

令和 6 年 6 月 7 日現在

機関番号：12605

研究種目：基盤研究(B)（一般）

研究期間：2020～2023

課題番号：20H03145

研究課題名（和文）尿サンプル由来オルガノイドを用いた多角的な研究：イヌ膀胱がん克服にむけて

研究課題名（英文）Multidisciplinary research using urine-derived organoids: To overcome canine bladder cancer

研究代表者

臼井 達哉（Usui, Tatsuya）

東京農工大学・（連合）農学研究科（研究院）・准教授

研究者番号：80727652

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 13,700,000円

研究成果の概要（和文）：犬正常膀胱オルガノイド培養法を確立し、作製したオルガノイドが膀胱粘膜の組織構造を再現することや、薬剤感受性の個体差を解析可能であることを明らかにした。さらに犬膀胱癌オルガノイドとの遺伝子発現比較解析を実施し、犬膀胱癌オルガノイドにおいて上皮間葉転換経路やp53経路の活性化が示された。また、新たな培養法としてこれまでに確立した2.5Dオルガノイドを改変し、腫瘍組織から直接培養可能な2.5Dオルガノイド培養法を確立し、犬の乳腺腫瘍、血管肉腫、肺がんなど様々ながんに適応可能であることを示した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

近年、国際的に動物実験削減の取り組みが推し進められており、代替試験方法の開発、使用する実験動物数の削減はわが国においても喫緊の課題となっている。がん治療薬開発にはこれまでに、担癌マウスなど様々な疾患モデル動物が作製され、薬剤の長期投与によってどの程度病態の進行が抑制可能かを基準として進められてきた。そのため、膨大な数の動物実験が行われてきた。将来的に伴侶動物のがんオルガノイド細胞を使用して治療薬探索の基盤技術が確立されれば、実験動物の使用を最小限にして薬剤開発を行っていく社会を実現することが可能になるため本研究の社会的意義は非常に大きいといえる。

研究成果の概要（英文）：We established a method for culturing canine normal bladder organoids and showed that the organoids reproduced the tissue structure of the bladder mucosa and that individual differences in drug sensitivity could be analyzed. Furthermore, comparative analysis of gene expression in canine bladder cancer organoids showed that the epithelial-mesenchymal transition pathway and p53 pathway were activated in canine bladder cancer organoids. In addition, we established a new culture method for 2.5D organoids that can be cultured directly from tumor tissue by modifying the previously established 2.5D organoids, and showed that this method can be applied to various cancers such as canine mammary tumor, angiosarcoma, and lung cancer.

研究分野：獣医学

キーワード：オルガノイド 膀胱がん 犬 遺伝子解析

1. 研究開始当初の背景

近年、ペットフードの改善や獣医療の発展によってヒトと同様にペットの寿命が延びてきており、高齢化が進むことでがん罹患するイヌも増加している。そのなかでも膀胱がんは、悪性度が非常に高く、発症率が増加し続けている(Fulkerson et al., *Vet J.* 2015)。イヌの膀胱がん治療には、外科手術、放射線療法、非ステロイド剤および化学療法が用いられているが、ほとんどの罹患犬は治療の甲斐なく早期に死亡するため、有効な研究モデルの開発や、新規治療法および早期診断マーカーの探索が課題となっている。

オルガノイド培養法は、生体内のがん上皮構造を三次元培養したディッシュ上で再現することができ、細胞の多様性や、幹細胞性を維持できる方法としてがんの基礎および臨床研究のブレイクスルーになると考えられている。最近、膀胱がん患者組織由来オルガノイドの培養法が開発され、膀胱がん治療に対してオルガノイド培養法が活用できる可能性が示された(Suk et al., *Cell*, 2018)。しかしながら、獣医領域ではオルガノイド培養を用いた研究はコストや技術の問題もあり、ほとんど行われていなかった。

