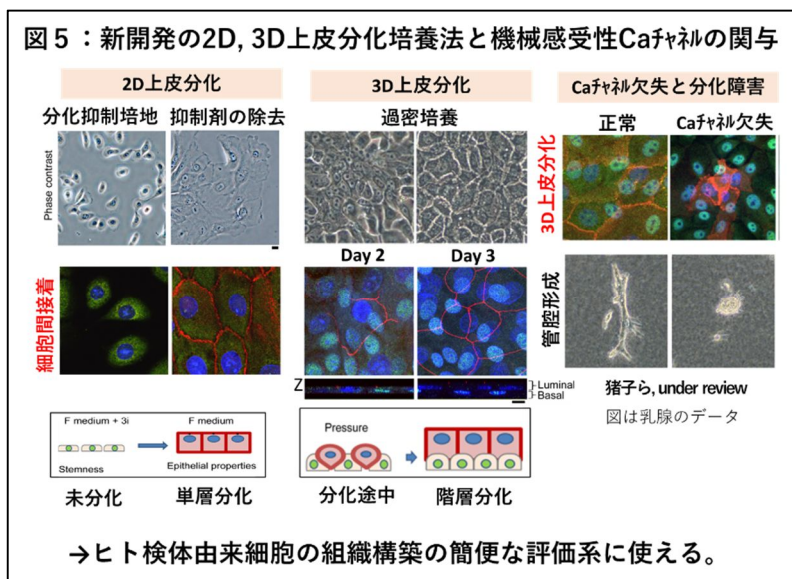
Mou, Cell Stem Cell.19:217, 2016

Liu, Nat. Protocol. 12:439, 2017

<人権の保護および法令等の遵守への対応>

・愛知県がんセンター：承認番号 2021-0-037 (最新版) 課題名「泌尿器腫瘍検体から培養した幹細胞の生物学的評価(現在の代表:泌尿器科部・部長・小島崇宏)」、(<https://cancer-c.pref.aichi.jp/uploaded/attachment/3405.pdf>; p19, p336)

・愛知医科大学での承認番号:2019-139 (代表:猪子誠人)



5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計9件（うち査読付論文 8件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 7件）

1. 著者名 Kawada Hiroshi, Sato Yozo, Inaba Yoshitaka, Yamaura Hidekazu, Kato Mina, Murata Shinichi, Hasegawa Takaaki, Ogura Yuji, Soga Norihito, Arai Yasuaki	4. 巻 43
2. 論文標題 Stenting Using the Rendezvous Technique for Postoperative Ureteral Complications in Cancer Patients	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 CardioVascular and Interventional Radiology	6. 最初と最後の頁 1486 ~ 1491
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1007/s00270-020-02546-x	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Ishihara Mikiya, Kageyama Shinichi, Miyahara Yoshihiro, Ishikawa Takeshi, Ueda Shugo, Soga Norihito, Naota Hiroaki, Mukai Katsumi, Harada Naozumi, Ikeda Hiroaki, Shiku Hiroshi	4. 巻 20
2. 論文標題 MAGE-A4, NY-ESO-1 and SAGE mRNA expression rates and co-expression relationships in solid tumours	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 BMC Cancer	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) 10.1186/s12885-020-07098-4	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 -

1. 著者名 猪子 誠人	4. 巻 87
2. 論文標題 一次線毛による細胞増殖制御機構 up to date	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 腎と透析	6. 最初と最後の頁 706-711
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) なし	査読の有無 無
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Ishihara M, Tono Y, Miyahara Y, Muraoka D, Harada N, Kageyama S, Sasaki T, Hori Y, Soga N, Uchida K, Shiraishi T, Sato E, Kanda H, Mizuno T, Webster GA, Ikeda H, Katayama N, Sugimura Y, Shiku H.	4. 巻 69
2. 論文標題 First-in-human phase I clinical trial of the NY-ESO-1 protein cancer vaccine with NOD2 and TLR9 stimulants in patients with NY-ESO-1-expressing refractory solid tumors.	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Cancer Immunol Immunother	6. 最初と最後の頁 663-675
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1007/s00262-020-02483-1.	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 -

