

前立腺がん生検の新規培養評価法による個別化医療の開発

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

同 分野長 松尾恵太郎

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

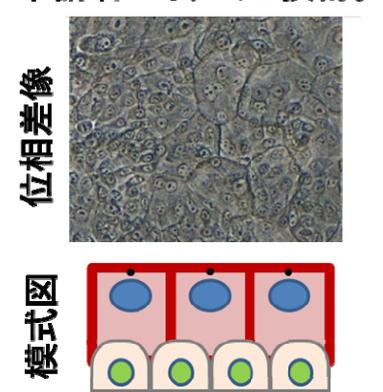
1. 研究の背景・目的

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つ。

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。方法自体は以下の様に前年とそう変わらないが、今年度は研究の量・質の点で大きな進展を見ることができた（詳細は3. 研究成果参照）。

「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。

前年同様、新規前立腺腫瘍患者に対し、泌尿器科部で通常行う診断前生検に加え、研究用にごがん部を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。

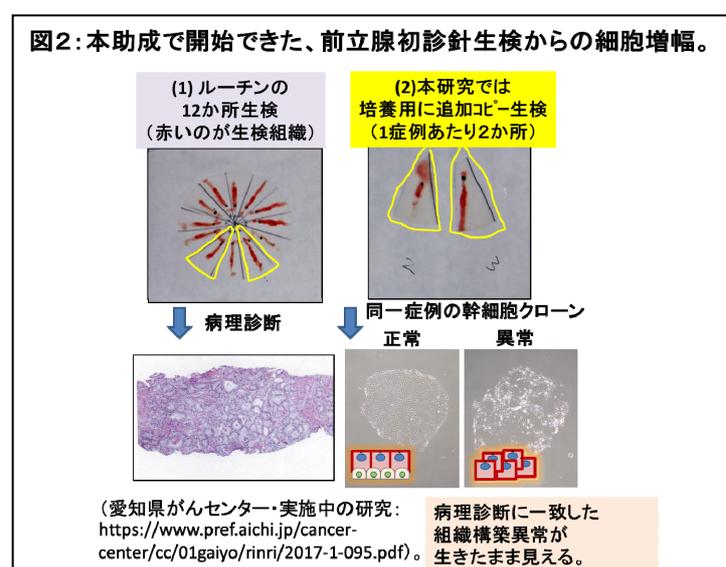
「上皮階層性の病態生理」

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エスタンブロット、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) 検体数を大幅に増やすことができた。施設の倫理委員会の承認後2年目に入ったこともあり、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で、全ての悪性度の前立腺が計約 40 検体まで増えた(図 2)。同様のコンセプトで腎癌症例も 25 検体収集することができた。

(2) 遺伝子発現解析により、診断の基



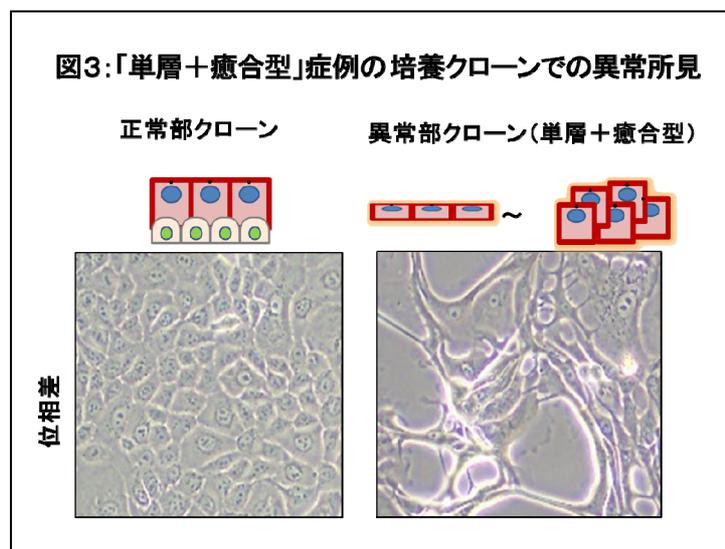
礎となる分子基盤の質が大幅に向上した。その下積みとして、昨年度は化合物 X の添加によってフィーダー細胞(線維芽細胞)に頼らない、純粋な幹細胞集団の維持を可能にしていた(図 2)。さらに今年度は化合物 X を除去すると幹細胞がほぼ 100%上皮に分化する新規分化培養法を開発した。この2つの発見を活かし、今回は正常細胞の分化の前後および途中で変動する遺伝子群を発現比較解析で抽出した。実験精度を高めるため、前立腺と乳腺の2種類の組織を用いたところ、両者に共通して、①幹細胞、②上皮分化後、③分化途中、のそれぞれに特徴的な遺伝子群として、既知分子だがこれまで関連性の報告がないものや未知の lncRNA が各 10 種類〜抽出されてきた。一部は TCGA 解析などで、癌との相関が注目されつつあるものもふくまれていた。これらの結果は、癌の特性と密接に関わる新規遺伝子群が解析可能な数として絞り込まれたことを意味する。

4. 考察

今回正常および癌細胞の特性と相関する変動遺伝子群が新たに抽出されたのには、報告者のサンプルや実験反応の高純度に起因するところが大きい。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これらの変動遺伝子の生物学的効果を明らかにする。同じことをがん検体(図 3)で行い、結果を比較していくことで、新たな腫瘍マーカーの抽出に努める。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。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)。

また、副次的に細胞増殖に関わる蛋白質の新規機能同定ができたため申し添える(6. 論文発表)。



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, Sripadhan 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

1: Inoko A(責任著者), Yano T, Miyamoto T, Matsuura S, Kiyono T, Goshima N, Inagaki M, Hayashi Y. Albatross/FBF1 contributes to both centriole duplication and centrosome separation. Genes Cells. 2018 Dec;23(12):1023-1042.

