

令和元年9月26日現在

機関番号：82504

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2016～2018

課題番号：16K09402

研究課題名(和文) ヒト膵癌手術検体オルガノイド培養の臨床応用のための基盤研究

研究課題名(英文) New Approach for Organoid Culture in Patients with Pancreatic Tumor

研究代表者

喜多 絵美里 (Kita, Emiri)

千葉県がんセンター(研究所)・消化器内科・その他

研究者番号：20773980

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,600,000円

研究成果の概要(和文)：手術不能膵がん患者の予後改善のためには、既存の化学療法の改良と新規治療の開発が重要な位置を占める。近年の培養技術の進歩により正常および癌細胞の3次元培養が可能となり、従来の2次元培養細胞株や成功率の低い手術検体Xenograftを代替可能な研究材料として注目を集めている。手術不能膵癌症例では得られる検体が微量のため、培養が困難と考えられたが、オルガノイド培養により大量に増幅することが可能であり、得られた細胞を用いて病理学的評価や遺伝子・タンパク発現解析、薬剤の感受性試験も可能であり、免疫不全マウスにおいては皮下腫瘍の形成が可能であった。今後はオルガノイドの品質評価を深め、臨床への応用をめざす。

研究成果の学術的意義や社会的意義

膵癌は約6割は切除不能の段階で発見され化学療法が治療の選択肢となるが、膵癌における薬剤の選択肢は限られている。遺伝子パネル検査が保険適応となり今後は遺伝子解析により選択肢が増えていく可能性はあるが、切除不能膵癌では得られる検体は微量の生検検体に限られており、様々な遺伝子解析に十分な量とはいえない。オルガノイド培養法は生体内に近い3次元の環境で細胞を培養し、細胞を増幅しエピゲノムを含めた様々な解析が可能となる他、新規薬剤を含めたスクリーニング的な薬剤感受性試験も行うことが可能であり、その意義は大きい。

研究成果の概要(英文)：Improvement of existing chemotherapy and development of new treatments are important for improving the prognosis of patients with inoperable pancreatic cancer. Recent advances in culture technology have enabled three-dimensional culture of normal and cancer cells, and are attracting attention as research materials that can replace conventional two-dimensional culture cell lines and Xenograft from surgical specimens with low success rates. It was thought that culture was difficult, because of the small amount of samples obtained in inoperable pancreatic cancer cases, but it is possible to amplify a large amount of biopsy-derived micro-samples by organoid culture, which enabled pathological evaluation, gene / protein expression analysis, and drug sensitivity test. Subcutaneous tumors can be formed in immunodeficient mice. In the future, we will further evaluate the quality of organoid and aim for its clinical application.

研究分野：gastroenterology

キーワード：オルガノイド 膵癌

1. 研究開始当初の背景

手術不能膵がん症例の予後改善のためには、「既存の化学療法の改良」と「新規治療の開発」の2つの選択肢がある。近年の培養技術の進歩により正常および癌細胞の3次元培養が可能となり、従来の2次元培養細胞株や成功率の低い手術検体 Xenograftを代替可能な研究材料として注目を集めている。

2. 研究の目的

申請者らは正常細胞の3次元培養および *in vitro* での癌化誘導で実績を有する (Onuma et al, PNAS, 2013) ため、その技術的優位性を生かして、ヒト膵がん生検由来微量検体をオルガノイド培養により大量に増幅する基盤技術をまず確立する。その上で、得られた膵癌オルガノイドを用いて、(1)既存の化学療法への効果予測、(2)新規治療法の有効性評価や治療標的の探索など膵癌の橋渡し研究を強力に推進することを本研究の目的とする。

3. 研究の方法

申請者らはすでに正常細胞から遺伝子導入により誘導した膵癌皮下腫瘍や膵癌モデルマウス (PDX1-Cre;KrasLSL -G12D/+;TGFB2f/f) 由来の膵癌 (図2) からの3次元培養オルガノイドの生成には十分な経験があるが、いずれも充分量の腫瘍を用いた場合である。ヒト微量の検体の場合に安定的にオルガノイド培養が可能かは慎重な検討が必要であり、事前にマウスモデル由来の腫瘍を用いて針生検検体を調整し、同様に培養可能となるように条件の最適化を行う (図2)。具体的には、細胞密度と細胞分散の程度が正常細胞でも腫瘍細胞でも上皮由来の初代培養には非常に重要なパラメーターであり、慎重に検討を行う。また、EUS-FNAからは腸管や膵臓の正常細胞、血球細胞、間質細胞等の混入も予想されるが、申請者らの培養法には血清を使用しないため間質細胞は短期間で死滅し、また膵癌の大多数の細胞はKras変異陽性であることが予想されるが、Kras活性化細胞はEGF非存在下でも増殖可能なため、非腫瘍上皮細胞はやはり短期間で死滅して除去されることをこれまでのマウス腫瘍での検討で確認しており、ヒト膵癌の検体においても同様に1週間程度で腫瘍細胞のみに純化されると見込んでいる。培養条件が確定した場合、ヒト検体へも応用し、生検検体に対して個別にオルガノイド培養を行い、凍結ストックを作成する。

