

令和 5 年 4 月 24 日現在

機関番号：15501

研究種目：基盤研究(B) (一般)

研究期間：2020～2022

課題番号：20H03806

研究課題名(和文) 前立腺癌オルガノイドと3D in vitroモデルによる至適薬剤選択法の開発

研究課題名(英文) Development of optimal drug screening using 3D in vitro prostate cancer organoid

研究代表者

松山 豪泰 (Matsuyama, Hideyasu)

山口大学・大学院医学系研究科・教授(特命)

研究者番号：70209667

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 13,900,000円

研究成果の概要(和文)：(1) in vitroモデルの開発：骨微小環境、原発巣微小環境モデルを用いてARATsの感受性試験を行い、両モデルともダロルタミドがエンザルタミド、アパルタミドよりIC50値が低値であった。(2) 前立腺癌由来オルガノイドの作成：オルガノイド10株の作成に成功した。(3) 去勢抵抗性前立腺癌患者に対するアビラテロン、デュタステリド併用第II相臨床試験：PSA>50%低下は18/21人(85.7%)に認められ、Grade 3以上の有害事象は認められなかった。併用療法で3-ケト-5-アビラテロン濃度が高いほどTTFが短かく、ホモ接合性野生型HSD3B1を持つ患者ではTTFが延長していた。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究で開発した骨微小環境および原発巣微小環境モデルは、ARATs薬剤スクリーニングとして有用であり、薬剤選択の一助となりうる。アビラテロン、デュタステリド併用第II相臨床試験はアビラテロン代謝経路を考慮した理論通りの高い治療効果を示し、代謝中間体(4-アビラテロン、3-ケト-5-アビラテロン)の推移と臨床効果との相関を証明したことは学術的意義が高い。さらに同代謝酵素の遺伝多型を調べることにより、併用療法がもっとも有効な患者を選択することが可能であることを臨床的に証明したことは、同併用療法の臨床応用に向けた社会的意義は極めて高いと思われる。

研究成果の概要(英文)：(1) Development of in vitro models reflecting bone microenvironment and primary tumor microenvironment: As a result of conducting sensitivity tests to various new androgen receptor blockers (ARATs) using the above model. Both models showed IC50 values of darolutamide was lower than enzalutamide, and apalutamide. (2) Establish of prostate cancer-derived organoids: We have succeeded in creating 10 strains of organoids (including 2 GFP-induced strains) from prostate cancer surgical specimens. (3) Phase II clinical trial in combination with abiraterone and dutasteride for patients with castration-resistant prostate cancer. The primary endpoint of less than 50% PSA reduction was observed in 18 out of 21 patients (85.7%) with a median follow-up of 15.4 months. There were no adverse events of Grade 3 or higher. Higher 3-keto-5-abiraterone concentrations were associated with shorter TTF in combination therapy. TTF was prolonged in patients with homozygous wild-type HSD3B1.

研究分野：泌尿器科

キーワード：オルガノイド CRPC 薬剤感受性試験 アビラテロン

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

前立腺癌骨転移は最も高頻度に発生するが、その詳細は不明である。非転移性去勢抵抗性前立腺癌 (mCRPC) では、いかに臨床的骨転移を抑制し無転移再発期間を延長させるか、ホルモン感受性前立腺癌 (mHSPC) では骨を中心とした転移と原発巣の両方をいかにコントロールするかが重要であり、骨微小環境および原発巣環境を反映した *in vitro* モデルの開発はこれらの臨床的問題点を解決する上で喫緊の課題である。

2. 研究の目的

本研究の目的は、(1)mHSPC 由来オルガノイド骨微小環境モデルと原発巣環境モデルを用いて種々の新規アンドロゲン受容体シグナル標的薬 (以下 ARATs) 感受性試験を行うこと(2) 前立腺癌由来オルガノイドを作成し、上記モデルを用いた ARATs 治療前後の 1 細胞 RNA シーケンス (以下 scRNA-seq) によるクラスタリング解析により発現量に差がある遺伝子を抽出すること(3) アピラテロン、デュタステリド併用治療の治療効果・安全性の確認とアピラテロン代謝関連酵素である HSD3B1 および SRD5A2 の遺伝多型をマーカーとした効果予測症例の遺伝子チップを作成することである。

3. 研究の方法

(1) 骨および原発巣微小環境モデルの作成：レンチウイルスを用いて GFP を導入したホルモン感受性前立腺癌継代培養株 (LNCaP) と去勢抵抗性前立腺癌株 (C4-2) を使用し、以下のモデルを作成した。a. 骨微小環境モデル: 3次元マトリックス構造のキットサンをコートしたウェルにヒト骨髄由来間葉系幹細胞より誘導し骨芽細胞をシート状に増殖させ、前立腺癌細胞株をウェル上に播種し、共培養を行った。b. 原発巣微小環境モデル: Double chamber の下層に CAF (Cancer-associate fibroblast)、上層に前立腺癌細胞株を播種したモデルを作成した。評価は Cell3 Imager duos (SCREEN 社) を用いて経時的にコロニーサイズを測定し、対照群との比較を行った。

