

令和元年6月18日現在

機関番号：17701

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2016～2018

課題番号：16K19945

研究課題名(和文) 膵臓癌細胞由来オルガノイドモデルを用いた放射線化学療法耐性の機序解明

研究課題名(英文) Elucidation of chemoradiation therapy resistance mechanism using pancreatic cancer cell derived three-dimensional organoids

研究代表者

川崎 洋太 (KAWASAKI, YOTA)

鹿児島大学・附属病院・医員

研究者番号：90770420

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,000,000円

研究成果の概要(和文)：検体採取が比較的容易な食道癌細胞を用いた3D培養、オルガノイド形成を先ずは施行し、21例中15例(71.4%)で形成することができた。3D培養成功例では、有意差を持って臨床学的奏功度で進行(PD)もしくは安定(SD)症例が多く、部分奏功(PR)症例は少なかった。又、組織学的効果でも同様に、成功例では有意差を持ってGrade1症例が多く、Grade2+3症例は少なかった。3D培養にて作成出来たオルガノイドが薬剤感受性試験(5-FU用いた)に有用か検討したところ、実臨床での奏功度とオルガノイドの奏功度が有意な相関を示し、個別化治療の一助になる可能性について示唆出来た

研究成果の学術的意義や社会的意義

膵臓癌は極めて予後不良な消化器癌の一つであり、正しい個別化治療の選択が予後に作用する。今回、食道扁平上皮癌検体を用いた3D培養、オルガノイド形成に世界初で成功し、形成できたオルガノイドを用いた化学療法に対する奏功度が、実臨床と相関していたことは、食道癌個別化治療の確立に大きく寄与しうると考えられる。確立できた3D培養、オルガノイド形成方法を膵臓癌検体で利用することで、今後、膵臓癌個別化治療の確立にも大きく寄与しうる可能性がある。

研究成果の概要(英文)：We generated 3D organoids from biopsies representing tumors from therapy-negative esophageal cancer patients. Tumor-derived 3D organoids were grown successfully from 15 out of 21 patients (71.4%). Successful formation of tumor-derived 3D organoids was associated significantly with poor response to presurgical neoadjuvant chemotherapy or chemoradiation therapy in informative patients (P=0.0357). The single cell-based 3D organoid system may serve as a highly efficient platform to explore cancer therapeutics and therapy resistance mechanisms in conjunction with morphological and functional assays with implications for translation in personalized medicine.

研究分野：消化器外科

キーワード：膵臓癌 化学療放射線感受性 抗酸化能力 オルガノイドモデル 食道癌

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

#### 1. 研究開始当初の背景

膵臓癌は近年、手術と化学±放射線療法との組み合わせによる集学的治療が確立されつつある。しかし発見された段階で80%の患者が手術不能であること、手術可能であっても早期に転移を引き起こすため5年生存率5%前後と、いまだ極めて予後不良な消化器癌の一つである。近年、切除不能膵臓癌、borderline resectable 膵臓癌のみならず、切除可能膵臓癌においても術前化学±放射線療法施行後に手術を施行することで、予後延長に寄与したという報告が散見される。しかしながら、術前化学±放射線療法が奏功せず、手術不能になる場合もあり、化学±放射線療法効果予測を含めた治療の個別化が膵臓癌の治療成績の向上に重要と考えられる。

#### 2. 研究の目的

膵臓癌は極めて予後不良な消化器癌の一つとして知られ、治療は手術・化学療法・化学放射線療法による集学的治療が行われているものの、十分な治療効果が得られていないのが現状である。本研究は、膵臓癌の生検もしくは手術検体から三次元培養でオルガノイドモデルを作成し、個々の膵臓癌の有する抗酸化能力を評価する。さらに作成したオルガノイドの薬剤および放射線感受性あるいはを解析することで、抗酸化能力と強く関連し治療標的となりうる分子を同定し、新しい膵臓癌治療体系を確立することを目的とする。

