

令和 2 年 6 月 10 日現在

機関番号：12601

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2017～2019

課題番号：17K10517

研究課題名(和文) 微小環境を伴うヒト膵オルガノイドの再構成に基づく新規膵癌薬剤評価系の構築

研究課題名(英文) Development of anti-cancer drug evaluation method using human pancreatic organoids with microenvironment

研究代表者

上野 康晴 (Ueno, Yasuharu)

東京大学・医科学研究所・特任助教

研究者番号：60375235

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,500,000円

研究成果の概要(和文)：ヒト膵癌を対象とする新たな薬剤評価系を確立するため、癌微小環境を有するヒト膵癌組織の人為的再構成法、薬剤評価法について検討した。膵癌の代表的な細胞株を血管内皮細胞・間葉系細胞と三次元的に共培養すると、豊富な間質を有する組織体(オルガノイド)が再構成された。オルガノイド内の膵癌細胞の薬剤耐性を特異的かつ定量的に評価するため、ルシフェラーゼ遺伝子を導入したヒト膵癌細胞株を樹立し、この細胞と血管内皮細胞・間葉系細胞から薬剤評価用膵癌オルガノイドを創出する条件を確立した。癌オルガノイドは癌細胞のみから成る細胞凝集体に比べて高い薬剤耐性を示し、癌微小環境が再現されているものと考えられた。

研究成果の学術的意義や社会的意義

膵癌は予後不良な難治癌であり、新たな治療法の確立が急務である。膵癌に有効な薬剤開発を進めるためには膵癌の高い薬剤抵抗性を再現しうる評価系が必要不可欠であるが、薬剤耐性に関与する癌微小環境を人為的に再現する手法が確立されていない課題がある。本研究において確立した間質を有するヒト膵癌オルガノイドの再構成技術は、膵癌の精度の高い薬剤評価に有益と考えられ、膵癌の創薬開発が促進されることが期待される。

研究成果の概要(英文)：To establish a drug sensitivity evaluation system that reproduces the high drug resistance in human pancreatic cancer, we have developed a method for reconstructing human cancer organoids with a cancer microenvironment and a drug evaluation method. When a human pancreatic cancer cell line was three-dimensionally co-cultured with vascular endothelial cells and mesenchymal cells, a cancer tissue (organoid) with abundant stroma was reconstituted. A human pancreatic cancer cell line containing a luciferase gene was used to reconstruct a pancreatic cancer organoid with a stroma for drug sensitivity evaluation. Cancer organoids showed higher drug resistance than cell aggregates consisting of cancer cells alone, suggesting that the cancer microenvironment was reconstituted. We show that cancer organoids containing stroma are useful for modelling drug resistance in pancreatic cancer.

研究分野：幹細胞生物学

キーワード：癌オルガノイド 癌微小環境 治療抵抗性 薬剤評価

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

## 1. 研究開始当初の背景

膵がんは全ステージでの5年生存率が9%と低い代表的な難治がんである。膵がんの有効な治療薬の開発が緊喫の課題となっているが、既存の膵癌治療薬の効果は限定的であり新規治療薬の開発が必要不可欠である。一般的に、創薬開発ではがん細胞株を用いた *in vitro* での一次スクリーニング、*in vivo* での二次スクリーニングにより候補薬剤の絞り込みが実施されるが、がん細胞の薬剤感受性は *in vitro* と *in vivo* で大きく異なることが知られている。現在の *in vitro* 薬剤評価系においては、創薬開発初期のスクリーニングで有用な薬剤が脱落している可能性が考えられる。

他方、近年、癌細胞の薬剤感受性に癌微小環境が深く関与することが明らかとなっている。膵癌は他の癌に比べて豊富な間質を有し、膵癌間質に存在する癌関連繊維芽細胞・腫瘍血管を構成する血管内皮細胞などは膵癌の腫瘍微小環境の形成に深く関わる事が明らかになっている。前述した、*in vitro* と *in vivo* での薬剤感受性の乖離の要因は、*in vitro* において癌微小環境が再現されていないことが一因と考えられるため、膵癌の微小環境、特に癌間質を再現することができる新たな *in vitro* 薬剤評価系を確立し、高い治療効果を持つ薬剤の探索・評価が重要となっている。