(2) 前立腺全摘検体をもちいた前立腺癌由来オルガノイドの作成：プロトコールに準拠し、前立腺癌原発巣より採取した検体を細切 collagenase 処理し、単離した腫瘍細胞をマトリゲルに播種後、固化させ adMEM/F12 培地を加え 5%CO₂, 37°C の条件で培養した。

(3) アピラテロン、デュタステリド併用治療の治療効果・安全性の確認：CRPC 患者 20 例を対象とした「去勢抵抗性前立腺がんに対するアピラテロン (以下 Abi)、デュタステリド (以下 Duta) 併用治療第 2 相臨床試験」を行い、治療効果、副作用の有無を検討した。投与期間を 2 期に分け (第 1 期 Abi 単独、第 2 期 Abi+Duta 併用期)、安全性、治療効果と HSD3B1 遺伝多型、アピラテロン代謝体濃度の関連を検討した。主要評価項目は 50%PSA 低下率、副次的評価項目は安全性、治療失敗までの期間 (TTF) を設定した。HSD3B1 および SRD5A2 遺伝多型は Sanger 法にて判定 (wild type, ヘテロ, ホモ多型)。Abi 代謝体: 併用前後で Abi, D4A, 3β-keto-5αAbi 濃度を ESI-TOF-MS 法にて測定した。

4. 研究成果

(1) a. 骨微小環境モデル: 緑色蛍光タンパク (GFP) を導入したホルモン感受性前立腺癌継代培養株 (LNCaP) および去勢抵抗性前立腺癌株 (C4-2) の骨微小環境モデルを Cell Imager を用いて観察した結果、30 日以上にわたって持続的に増殖することを確認した (Fig.1(A))。また去勢抵抗性前立腺癌株 (C4-2) を用いた骨微小環境モデルにおいて各種 ARATs の IC₅₀ を測定した結果、アピラテロンとデュタステリド併用群、ダロルタミド、アピラテロン、エンザルタミド、アパルタミドの順で IC₅₀ 値が低値であった (Fig.1(B), Table 1)。b. 原発巣微小環境モデル: 薬剤持続接触 120 時間後の各薬剤の IC₅₀ を測定した結果、ホルモン感受性株 (LNCaP) ではダロルタミド、エンザルタミド、アパルタミドの順で IC₅₀ が低値であった (Fig.2, Table 2)。また CRPC 株 (C4-2) ではダロルタミドのみが IC₅₀ を測定することが可能で、他の ARATs に対するダロルタミドの抗腫瘍効果の優越性が示唆された。

Fig. 1 骨微小環境モデルを用いた検討

(A) 骨芽細胞 (赤)、前立腺癌細胞 (緑) の経時的増殖変化

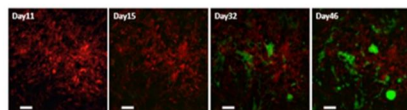


Table 1 各種 ARATs の IC₅₀

Drugs	IC ₅₀ (μM)
Enzalutamide	50.85 ± 1.90
Apalutamide	51.02 ± 1.96
Darolutamide	35.14 ± 1.26
Abiraterone	38.85 ± 5.38
Δ4 Abiraterone	10.47 ± 4.87

The values are presented as mean ± SD. Experiments were performed in quadruplicate.
IC₅₀: 50% Inhibition Concentration

(B) ARATs の抗腫瘍効果検討

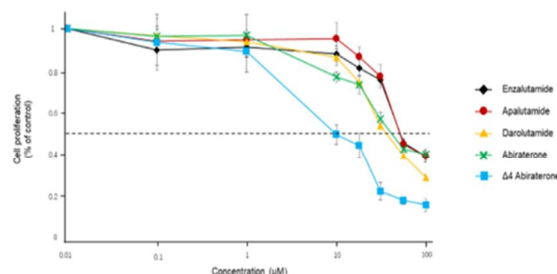


Fig. 2 原発巣微小環境モデルにおけるARATsの抗腫瘍効果検討

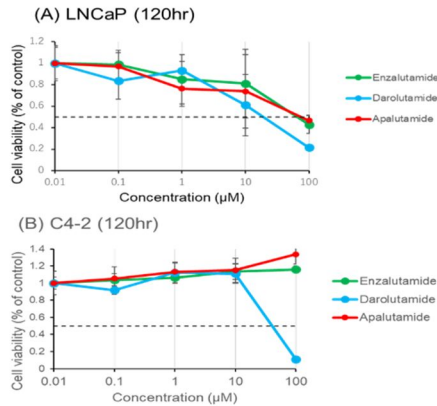
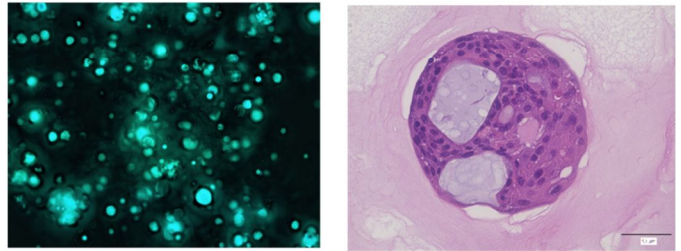