研究代表者は、膀胱がん罹患犬の検査で採取する尿サンプルに含まれる微量ながん幹細胞に着目し、がん罹患犬の尿サンプルを用いた非侵襲的な膀胱がんオルガノイドの作製に成功した(Mohamed and Usui et al., *Cancer Science*. 2019)。さらに、このオルガノイドが、生体内のがん微小環境(多様な細胞種によって構成される生体内組織環境)を高いレベルで再現できること、免疫不全マウスの体内で腫瘍を再形成すること、抗がん剤に対する患者個々の感受性試験への応用が可能であることを明らかにした

2. 研究の目的

本研究では、研究代表者が樹立した尿サンプル由来イヌ膀胱がんオルガノイドを用いて膀胱がん罹患犬の生体内で悪性を制御するメカニズムを明らかにするとともに、新規培養法や抗がん剤感受性検査法を開発し、その有用性を明らかにすることを目的とした。

3. 研究の方法

3.1. 前向き臨床研究

東京農工大学付属動物病院に来院した膀胱がん罹患犬の尿サンプルを用いてオルガノイドを作製し、罹患犬ごとのオルガノイドの形態や抗がん剤に対する感受性、治療効果との相関を解析した。

3.2. 2.5D オルガノイド培養法の確立

犬膀胱がんオルガノイドをゲルフリーかつ安価な培養液で培養可能な新規二次元培養法(2.5D オルガノイド培養法)を確立するために、最適なサプリメント成分を探索した。その後、3D オルガノイドとの薬剤感受性や in vivo での腫瘍形成能、幹細胞マーカー発現などを比較した。また、様々な腫瘍組織を用いて同定した 2.5D オルガノイド培養液の有用性を検証した。

3.3. 犬正常膀胱オルガノイドの確立

実験犬から正常膀胱オルガノイドを作製するために、カテーテル法を用いて膀胱の内壁を搔把し、膀胱の粘膜細胞を回収することで非侵襲的にオルガノイドを作製した。その後、形成したオルガノイドの病理組織学的特徴や膀胱がんオルガノイドとの比較解析

を行った。

3.4. 膀胱がん罹患犬特異的な尿中細菌叢の探索

正常犬および膀胱がん罹患犬の尿を用いて DNA を抽出し、次世代シーケンサーを用いて細菌遺伝子である 16S rRNA の解析を行った。

3.5. 膀胱がんオルガノイドを用いた新規治療法の開発

作製した複数系統のイヌ膀胱がんオルガノイドを用いて、抗腫瘍効果を示す分子標的薬と漢方サプリメント製剤の網羅的なスクリーニングを行った。

4. 研究成果

4.1. 前向き臨床研究

32 症例中 28 症例で膀胱がんオルガノイドが形成され、症例ごとに異なる形態を示すことや、Neural タイプのオルガノイドが薬剤に抵抗性を示すことが明らかになった。カルボプラチンを処置した症例では個体ごとの感受性が異なることが示された。ピンブラスチンおよびミトキサントロンの処置で高い感受性を示した個体に、それぞれの薬剤を投与したところ顕著な治療効果が認められた。

4.2. 2.5D オルガノイド培養法の確立

三次元オルガノイドから効率的に二次元培養が可能な培養液成分を同定した。作製した 2.5D オルガノイドは、培養速度が 3 次元オルガノイドより亢進したが、類似する薬剤への感受性を示した。また、マウスに移植し形成した腫瘍組織は元の腫瘍組織と類似する構造を示した。さらに、猫の乳がんや犬の肺など様々な腫瘍組織から直接 2.5D オルガノイド培養が可能であることが示された。

4.3. 犬正常膀胱オルガノイドの確立

5 頭の実験犬から、非侵襲的に正常膀胱オルガノイドの作製に成功した。作製した正常膀胱オルガノイドは、尿路上皮マーカー発現や継続的な増殖能を示し、凍結保存後も使用可能であることが分かった。さらに、膀胱がんオルガノイドとの比較遺伝子解析によって、p53 経路の活性化が膀胱の発がんに関与する可能性が示された。

