

令和 5 年 6 月 25 日現在

機関番号：15501

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2020～2022

課題番号：20K09527

研究課題名(和文) 免疫細胞成分を含む癌ニッチ形成を応用した膀胱癌薬剤感受性プラットフォームの開発

研究課題名(英文) Development of a bladder cancer drug-sensitivity platform based on cancer niche formation including immune cell components

研究代表者

松本 洋明 (Matsumoto, Hiroaki)

山口大学・医学部附属病院・講師

研究者番号：60610673

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,400,000円

研究成果の概要(和文)：東京農工大臼井達哉特任講師と共同で膀胱がん患者膀胱洗浄尿より剥離細胞を採取し、培養条件の設定、3D培養を行い、患者由来膀胱癌オルガノイドを作成した。Usuiらの報告した2.5次元培養法にて継代可能株を作成した。また、膀胱癌細胞株(T24、TCCSUP、5637、RT4、SCaBER)にGFPを導入し、ヒト不死化癌関連線維芽細胞にはRFPを導入したうえで共培養モデルを作成した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

患者検体よりの膀胱癌オルガノイド作成により、従来の平面培養での細胞株樹立と異なりより生体内でのがんの微小環境に沿った薬物感受性やシグナル伝達経路の解明に貢献できるものと思われ、実験動物を使用せずによりハイスループットな、かつテーラーメイド医療の基礎的技術となる可能性が示唆され、新たな膀胱癌治療ターゲットの創出に役立つものと思われる。

研究成果の概要(英文)：In collaboration with Tatsuya Usui, specially-appointed lecturer at Tokyo University of Agriculture and Technology, exfoliated cells were collected from bladder wash urine of bladder cancer patients, culture conditions were set, 3D culture was performed, and patient-derived bladder cancer organoids were created. 2.5D culture method reported by Usui et al (Scientific Reports, 2020, 10:9393) was used to create a transferrable strains were created. Co-culture models were also created by introducing GFP into bladder cancer cell lines (T24, TCCSUP, 5637, RT4 and SCaBER) and RFP into human immortalised cancer-associated fibroblasts.

研究分野：尿路悪性腫瘍

キーワード：膀胱癌 癌オルガノイド 癌微小環境 3次元培養 薬剤感受性

1. 研究開始当初の背景

筋層浸潤性膀胱癌 (Muscle invasive bladder cancer: MIBC) の治療は局限癌では現在も膀胱全摘除術が標準治療であるが、依然としてその予後は良好とは言えず、5年生存率は約50%と予後不良疾患である。また、予後を規定する因子はやはり転移出現であり、近年では予後改善のため積極的に術前化学療法を施行している。また、転移性膀胱癌では現在1次治療として抗癌剤の組み合わせによるレジメンに加え、2次治療としてはペムプロリツマブによる免疫療法が広く施行されつつあり、さらに3次治療としてFGFR3阻害剤(エルダフィチニブなど)や抗体薬物複合体(エンフォルツマブベドチンなど)の治療が間もなく本邦でも使用可能になる。これらの多様な薬剤の至適投与がますます重要性を増してくると思われる。一方、膀胱癌症例では筋層非浸潤性膀胱癌 (Non muscle invasive bladder cancer: NMIBC) が全膀胱癌患者の70~80%と多く、大多数の症例は経尿道的腫瘍切除術とそれに続く再発予防のBCG膀胱内注入療が標準治療となっているが、BCG unresponsiveと分類される疾患群は再発、進行リスクが高く、MIBCと同じく膀胱全摘を要する患者が存在する。現在このBCG unresponsive症例に対する企業主導の治療開発がいくつも進められているが、適切な症例選択は未確立であり、治療のアプローチが存在する。転移性MIBCおよびNMIBCのBCG unresponsiveといった難治症例に対しては患者個々に最適な薬剤選択が必要なのは言うまでもなく、ファーストライン治療で完全緩解を含めた最大限の治療効果を得るために治療前での正確な薬剤感受性試験は古くて新しい基盤的医療技術であると思われる。

固形癌において治療の基本は原発巣の根治的加療と転移巣の制御であるが、発生した癌は微小環境ニッチを形成したのち、早期から転移浸潤のための環境を作り始めることが想定されており、[Nat. Med. 19, 1423-1437, 2013.] 臨床的に局限癌と診断される段階でも循環腫瘍細胞 (CTC) が検出されることが報告されている [Cancer Discov. 2018 Mar;8(3):288-303.]。また、腫瘍細胞はそのニッチにおいて自己免疫からの逃避機構を獲得することで増殖、転移を促進することが出来ると考えられており [Cell. 2018 Dec 13;175(7):1972-1988.]、 [J Exp Clin Cancer Res. 2019 Mar 22;38(1):117.]、自己免疫細胞成分を含む癌ニッチの再現が