#### 3. 研究の方法

膵臓癌検体採取は、最近では超音波内視鏡下生検でも得ることが可能であるが、確実な採取には摘出標本からの採取が必要となる。しかし、膵臓癌手術は術前にて化学療法もしくは化学放射線療法といった前治療が加わり、がん細胞内において様々な修飾が加わっている可能性が高い為、まずは比較的検体採取容易な食道扁平上皮癌(Esophagus Squamous Cell Carcinoma: ESCC)のオルガノイド培養が可能かどうかを実験した。方法として、未治療の進行食道扁平上皮癌患者において上部食道内視鏡下に、腫瘍部より組織を生検鉗子にて採取後、1時間以内に酵素処理などにて腫瘍を細断化マトリゲルと包埋し24 well プレートを使用し、EGF (Epidermal Growth factor)、Noggin、R-spondin など各種増殖因子を入れた培養液とともに培養10-12日後にできたオルガノイドの個数、形態、大きさを顕微鏡下にて評価し、さらに免疫染色による増殖能の評価を行うという手順とした。オルガノイドが3D培養にて形成出来た場合、本研究のメインテーマである、オルガノイドが個別化治療に寄与するか(オルガノイドが薬剤感受性試験として利用できうるか)の検討目的で、化学(放射線)療法に対する実臨床での奏功度と、オルガノイドの奏功度が一致するかを比較検討した。

#### 4. 研究成果

21例中15例(71.4%)にて食道扁平上皮癌からオルガノイドを形成することができた。形成に要する日数は、培養開始から10~14日と短期間で形成可能であった。HE染色にてオルガノイドを形態学的に分類し比較検討すると、低分化の扁平上皮癌に類似したオルガノイドでは免疫染色にて高い増殖能を示した。また、食道扁平上皮癌の細胞株でも同様の実験を行うと、低分化のSCCに類似した構造のオルガノイドを形成した。化学放射線療法前の食道扁平上皮癌生検検体の3D培養成功例と失敗例を比較すると、成功例では、有意差を持って臨床学的奏功度で進行(PD)もしくは安定(SD)症例が多く、部分奏功(PR)症例は少なかった(p=0.0357)。又、組織学的効果でも同様に、成功例では有意差を持ってGrade1症例が多く、Grade2+3症例は少なかった(p=0.0476)。3D培養にて作成出来たオルガノイドが薬剤感受性試験(5-FU用いた)に有用か検討したところ、実臨床での奏功度とオルガノイドの奏功度が有意な相関を示し、個別化治療の一助になる可能性について示唆出来た(Kijima T et al, Three-Dimensional Organoids Reveal Therapy Resistance of Esophageal and Oropharyngeal Squamous Cell Carcinoma Cells. Cell Mol Gastroenterol Hepatol. 2018 Sep 14;7(1):73-91)。

本研究期間中は、ターゲットとしていた癌腫である膵臓癌に対して、その検体採取困難性の問題で研究推進が難しかった。食道癌3D培養、オルガノイド形成で得た知識を活用し、膵臓癌でも同様の研究を今後推進していきたい。

#### 5. 主な発表論文等

[雑誌論文](計 20 件)

査読有

1. Kijima T, Nakagawa H, Shimonosono M, Chandramouleeswaran PM, Hara T, Sahu V, Kasagi Y, Kikuchi O, Tanaka K, Giroux V, Muir AB, Whelan KA, Ohashi S, Naganuma S, Klein-Szanto AJ, Shinden Y, Sasaki K, Omoto I, Kita Y, Muto M, Bass AJ, Diehl JA, Ginsberg GG, Doki Y, Mori M, Uchikado Y, Arigami T, Avadhani NG, Basu D, Rustgi AK, Natsugoe S. Three-Dimensional Organoids Reveal Therapy Resistance of Esophageal and Oropharyngeal Squamous Cell Carcinoma Cells. Cell Mol Gastroenterol Hepatol 2019;7(1):

73-91. 査読有

(オルガノイド発表論文：研究者と同一施設からの発表)

