

上皮階層構造を有した新規培養系による、前立腺がん検体の新評価

愛知県がんセンター研究所

がん予防研究分野 主任研究員 猪子誠人

愛知県がんセンター中央病院

泌尿器科部 部長 曾我倫久人

愛知県がんセンター中央病院

遺伝子病理診断部 部長 谷田部恭

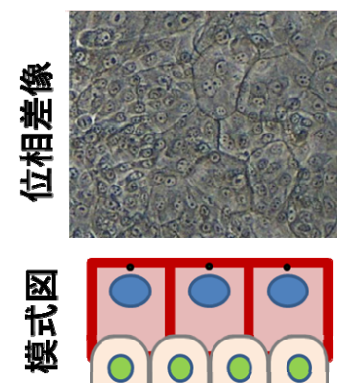
1. 研究の背景・目的

日本の前立腺がんは高齢化や食の欧米化で増加しており、数年後には罹患率1位と言われるほど医療要請が強い。現行の前立腺がん治療では、主に①PSA②腫瘍径③病理像でリスク評価・治療方針が決定される。しかし指標として完全ではなく、過剰手術が指摘される。一方で、転移再発例や高齢者の治療選択枝が少ない事実は、立ち遅れた個別化医療の現状を示している。

個別化医療が実証された前立腺がんマーカーや分子標的薬はまだ無い。主要がんで先行するようなドライバーゲンは少なく、予後不良例の変異報告は比較的最近である。アンドロゲンレセプターを抑える内服去勢は重要な薬物治療であるが、しばしば起こる抵抗例は治療が難渋する。そのため、新たな個別バイオマーカーや分子標的薬の開発、が望まれる。しかし、それに適した生細胞解析系はまだないのが現状である(文献 1)。

申請者は、MD., PhD.として基礎と臨床のはざままで研究業績・助成を積み重ね、前立腺生検から幹細胞を取得し、生体と同じ2階層分化させるオリジナル技術を開発した(図 1)。採取した検体に ES, iPS でも使う培養用化合物を用いると、簡便に無限増殖および分化可能な幹細胞が採れるのである。このような最近の幹細胞培養技術では、カリオタイプ・遺伝子変化をほとんど伴わない(文献 2)。本研究ではこ

図1：前立腺生検から幹細胞を取得し、生体と同じ2階層分化させる申請者のオリジナル技術。



のまさに「生きた表現型」を指標に悪性度を緻密に層別化し、各々に固有の治療標的分子や薬物同定の礎とする。将来的には附帯する診療情報と相関解析し、予後や予防の個別化に役立てる。

2. 研究の対象ならびに方法

本研究では、上皮階層構造を有した検体の新しい培養技術を元に、新たな個別化・層別化医療開発の礎となるエビデンス獲得を目指す。今回は以下の方法での研究を重点的に行った。

「培養前立腺がん幹細胞の樹立と病理診断の紐付け」

高・中・低分化型腺がんに対応する Gleason score 6・7・8 以上の病理診断とこれに由来する培養細胞の基礎データを紐付けるため、以下のことを行う。

まず、新規前立腺腫瘍患者 100-200 名に対し、泌尿器科部で通常行う診断前生検に加え、研究用のがん部を2検体追加採取する。その2体を2分割し病理診断と申請者の培養細胞化を行うことで情報の紐付けを行う。必要に応じて混入した正常細胞を除去し、がん幹細胞を単離する。

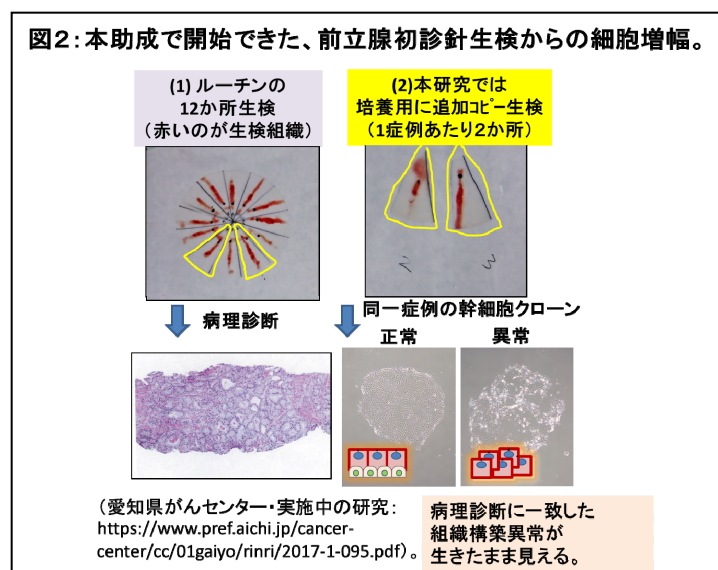
「上皮階層性の病態生理」

本法で新たに培養可能となった、様々な分化度のがん細胞の上皮階層特性を、詳細な免疫染色やウェスタンブロット、遺伝子解析で再評価・分類する。すなわち正常上皮階層の特性である細胞間接着・細胞極性、細胞周期チェックポイントを免疫染色による局在や発現量および遺伝子の変異として評価し、正常分化状態との差として見出す。特に、がんの分化度とマーカー異常の相関について、本法の貢献度が高いと思われる新たな知見の抽出に努める。