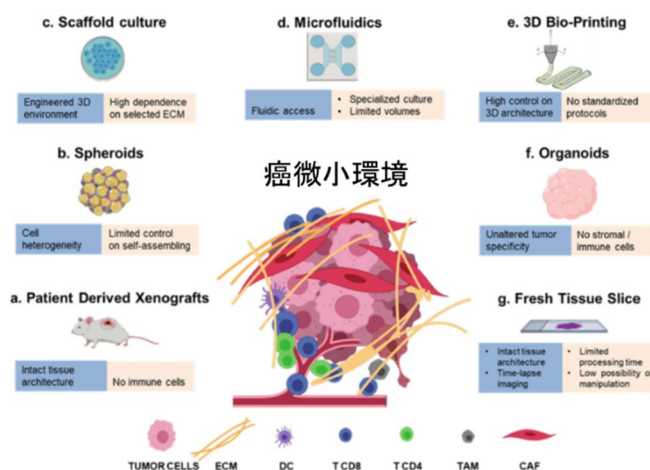
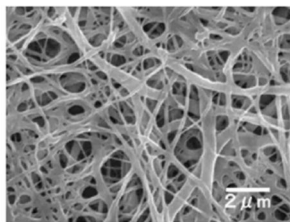


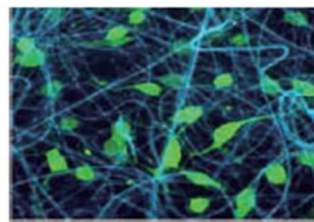
図1. 免疫細胞成分を含む癌ニッチ形成 [J Exp Clin Cancer Res. 2019;38(1):117.を改変]

その患者における真の薬物感受性を知るために大変重要であるのは自明である(図1)。しかし、現在の解析系は臨床研究では次世代シーケンサーを用いた癌組織や患者血清由来のDNAやRNA(miRNA)の解析が主体であり、事象の一側面しか観測してない。また、基礎研究では一部スフェロイドを用いた3D培養系による細胞解析やPDXを利用した薬剤感受性試験が行われているが、前述の癌ニッチの再現やハイスループットな解析はいまだ不十分である。それゆえ、生体内癌ニッチの正確な再現はその患者個人の実際の癌の増殖能、転移能、

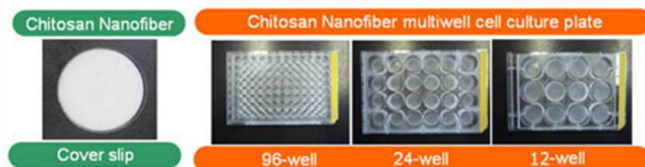
薬剤抵抗性、免疫逃避機構を体系的に理解することにつながると思われる。最近その癌ニッチの再現の足掛かりとして各癌腫で 3D オルガノイドの作成が盛んになっており、3D がんオルガノイドは平面培養系と動物モデル双方の欠点を補うあらたな培養技術として各癌種に応用されつつあるが[Nat Rev Urol. 2017; 14(7): 401-414.], まだ単一細胞系のものがほとんどであり、生体内の免疫細胞系を含む癌ニッチの再現には至っていない。癌ニッチの再現には癌細胞自体に加え、CAF と細胞外基質といった複合的な足場が必要である。近年、nano fiber 技術を応用した新たな組織培養基材が開発され tissue engineering 技術の発展は目覚ましい。その新たな細胞培養基材の一つとしてキトサンナノファイバーが注目されている[Int J Nanomedicine. 2014;9:995-1003.]. キトサンは天然素材の「キチン」を脱アセチル処理して得られる高分子多糖類である。ゆえに生体適合性が非常に高く、化学処理し安定化したキトサンナノファイバーを固定化した基材では正常細胞の培養をはじめ、癌細胞の培養も高い生着性と長期培養が可能な素材として癌ニッチの再現に理想的な基材になりうると思われる(図2)。また、当科では日本泌尿器科学会編の膀胱癌診療ガイドライン 2019 年版を作成委員長として松山豪泰、事務局として研究代表者の松本洋明で作成しており、この技術の確立は泌尿器科での膀胱癌治療をさらに発展させるシーズになることは確信をもって断言できる。



キトサンナノファイバーマトリックス



キトサンナノファイバーマトリックス内での神経細胞の培養 (マウスシュワン細胞IMS32)



北海道曹達株式会社、コスモバイオのホームページより
https://www.cosmobio.co.jp/product/detail/00820004.asp?entry_id=1235