化学療法の有効性が膵癌患者の個体レベルと細胞レベルで一致するかは、個別化医療の展開を考える上で極めて重要な点と言える。感受性試験のアッセイ法に関しては複数の条件が選択可能である。一般的に2次元培養では感受性が高く検出され3次元培養では低く検出されるとされるが、オルガノイドがマトリゲルの上に接着しているか中に埋め込まれているかでも当然感受性は変化する上に、*in vivo* では薬剤の到達度や間質の増生の程度なども影響することが予想される。そのため、最初の10例程度に関しては条件を網羅的に試みて、実際の患者での効果との比較検討を行う。最終的には相関性とアッセイの簡便性を総合的に勘案して感受性試験の標準法を決定する。また、PDXを作成し腫瘍原性を確認する。

4. 研究成果

手術不能膵がん症例の予後改善のためには、「既存の化学療法の改良」と「新規治療の開発」が過大であり、膵癌オルガノイドを用いて、既存の化学療法への効果予測、新規治療法の有効性評価や治療標的の探索など膵癌の橋渡し研究を強力に推進することを本研究の目的とし、本研究を開始した。EUS-FNAにて採取した生検検体に対して個別にオルガノイド培養を行い膵がん生検由来微量検体をオルガノイド培養により大量に増幅することが可能であった。年間症例数は、対象症例の同意が得られず年間10-20例ほどにとどまった。また、EUS-FNAからは腸管や膵臓の正常細胞、血球細胞、間質細胞等の混入も予想されたが、血清を使用しないため間質細胞はほとんどが死滅し、癌細胞優位な状態で培養することが可能であった。得られた細胞からは、80%の確率でPDXの作成が可能であり、生検検体由来細胞のみならず、皮下腫瘍からも再度細胞を採取し、薬剤感受性試験を始めとした各種解析が可能であった。皮下腫瘍を形成した細胞に関しては、異型腺管を形成し、膵癌として矛盾しない腫瘍を認めていた。遺伝子解析ではKRASの変異を認めており、検体中のkras変異は、皮下腫瘍を形成させることで、変異を有する細胞の割合は上昇しており、腫瘍のみが形成されていることが示された。ただし、培養自体の成功率は20%程度にとどまったため、検体の採取経路を生検だけでなく胆汁検体などの余剰検体も用いて行うことで、膵癌の症例数を増やすことに努めた。薬剤感受性試験に関しては、臨床に用いている抗がん剤を使用し、実際の患者での効果との比較検討を行った。薬剤感受性に関しては、臨床経過との相関がみられており、実験系の成功率を上げるという課題は残されるが、将来的には得られた細胞を用いることで、非侵襲的にドラッグスクリーニングも可能と考えられた。

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19、CK - 19 (共通)

5. 主な発表論文等

EUS-FNA 検体を用い 3 次元培養に成功した膵腺房細胞癌の一例 (第 27 回日本癌病態治療研究会)

胆汁検体を用いた胆膵癌オルガノイド培養法の樹立 (第 26 回日本消化器関連学会週間)

HUMAN ORGANOID MODELS OF INTRADUCTAL PAPILLARY MUCINOUS NEOPLASM (IPMN) DERIVED FROM PANCREATIC JUICE. (Digestive Disease Week 2018 (国際学会))

NEW APPROACH FOR ORGANOID CULTURE IN PATIENTS WITH ADVANCED BILIARY TUMOR. (Digestive Disease Week 2018 (国際学会))

〔雑誌論文〕(計 0 件)

〔学会発表〕(計 4 件)

〔図書〕(計 0 件)

〔産業財産権〕
出願状況 (計 0 件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
出願年：
国内外の別：

取得状況 (計 0 件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
取得年：
国内外の別：

〔その他〕
ホームページ等

6. 研究組織

(1) 研究分担者

研究分担者氏名：筆宝義隆

ローマ字氏名：Hippo Yoshitaka

所属研究機関名：千葉県がんセンター

部局名：研究所

職名：部長

研究者番号 (8 桁): 30359632

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19、CK - 19 (共通)

(2)研究協力者
研究協力者氏名：