2. Kurahara H, Maemura K, Mataki Y, Sakoda M, Iino S, **Kawasaki Y**, Arigami T, Mori S, Kijima Y, Ueno S, Shinchi H, Natsugoe S. Significance of (18)F-Fluorodeoxyglucose (FDG) Uptake in Response to Chemoradiotherapy for Pancreatic Cancer. *Ann Surg Oncol* 2019;26(2): 644-651. 査読有
3. Khalid M, Idichi T, Seki N, Wada M, Yamada Y, Fukuhisa H, Toda H, Kita Y, **Kawasaki Y**, Tanoue K, Kurahara H, Mataki Y, Maemura K, Natsugoe S. Gene Regulation by Antitumor miR-204-5p in Pancreatic Ductal Adenocarcinoma: The Clinical Significance of Direct RACGAP1 Regulation. *Cancers (Basel)* 2019;11(3). 査読有
4. **Kawasaki Y**, Yang SJ, Choi GH, Han DH, Lee JH, Iino S, Sakoda M, Ueno S, Natsugoe S, Choi JS. New scoring system for resectable hepatocellular carcinoma with a maximum tumor size of  $\leq 5$  cm based on preoperative tumor factors. *HPB (Oxford)* 2019. 査読有
5. Fukuhisa H, Seki N, Idichi T, Kurahara H, Yamada Y, Toda H, Kita Y, **Kawasaki Y**, Tanoue K, Mataki Y, Maemura K, Natsugoe S. Gene regulation by antitumor miR-130b-5p in pancreatic ductal adenocarcinoma: the clinical significance of oncogenic EPS8. *J Hum Genet* 2019;64(6): 521-534. 査読有
6. Minami K, Hiwatashi K, Ueno S, Sakoda M, Iino S, Okumura H, Hashiguchi M, **Kawasaki Y**, Kurahara H, Mataki Y, Maemura K, Shinchi H, Natsugoe S. Prognostic significance of CD68, CD163 and Folate receptor-beta positive macrophages in hepatocellular carcinoma. *Exp Ther Med* 2018;15(5): 4465-4476. 査読有
7. Kurahara H, Maemura K, Mataki Y, Sakoda M, Iino S, **Kawasaki Y**, Mori S, Arigami T, Kijima Y, Shinchi H, Natsugoe S. Indication of extrahepatic bile duct resection for gallbladder cancer. *Langenbecks Arch Surg* 2018;403(1): 45-51. 査読有
8. Kurahara H, Maemura K, Mataki Y, Sakoda M, Iino S, **Kawasaki Y**, Arigami T, Mori S, Kijima Y, Ueno S, Shinchi H, Natsugoe S. Significance of Glucose Transporter Type 1 (GLUT-1) Expression in the Therapeutic Strategy for Pancreatic Ductal Adenocarcinoma. *Ann Surg Oncol* 2018;25(5): 1432-1439. 査読有
9. **Kawasaki Y**, Maemura K, Kurahara H, Mataki Y, Iino S, Sakoda M, Shinchi H, Natsugoe S. Usefulness of fluorescence vascular imaging for evaluating splenic perfusion. *ANZ J Surg* 2018;88(10): 1017-1021. 査読有
10. **Kawasaki Y**, Hwang HK, Kang CM, Natsugoe S, Lee WJ. Improved perioperative outcomes of laparoscopic distal pancreatectomy: modified lasso technique. *ANZ J Surg* 2018;88(9): 886-890. 査読有
11. Hozaka Y, Kurahara H, Mataki Y, **Kawasaki Y**, Iino S, Sakoda M, Mori S, Maemura K, Shinchi H, Natsugoe S. Successful treatment for severe pancreatitis with colonic perforation using video-assisted retroperitoneal debridement: A case report. *Int J Surg Case Rep* 2018;52: 23-27. 査読有
12. Ando K, Sakoda M, Ueno S, Hiwatashi K, Iino S, Minami K, **Kawasaki Y**, Hashiguchi M, Tanoue K, Mataki Y, Kurahara H, Maemura K, Shinchi H, Natsugoe S. Clinical Implication of the Relationship Between High Mobility Group Box-1 and Tumor Differentiation in Hepatocellular Carcinoma. *Anticancer Res* 2018;38(6): 3411-3418. 査読有
13. Sakoda M, Iino S, Mataki Y, **Kawasaki Y**, Kurahara H, Maemura K, Ueno S, Natsugoe S. Influence of a Shorter Duration of Post-Operative Antibiotic Prophylaxis on Infectious Complications in Patients Undergoing Elective Liver Resection. *Surg Infect (Larchmt)* 2017;18(2): 149-156. 査読有
14. Nepal P, Maemura K, Mataki Y, Kurahara H, **Kawasaki Y**, Hiwatashi K, Iino S, Sakoda M, Arigami T, Ishigami S, Shinchi H, Natsugoe S. Management of horizontal duodenal perforation: a report of three cases and review of literature. *Surg Case Rep* 2017;3(1): 119. 査読有