Table 2 原発巣微小環境モデルを用いた各種ARATsのIC₅₀比較

(A) LNCaP	
Drug	IC ₅₀ (μM)
Darolutamide	22.34
Enzalutamide	73.93
Apalutamide	76.29
(B) C4-2	
Drug	IC ₅₀ (μM)
Darolutamide	62.13
Enzalutamide	-
Apalutamide	-

Fig. 3 前立腺癌オルガノイド

(A) GFP導入オルガノイド (B) オルガノイドの組織切片(HE染色)



1継代目 day6(拡大: scale bar 200 μm)

前立腺癌に特徴的な微小腺管形成あり

(2) 前立腺癌由来オルガノイドの作成: 前立腺癌手術検体より、オルガノイド10株(うちGFPを導入可能2株)の作成に成功した(Fig.3)。作成したオルガノイドは前立腺癌の形態的特徴を有し、前立腺癌由来オルガノイドと判定した。現在凍結保存中である。

(3) アピラテロン、デュタステリド併用試験

: 文書同意が得られた21人が登録された。主要評価項目である50%以上のPSA低下は18人(85.7%)に認められた。経過観察期間中央値15.4ヶ月で、TTFは中央値に到達しなかった。有害事象に関してはGrade3以上の有害事象は認められなかった。デュタステリドは最も抗腫瘍効果が高いΔ4-アピラテロンの代謝体で、ARアゴニスト作用のある3-ケト-5α-アピラテロン濃度を低下させ、併用療法で血清3-ケト-5α-アピラテロン濃度が高いほどTTFが短かった。HSD3B1とSRD5A2遺伝子型は、それぞれデュタステリドを添加する前のΔ4-アピラテロンおよび3-ケト-5α-アピラテロン濃度と関連していた。とくにホモ接合性野生型HSD3B1を持つ患者ではTTFが延長していたが、SRD5A2遺伝子型を有する患者では延長を認めなかった。以上よりHSD3B1とSRD5A2による層別化遺伝子プロファイルは、本併用療法に適した患者選定に寄与する可能性が示唆された。

本研究はバイエル薬品株式会社2020年Non Clinical Investigator Initiating Researchに採択され、同社と山口大学間の受託研究(研究課題:二種類のin vitroオルガノイドモデルをもちいたオリゴ転移性前立腺がんに対する局所および転移巣に対するダロルタミドの抗腫瘍効果の検討、被検薬ダロルタミド原末提供と5,000,000円の助成)として研究を行った。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計1件（うち査読付論文 1件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 1件）

1. 著者名 Shiota M, Inoue R, Tashiro K, Kobayashi K, Horiyama S, Kanji H, Eto M, Egawa S, Haginaka J, Matsuyama H.	4. 巻 63
2. 論文標題 A Phase II Trial of Abiraterone With Dutasteride for Second-Generation Antiandrogen- and Chemotherapy-Naive Patients With Castration-Resistant Prostate Cancer	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 J Clinic Pharmacol.	6. 最初と最後の頁 445-454
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1002/jcph.2191	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 2件）

1. 発表者名 Matsuyama H. et al
2. 発表標題 Phase II study of the efficacy of Abiraterone acetate with Dutasteride for castration resistant prostate cancer.
3. 学会等名 ASCO-GU 2021（国際学会）
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 Samoto M, Matsumoto H, Hirata H, Ueno K, Ozawa S, Mori J, Inoue R, Yano S, Yamamoto Y, Matsuyama H.
2. 発表標題 Novel bone microenvironment model of prostate cancer with chitosan fiber matrix and osteoblast in 3D culture
3. 学会等名 American Association of Cancer Research (AACR) virtual annual meeting II（国際学会）
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 佐本征弘、松本洋明、平田 寛、上野耕司、小澤 翔、森 純一、井上 亮、山本義明、矢野誠司、堀川志朱代、萩中 淳、松山豪泰
2. 発表標題 去勢抵抗性前立腺癌骨微小環境モデルを用いたEMT関連因子の解析とアピラテロン・デュタステリド併用療法の有効性についての解析
3. 学会等名 第30回泌尿器科分子・細胞研究会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 小澤 翔、佐本 征弘、平田 寛、松本洋明、白石晃司、松山豪泰
2. 発表標題 2種類の前立腺癌in vitroモデルを用いた新規アンドロゲン受容体標的薬の抗腫瘍効果の検討
3. 学会等名 第61回日本癌治療学会学術集会
4. 発表年 2023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	萩中 淳 (Haginaka Jun) (20164759)	武庫川女子大学・バイオサイエンス研究所・教授 (34517)	
研究分担者	塩田 真己 (Shiota Masaki) (20635445)	九州大学・大学病院・講師 (17102)	
研究分担者	平田 寛 (Hirata Hiroshi) (40781307)	山口大学・医学部附属病院・助教 (15501)	
研究分担者	清木 誠 (Seiki Makoto) (50226619)	山口大学・大学院医学系研究科・教授 (15501)	

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