## 2. 研究の目的

本研究では、独自に確立した間質を伴うヒト組織の人為的再構成技術(オルガノイド培養技術)を膵癌研究に応用し、間質を有した三次元ヒト膵癌組織(ヒト膵癌オルガノイド)の創出法を開発する。また、間質を有する三次元ヒト膵癌オルガノイドにおいて膵癌細胞の薬剤感受性を評価するための手法を確立する。

## 3. 研究の方法

申請者らは、本研究に先駆けて、正常なヒト実質細胞と間質細胞(血管内皮細胞や間葉系細胞)を適切な培養条件下で共培養することにより、複数の細胞で構成される三次元的なヒトオルガノイドを作製するための技術(ヒトオルガノイド再構成技術)を構築している(Cell Stem Cell, 2015)。本研究では、ヒトオルガノイド再構成技術を癌研究に応用し、間質を有するヒト膵癌オルガノイドの人為的再構成法の確立を進めた。

はじめに、様々な条件下(細胞混合比、培養条件、培養期間等)でヒト膵癌オルガノイドを再構成し、創出される膵癌オルガノイドの形態等を指標として至適培養条件を検索した。次いで、ヒト膵癌オルガノイドを対象とするスループットの高い薬剤評価法の確立に向け、均質なヒト膵癌オルガノイドを大量に作製するための手法を検討した。申請者らは、再生医療の研究開発において、小型のディンプルを持つ96ウエル型プレート上で肝臓オルガノイドを創出する条件を明らかにしている。本研究では、ヒト膵癌オルガノイドの再構成に適した再構成条件を検討した。なお、立体的なヒト膵癌オルガノイドを対象とする薬剤感受性評価では、膵癌オルガノイド内の膵癌細胞の残存数を簡易的に評価する手法を確立する必要がある。そこで、膵癌オルガノイド内のヒト膵癌細胞の検出法についての検討を進め、スループットの高い薬剤評価についての検討を行った。さらに、ヒト膵癌オルガノイドを用いた *in vivo* での薬剤評価に向け、ゼノグラフト形成に有効なヒト膵癌オルガノイドの再構成条件の検討、薬剤投与条件などを検討した。

## 4. 研究成果

研究に先駆け、ヒト膵癌組織の組織学的特徴を検証した。ヒト膵癌組織は  $\alpha$ SMA 等を発現する間質細胞が豊富に含まれることが確認された。

ヒト膵癌細胞株(CFPac1等)・ヒト血管内皮細胞・ヒト間葉系細胞を様々な条件(細胞混合比、培養条件、培養期間等)で三次元的に培養したところ、一定の条件下で培養することにより、培養直後から細胞凝集が生じ、間質を持つヒト膵癌オルガノイドが効率良く再構成さ

れた。ヒト膵癌細胞株・ヒト血管内皮細・ヒト間葉系細胞の3種類の細胞から再構成されたヒト膵癌オルガノイドを免疫不全マウスの背部皮下に移植したところ、ヒト膵癌組織に類似した  $\alpha$ SMA 陽性の間質細胞を豊富に含む組織が形成された。一方、ヒト膵癌細胞のみから成る膵癌細胞凝集体を免疫不全マウスの背部皮下に移植すると、間質に乏しい膵癌組織が形成された。ヒト膵癌オルガノイドは膵癌間質を再現する上で有益であることが明らかとなった。