4.4. 膀胱がん罹患犬特異的な尿中細菌叢の探索

正常犬 5 頭および膀胱がん罹患犬 16 頭の尿中細菌の DNA を収集し、次世代シーケンサーを用いた尿中細菌叢の解析を行ったところ、フソバクテリウム属の細菌ががん罹患犬の尿中で特異的に増加することや、がん罹患犬の尿中細菌叢では正常犬と菌の多様性が異なることが示された。

4.5. 膀胱がんオルガノイドを用いた新規治療法の開発

犬膀胱がんオルガノイドに対して MEK 阻害剤であるトラメチニブと漢方サプリメントのチャガが有効性を示すことが分かった。マウスへの長期投与によって in vivo においても抗腫瘍効果を示した。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計6件（うち査読付論文 6件/うち国際共著 5件/うちオープンアクセス 5件）

1. 著者名 Abugomaa A, Elbadawy M, Yamamoto H, Ayame, H, Ishihara, Y, Sato, Y, Yamawaki, H, Kaneda, M, Usui, T, Sasaki, K	4. 巻 87
2. 論文標題 Establishment of a direct 2.5D organoid culture model using companion animal cancer tissues	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Biomedicine & Pharmacotherapy	6. 最初と最後の頁 113597
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.biopha.2022.113597	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 Elbadawy M, Fujisaka K, Yamamoto H, Tsunedomi R, Nagano H, Ayame H, Ishihara Y, Mori T, Azakami D, Uchide T, Fukushima R, Abugomaa A, Kaneda M, Hideyuki M Yamawaki, Shinohara Y, Omatsu T, Mizutani T, Usui T, Sasaki K	4. 巻 151
2. 論文標題 Establishment of an experimental model of normal dog bladder organoid using a three-dimensional culture method	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Biomedicine & Pharmacotherapy	6. 最初と最後の頁 113105
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.biopha.2022.113105	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 Mohamed Elbadawy, Yomogi Sato, Takashi Mori, Yuta Goto, Kimika Hayashi, 1Megumi Yamanaka, 5 Daigo Azakami, Tsuyoshi Uchide, Ryuji Fukushima, Toshinori Yoshida, Makoto Shibutani, Mio Kobayashi, Yuta Shinohara, Amira Abugomaa, Masahiro Kaneda, Hideyuki Yamawaki, Tatsuya Usui, Kazuaki Sasaki	4. 巻 22
2. 論文標題 Anti-tumor effect of trametinib in bladder cancer organoid and the underlying mechanism	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Cancer Biology & therapy	6. 最初と最後の頁 357-371
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1080/15384047.2021.1919004.	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 佐藤よもぎ, Mohamed Elbadawy, 山本晴, 森正弘, 森崇, 中川貴之, 前田真吾, 野口俊助, 岩井聡美, 皆上大吾, 打出毅, 福島隆治, 篠原佑太, 白井達哉, 佐々木一昭	4. 巻 14
2. 論文標題 尿サンプル由来イヌ移行上皮癌オルガノイド培養法を用いた 抗がん剤感受性検査の開発	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 日本獣医腎泌尿器学雑誌	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） なし	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 Amira Abugomaa , Mohamed Elbadawy, Megumi Yamanaka, Yuta Goto, Kimika Hayashi, Takashi Mori , Tsuyoshi Uchide, Daigo Azakami, Ryuji Fukushima, Toshinori Yoshida, Makoto Shibutani, Risako Yamashita, Mio Kobayashi, Hideyuki Yamawaki, Yuta Shinohara, Masahiro Kaneda, Tatsuya Usui, Kazuaki Sasaki	4. 巻 10
2. 論文標題 Establishment of 2.5D organoid culture model using 3D bladder cancer organoid culture	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Scientific Reports	6. 最初と最後の頁 9393
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1038/s41598-020-66229-w	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 Abugomaa Amira, Elbadawy Mohamed, Ishihara Yusuke, Yamamoto Haru, Kaneda Masahiro, Yamawaki Hideyuki, Shinohara Yuta, Usui Tatsuya, Sasaki Kazuaki	4. 巻 14
2. 論文標題 Anti-cancer activity of Chaga mushroom (Inonotus obliquus) against dog bladder cancer organoids	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 Frontiers in Pharmacology	6. 最初と最後の頁 1159516
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3389/fphar.2023.1159516	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10件 (うち招待講演 4件 / うち国際学会 0件)