図2. キトサンナノファイバーのプラットフォーム

2. 研究の目的

本研究の目的は新規膀胱癌微小環境モデルの再現によるハイスループットな薬剤感受性プラットフォームを創成し、患者個々の最適な薬剤選択によるオーダーメイド医療の創出と薬剤抵抗性メカニズムの解明である。キトサンナノファイバーマトリックスと膀胱癌組織より分離した癌細胞及び CAF を用いて 3D 培養系で癌微小環境モデルを作成し、さらに患者より採取した患者由来 T リンパ球系細胞を加えて共培養することによるリアルタイムに可視化できる癌微小環境モデル構築は、現在まで報告がなく、簡便かつ学術的独自性が非常に高い研究と思われる。

また本講座では後述の通り上記を実現するすべての環境がそろっており、他所では再現できない新たな細胞解析を可能とすることで、新規薬剤感受性プラットフォーム開発につながる創造性の高い研究と思われる。

3. 研究の方法

培養細胞株を用いた膀胱癌ニッチ形成

ヒト由来初代膀胱線維芽細胞 (ATCC® PCS420013™) に RFP、hTERT 遺伝子発現レンチウイルスベクターを用いて遺伝子導入し、キトサンナノファイバーマトリックス (コスモバイオ) 内に播種定着させ、培養条件を確立する。次いで膀胱癌細胞株 (T24、TCCSUP、5637、RT4、SCaBER) に GFP 発現レンチウイルスベクターを用いて遺伝子導入した細胞を共培養し、疑似癌微小環境を構築し、微小環境の形態、増殖能を細胞イメージングシステム (Cell3imager ; SCREEN) にてリアルタイムに、経時的に観察、定量化する。

3D 細胞培養基質上での患者由来単核球を用いた免疫細胞成分を含む膀胱癌ニッチ形成
上記で作成したキトサンナノファイバーマトリックスに患者末梢血より分離採取した単核球 (主として T リンパ球系: PromoCell リンパ球系細胞分離培地使用) を導入共培養し、細胞イメージングシステムにてリアルタイムに、経時的に観察、定量化する。により基本的な培養系確立を行う。また、キトサンナノファイバーマトリックスは 96 ウェル培養系を用いることが可能であり、微小環境での免疫細胞の関与による癌細胞への増殖能、アポトーシスもチェックすることが可能であり、また多種の薬剤感受性に用いることが可能である。また、6 ウェル培養系にて細胞からは FACS にて cell sorting により、上清からはエクソソームを分離し、RNA と miRNA を抽出する。PCR アレイ (キアゲン) により癌細胞増殖因子、サイトカインのプロファイリングを行う。

3D がんオルガノイドを用いた生体内膀胱癌ニッチ再現

同様に上記で樹立した線維芽細胞とキトサンナノファイバーマトリックスより疑似膀胱微小環境作成後、膀胱癌患者より転移巣組織あるいは薬物療法前の TURBT 組織検体、あるいは膀胱全摘標本を用いて 3D がんオルガノイドを作成し (基盤研究 C: 16K11008 より) と同条件で共培養し、経時的に観察、定量化する。安定した共培養系が確立されたのを確認し、キトサン 96 ウェルプレートで薬剤感受性試験を行い、当該患者の実臨床での治療経過を前向きに観察し、比較検討を行う。当院および関連施設にて MIBC に対する TURBT に続く薬物療法、膀胱全摘除術は年間 20-30 例が見込まれる。

新規薬剤耐性遺伝子群の同定と免疫逃避機構の解明

それぞれ の環境下での細胞動態の違いを同定するため 線維芽細胞のみ、腫瘍細胞のみ、線維芽細胞と腫瘍細胞、線維芽細胞 + 腫瘍細胞 + 単核球共培養の 4 条件からタンパク質、RNA (miRNA) を抽出し、RNA-seq (NGS) にて網羅的に遺伝子発現を解析し、4 条件の差引きにより経時的に腫瘍細胞が接着、定着から休眠期、再増殖期へと癌微小環境を確立していく各段階の特異的な遺伝子を同定し、抽出したタンパク質を用いたウエスタンブロットで遺伝子発現の確認を行い、 の条件での薬剤耐性メカニズムの解明と免疫逃避機構成立のための遺伝子群を同定する。また候補遺伝子を CRISPR-CAS9 システムでノックインまたはノックアウトし、機能解析を行う。そして公共データベース (Connectivity MAP, KEGG cancer 等) より最も有力な阻害薬を抽出する。