15. Nakajo A, Arima H, Hirata M, Yamashita Y, Shinden Y, Hayashi N, Kawasaki Y, Arigami T, Uchikado Y, Mori S, Mataka Y, Sakoda M, Kijima Y, Uenosono Y, Maemura K, Natsugoe S. Bidirectional Approach of Video-Assisted Neck Surgery (BAVANS): Endoscopic complete central node dissection with craniocaudal view for treatment of thyroid cancer. *Asian J Endosc Surg* 2017;10(1): 40-46. 査読有

16. Maemura K, Mataka Y, Kurahara H, Kawasaki Y, Mori S, Iino S, Sakoda M, Ueno S, Shinchi H, Natsugoe S. Effect of visual feedback during laparoscopic basic training using a box trainer with a transparent top. *Ann Gastroenterol Surg* 2017;1(2): 129-135. 査読有

17. Maemura K, Mataka Y, Kurahara H, Kawasaki Y, Iino S, Sakoda M, Ueno S, Arimura T, Higashi R, Yoshiura T, Shinchi H, Natsugoe S. Comparison of proton beam radiotherapy and hyper-fractionated accelerated chemoradiotherapy for locally advanced pancreatic cancer. *Pancreatology* 2017;17(5): 833-838. 査読有

18. Maemura K, Mataka Y, Kurahara H, Kawasaki Y, Iino S, Sakoda M, Uchikado Y, Arigami T, Uenosono Y, Mori S, Ueno S, Shinchi H, Natsugoe S. Gemcitabine and S-1 Induction Chemotherapy Followed by Chemoradiotherapy for Locally Advanced Pancreatic Cancers. *Anticancer Res* 2017;37(1): 233-237. 査読有

19. Kurahara H, Maemura K, Mataka Y, Sakoda M, Iino S, Kawasaki Y, Mori S, Kijima Y, Ueno S, Shinchi H, Takao S, Natsugoe S. Relationship between the surgical margin status, prognosis, and recurrence in extrahepatic bile duct cancer patients. *Langenbecks Arch Surg* 2017;402(1): 87-93. 査読有

20. Fukuhisa H, Sakoda M, Hiwatashi K, Iino S, Minami K, Hashiguchi M, Kawasaki Y, Kurahara H, Mataka Y, Maemura K, Shinchi H, Ueno S, Natsugoe S. Surgical treatment for the excluded bile leakage from Spiegel lobe after right hemihepatectomy: A case report. *Int J Surg Case Rep* 2017;39: 159-163. 査読有

〔学会発表〕(計 10 件)  
(2018 年)

1. Yota Kawasaki, et al. Simple and easy method to isolate main pancreatic duct during pancreatoduodenectomy : 13th IHPBA World Congress
2. Yota Kawasaki, et al. Simple and easy method to isolate main pancreatic duct during pancreatoduodenectomy : 30th Meeting of Japanese Society of Hepato-Biliary-Pancreatic Surgery
3. 川崎洋太, et al. fluorescence vascular imaging system を用いた脾臓血流評価の有用性 : 第 31 回日本内視鏡外科学会
4. 川崎洋太, et al. 切除可能肝細胞癌における新規 scoring system : 第 118 回日本外科学会
5. 川崎洋太, et al. 膵実質切離時の主膵管露出の工夫 : 第 80 回日本臨床外科学会

(2017 年)

1. Yota Kawasaki, et al. Benefit of using fluorescence vascular imaging for safe preservation of the spleen after distal pancreatectomy with the Warshaw technique : JSHPBS
2. Yota Kawasaki, et al. Surgical approach for GIST arising from 4th portion duodenum : 21st Asian Congress of Surgery
3. 貴島孝, 川崎洋太, et al. 食道扁平上皮癌におけるオルガノイド培養について : 日本消化器外科学会

(2016 年)

1. Yota Kawasaki, et al. Development of novel pancreaticogastrostomy after pancreaticoduodenectomy aiming for the safest pancreas reconstruction : 日本消化器外科学会
2. Yota Kawasaki, et al. Improved Perioperative Outcomes of Laparoscopic Distal Pancreatosplenectomy by Modified Lasso Technique : 第 8 回膵臓内視鏡外科研究会

〔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  
なし  
（2）研究居力者  
なし

科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属されます。