1. 発表者名 白井達哉
2. 発表標題 伴侶動物のがん三次元培養法を活用した個別化獣医療の実現
3. 学会等名 患者由来がんモデル学会 (招待講演)
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 白井達哉
2. 発表標題 尿サンプル由来泌尿器がんオルガノイド培養法を用いた個別化獣医療の開発
3. 学会等名 第三回コンパニオンアニマルのゲノム医療研究会 (招待講演)
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 臼井達哉
2. 発表標題 オルガノイド培養法を活用した抗がん剤感受性検査の開発
3. 学会等名 第19回日本獣医内科学アカデミー学術大会（招待講演）
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 LIU Yishan, Tatsuya Usui, Kazuaki Sasaki
2. 発表標題 Urinary Microbiota analysis in dogs with Bladder Cancer
3. 学会等名 第5回日本獣医薬理学・毒性学会春季研究会
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 山本晴、藤坂航大、モハメドエルバダウィー、石原勇介、皆上大吾、打出毅、福島隆二、森崇、臼井達哉、佐々木一昭
2. 発表標題 イヌ正常膀胱オルガノイド培養モデルの確立
3. 学会等名 第17回日本獣医内科学アカデミー学術集会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 臼井達哉
2. 発表標題 三次元オルガノイド培養法を用いたオーダーメイド獣医療の開発と創薬への応用
3. 学会等名 医薬品毒性機序研究会（招待講演）
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 藤坂航大,モハメドエルバダウィー, 山本晴, 石原勇介,,臼井達哉 佐々木一昭
2. 発表標題 3次元オルガノイド培養法を用いたイヌ正常膀胱のin vitroでの再現および解析
3. 学会等名 第44回日本分子生物学会年会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 アミラ アブゴマー、臼井 達哉、佐々木 一昭
2. 発表標題 犬膀胱がん2.5Dオルガノイド培養法の確立
3. 学会等名 第163回日本獣医学会学術集会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 佐藤よもぎ, モハメドエルバダウィー、山本晴、森正弘、森崇、中川貴之、前田真吾、野口俊助、岩井聡美、皆上大吾、打出毅、福島隆治、臼井達哉、佐々木一昭
2. 発表標題 尿サンプル由来イヌ移行上皮癌オルガノイド培養法を用いた 抗がん剤感受性検査の開発
3. 学会等名 第17回日本獣医内科学アカデミー学術集会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 後藤 悠太, 臼井 達哉, エルバダヴィー モハメド , 林 希佳, 山中 恵
2. 発表標題 オルガノイド培養法を用いた犬膀胱がんに対するTrametinibの薬効薬理評価
3. 学会等名 第143回日本薬理学会関東部会
4. 発表年 2020年

〔図書〕 計1件

1. 著者名 新井 克彦 編著 服部 俊治 編著	4. 発行年 2021年
2. 出版社 丸善出版	5. 総ページ数 454
3. 書名 細胞外マトリックス実験法	

〔出願〕 計1件

産業財産権の名称 特許権	発明者 白井達哉 佐々木一昭 他	権利者 同左
産業財産権の種類、番号 特許、特願2020-051580	出願年 2020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	恒富 亮一 (Tsunedomi Ryoichi) (10420514)	山口大学・医学部附属病院・講師 (15501)	
研究分担者	打出 毅 (Uchide Tsuyoshi) (20327456)	東京農工大学・(連合)農学研究科(研究院)・教授 (12605)	
研究分担者	大松 勉 (Omatsu Tsutomu) (60455392)	東京農工大学・農学部・准教授 (12605)	

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
---------	---------