候補阻害薬の動物投与試験

で同定された阻害薬より細胞毒性の少ない化合物を選択し、動物モデルでの抗腫瘍効果を確認する。

4. 研究成果

東京農工大白井達哉特任講師と共同で膀胱がん患者膀胱洗浄尿より剥離細胞を採取し、培養条件の設定、3D 培養を行い、患者由来膀胱癌オルガノイドを作成した (図 3)。Usui らの報告した 2.5 次元培養法にて継代可能株を作成した。また、膀胱癌細胞株 (T24、TCCSUP、5637、RT4、SCaBER) に GFP を導入し、ヒト不死化癌関連線維芽細胞 (CAF) には RFP を導入したうえで共培養モデルを作成した。2.5 次元膀胱癌オルガノイドは増殖スピードが 3D オルガノイドと比較して更新していたが、尿路上皮細胞マーカーや in vivo での腫瘍径性能や抗癌剤に対する反応性といった 3D オルガノイドの性質は維持されることが示唆された (図 4)。また CAF と膀胱癌細胞株の 3D 共培養モデルでも膀胱癌細胞株のみの培養と比較し有意な増殖効果が得られることが判明した (図 5)。

図 3: 患者由来膀胱癌 3D オルガノイド



図 4 : 3D と 2.5D オルガノイドの比較

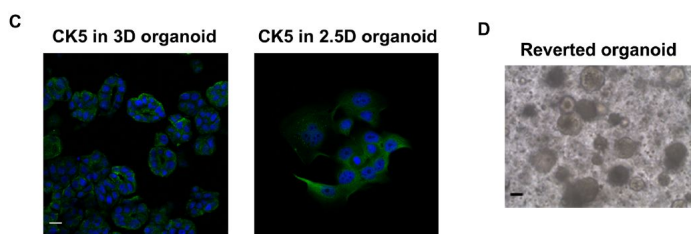
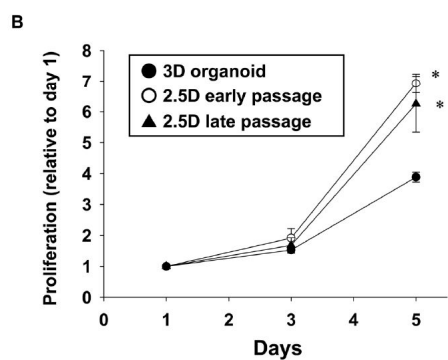
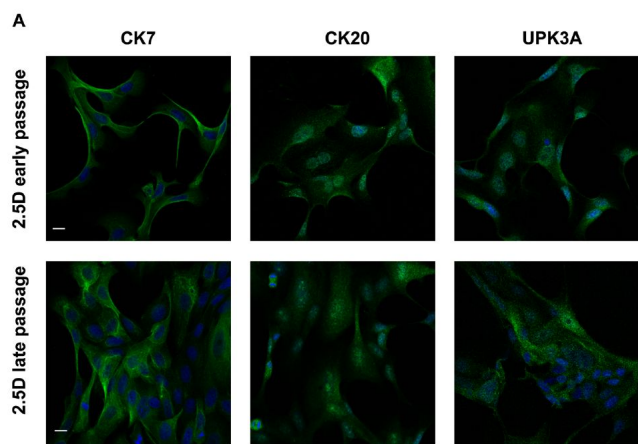
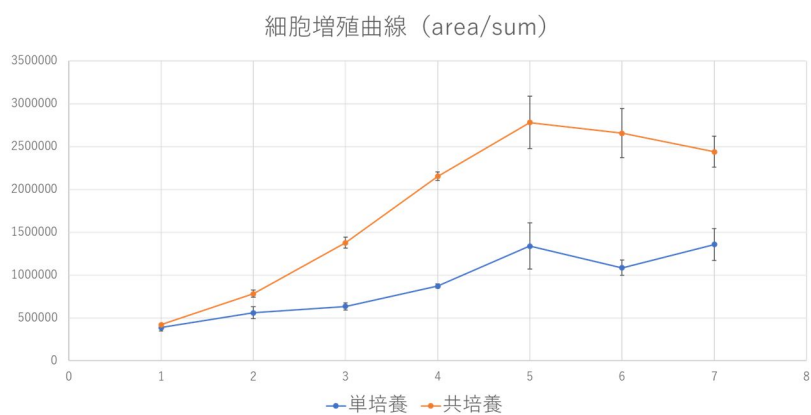


図 5 : CAF と膀胱癌細胞株との共培養



5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計1件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 藤坂 航大、モハメド エルダウィ、佐藤 よもぎ、山本 晴、松本 洋明、松山 豪泰、金田 正弘、白井 達哉、佐々木 一昭
2. 発表標題 尿サンプル由来ヒト膀胱がんオルガノイド培養法の確立
3. 学会等名 第94回日本薬理学会年会
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
研究分担者	山本 義明 (Yamamoto Yoshiaki) (30593298)	山口大学・医学部・特別医学研究員 (15501)	
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)	
研究分担者	松山 豪泰 (Matsuyama Hideyasu) (70209667)	山口大学・大学院医学系研究科・教授（特命） (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
---------	---------