1. 著者名 Soga N, Furusawa J, Ogura Y.	4. 巻 13
2. 論文標題 Long-Term Management of Incidental Bladder Cancer Detected in Patients Undergoing Prostatectomy for Prostate Cancer.	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Curr Urol.	6. 最初と最後の頁 145-149
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1159/000499278.	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 -

1. 著者名 Soga N, Inoko A, Furusawa J, Ogura Y.	4. 巻 13
2. 論文標題 Evaluation to Differentiate between Tumor Lesions and the Parenchyma in Partial Nephrectomies for Renal Tumors Based on Quantitative Fluorescence Imaging Using Indocyanine Green Dye.	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Curr Urol.	6. 最初と最後の頁 74-81
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1159/000499289.	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 -

1. 著者名 Soga N, Ogura Y, Wakita T, Kageyama T, Furusawa J.	4. 巻 13
2. 論文標題 The GP Score, a Simplified Formula (Bioptic Gleason Score Times Prostate Specific Antigen) as a Predictor for Biochemical Failure after Prostatectomy in Prostate Cancer.	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Curr Urol.	6. 最初と最後の頁 25-30
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1159/000499298.	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 -

1. 著者名 Furusawa J, Yamada Y, Soga N, Kuromatsu I.	4. 巻 12
2. 論文標題 Optimal Monitoring of Prostate-Specific Antigen Detects Prostate Cancer at the Localized Stage after Photoselective Vaporization for Benign Prostatic Hyperplasia.	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Curr Urol.	6. 最初と最後の頁 147-152
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1159/000489433.	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 -

1. 著者名 Tomita N, Soga N, Ogura Y, Furusawa J, Tanaka H, Koide Y, Tachibana H, Kodira T.	4. 巻 15
2. 論文標題 Favorable 10-year outcomes of image-guided intensity-modulated radiotherapy combined with long-term androgen deprivation for Japanese patients with nonmetastatic prostate cancer.	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Asia Pac J Clin Oncol.	6. 最初と最後の頁 18-25
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1111/ajco.13097.	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4件(うち招待講演 0件/うち国際学会 1件)

1. 発表者名 猪子 誠人
2. 発表標題 正常上皮分化には表層アクチンの収縮と細胞内カルシウム流入が必要である
3. 学会等名 第73回 日本細胞生物学会大会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 ○猪子 誠人, 林 裕子, 佐藤 良勝, 齋藤 大介, 池ノ内 順一, 林 良樹, 伊藤 秀明, 曾我 倫久人, 松尾 恵太郎, 笠井 謙次
2. 発表標題 in vitroでの上皮分化方法に見出した新しい遺伝子と現象
3. 学会等名 第72回 日本細胞生物学会大会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 猪子 誠人
2. 発表標題 in vitroでの上皮分化方法に見出した新しい遺伝子と現象
3. 学会等名 第19回日本再生医療学会総会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 ○Akihito Inoko, Yuko Hayashi, Yoshikatsu Sato, Norihito Soga, Keitaro Matsuo, Kenji Kasai
2. 発表標題 Novel genes and phenomena associated with epithelial differentiation in vitro
3. 学会等名 Cell Contact and Adhesion, Gordon Research Conference (国際学会)
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
研究分担者	猪子 誠人 (Inoko Akihito) (30393127)	愛知医科大学・医学部・講師 (33920)	

	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
研究協力者	谷田部 恭 (Yatabe Yasushi)	愛知県がんセンター / 国立がん研究センター・病理診断科長	
研究協力者	清野 透 (Kiyono Tohru)	国立がん研究センター・部門長	
研究協力者	小根山 千歳 (Oneyama Chitose)	愛知県がんセンター研究所・腫瘍制御学分野・分野長	

6. 研究組織（つづき）

	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
研究協力者	土本 純 (Tuchimoto Jun)	愛知医科大学・分子医科学研究所・助教	
研究協力者	小島 崇宏 (Kojima Takahiro)	愛知県がんセンター・泌尿器科部・部長	
研究協力者	小倉 友二 (Ogura Yuji)	愛知県がんセンター・泌尿器科部・医長	
研究協力者	関戸 翔 (Sekito Shou)	愛知県がんセンター・泌尿器科部	
研究協力者	古澤 淳 (Furusawa Jun)	愛知県がんセンター・泌尿器科部	

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