3. 研究結果

(1) まず施設の倫理委員会の承認を得、がん検体収集が開始できた。泌尿器科スタッフの全面協力と患者さんの献身的なご協力により、四半期で 30 例以上、全ての悪性度を既に集めた(図 2)。

(2) 技術面ではフィーダー細胞(線維芽細胞)の使用が不要になった(図 2)。これは培地に追加する新たな化合物 X を類似文献に見出し検討した結果



による。この夾雑細胞が無くなった結果、観察や解析の実験精度が極めて向上した。実際に針生検から幹細胞を培養したところ、数10個ほど生じるコロニーは容易に単離され、明らかに正常と異常の2種類に分けられただけでなく、免疫染色やウエスタンブロッティングに一定のパターンが見られたことから、がん・正常共に幹細胞のクローン性の高さが示唆された。

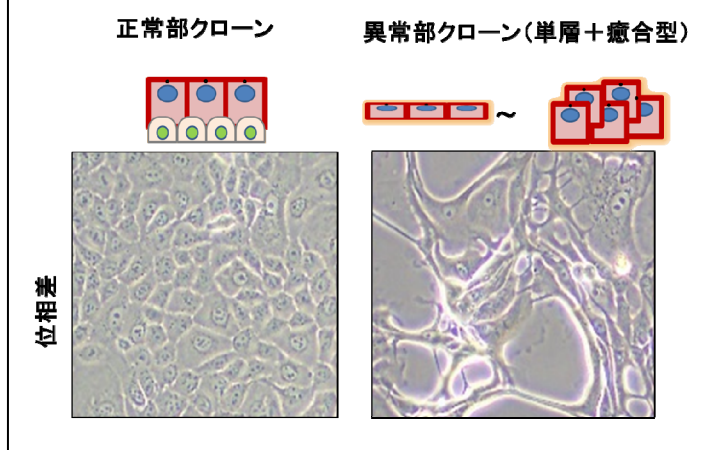
(3)その中から個別化治療につながり得る個人症例の新たな表現型を見出した(図3)。「単層+癒合型」の個人症例に見出したオリジナル表現型は、平面培養でも類似の組織構築異常を示すだけでなく、微小管の異常と不自然な細胞周期チェックポイント異常を新たに示した(data not shown)。この結果は、がんゲノムデータベース(TCGA)の情報ともある程度相関がある。

4. 考察

このような微小管細胞骨格や細胞周期チェックポイントの不自然な異常が個人がんの表現型として比較的簡便な方法で確認できたことは、精密化医療への第一歩として意義深い。同時にこれらの細胞現象は申請者の研究基盤であり、専門的な視点での解析が期待できる。今後は詳細な学術的解析として以下を予定している。

正常株からのゲノム編集による遺伝子破壊で表現型の責任遺伝子を明らかにする。今回は予算的に難しかったが、来年度以降は遺伝子解析や発現解析で網羅的なチェックを個人がん由来の細胞に対して行う。また治療応用として化合物や標的遺伝子の検索に努める。同時にまだ十分とはいえない症例数を追加し、同スコア内での共通点や相違点について、分子生物学的なデータを増やす。このように、今後もこのがん生検中の幹細胞を生きたまま増幅・培養分化解析する新たな方法で、未知の表現型を簡便にあぶりだし、診断・治療・予防開発の新たな標的を次々と提示できるよう努める(図4)。

図3:「単層+癒合型」症例の培養クローンでの異常所見



5. 文献

文献 1: : Drost J, Karthaus WR, Gao D, Driehuis E, Sawyers CL, Chen Y, Clevers H.

Organoid culture systems for prostate epithelial and cancer tissue. Nat Protoc. 2016 Feb;11(2):347-58.

文献 2: Liu X, Krawczyk E, Supryniewicz FA, Palechor-Ceron N, Yuan H, Dakic A, Simic V, Zheng YL, Sripathan P, Chen C, Lu J, Hou TW, Choudhury S, Kallakury B, Tang DG, Darling T, Thangapazham R, Timofeeva O, Dritschilo A, Randell SH, Albanese C, Agarwal S, Schlegel R. Conditional reprogramming and long-term expansion of normal and tumor cells from human biospecimens. Nat Protoc. 2017

6. 論文発表

投稿準備中。