次いで、ヒト膵癌オルガノイドの *in vitro* 薬剤評価手法を確立するための検討を進めた。膵癌オルガノイドは癌細胞と間質細胞から成るため、膵癌オルガノイドに対する薬剤感受性評価の際、薬剤耐性を示す膵癌細胞数の計測に労力を要する。近年、オルガノイドの評価においては、ルシフェラーゼ等の発光イメージングの有益性が示されつつある。そこでレンチウイルスベクターを用いてヒト膵癌細胞株にルシフェラーゼ遺伝子を導入し、LUC 安定発現株を得た上で、細胞外マトリクス上において、この細胞と未処置の血管内皮細胞・間葉系細胞と三次元的に共培養し、Luc ヒト膵癌オルガノイド（膵癌細胞特異的に LUC を発現するヒト膵癌オルガノイド）を得た。オルガノイド形成に用いる膵癌細胞数を変化させて膵癌オルガノイドを再構成し、ルシフェラーゼアッセイを行ったところ、オルガノイド内の膵癌細胞数に related LUC 活性が確認された。このルシフェラーゼアッセイによる *in vitro* 薬剤感受性評価系を用いて、間質細胞を有する Luc ヒト膵癌オルガノイド、あるいは、癌細胞のみから成る Luc ヒト膵癌凝集体を対象とする抗癌剤（ゲムシタピン）感受性評価を実施した。その結果、間質細胞を有する Luc ヒト膵癌オルガノイドは、同一細胞の膵癌細胞から構成される Luc ヒト膵癌凝集体に比べて高い薬剤耐性を示すことが明らかとなった。このことから、膵癌オルガノイド内では、膵癌の治療抵抗性に関与する癌微小環境が再現される *in vivo* が確認された。

さらに、スループットの高い薬剤評価に向け、細胞外マトリクスを用いずに均質の膵癌オルガノイドを安定的に創出する技術の開発を進めた。培養皿の底面に小型ディンプルを持つマルチウェル型プレートを用いることにより、均質のサイズのヒト膵癌オルガノイドを一期的に製造することが可能であることを確認した。

一方、薬剤動態等を加味した評価においては、担癌動物を用いた薬剤評価が有効である。そこで、ヒト膵癌オルガノイドに由来ゼノグラフトを対象とする *in vivo* 薬剤感受性評価法についての検討を進めた。間質を有するヒト膵癌オルガノイド、あるいは、ヒト膵癌凝集体を各々、免疫不全マウスの皮下に移植し、腫瘍サイズが  $100\text{mm}^3$  に達した時点から抗癌剤（ゲムシタピン）の腹腔内投与を行った。その結果、膵癌凝集体を移植したゼノグラフトはゲムシタピン投与により腫瘍サイズが抑制される一方、間質を有するヒト膵癌オルガノイドはゲムシタピン投与下においても腫瘍サイズの増加が観察された。

以上より、膵癌オルガノイドを用いて豊富な間質を持つヒト膵癌組織を再構成し薬剤評価に応用することで、高い薬剤耐性を持つ膵癌組織を対象とする薬剤評価が可能となった。今後、ヒト膵癌オルガノイドを対象とする薬剤評価を行うことにより、従来よりも治療効果の高い新規抗癌剤の開発が期待される。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計12件（うち査読付論文 10件／うち国際共著 5件／うちオープンアクセス 0件）

1. 著者名 Kuse Yoshiki, Taniguchi Hideki	4. 巻 28
2. 論文標題 Present and Future Perspectives of Using Human-Induced Pluripotent Stem Cells and Organoid Against Liver Failure	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Cell Transplantation	6. 最初と最後の頁 160S ~ 165S
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1177/0963689719888459	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Nie Yun-Zhong, Zheng Yun-Wen, Miyakawa Kei, Murata Soichiro, Zhang Ran-Ran, Sekine Keisuke, Ueno Yasuharu, Takebe Takanori, Wakita Takaji, Ryo Akihideo, Taniguchi Hideki	4. 巻 35
2. 論文標題 Recapitulation of hepatitis B virus?host interactions in liver organoids from human induced pluripotent stem cells	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 EBioMedicine	6. 最初と最後の頁 114 ~ 123
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.ebiom.2018.08.014	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 上野康晴、谷口英樹	4. 巻 17(03)
2. 論文標題 オルガノイド研究の動向と可能性	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 再生医療	6. 最初と最後の頁 22-37
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) なし	査読の有無 無
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 上野康晴、谷口英樹	4. 巻 39(4)
2. 論文標題 ヒト膵癌オルガノイドを用いた薬剤感受性評価系	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 胆と膵	6. 最初と最後の頁 1-5
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) なし	査読の有無 無
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

〔学会発表〕 計8件（うち招待講演 2件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 上野康晴、関根圭輔、森永聡一郎、宮城洋平、谷口英樹
2. 発表標題 オルガノイド再構成技術を活用したヒト膵癌薬剤抵抗性機構の解析
3. 学会等名 第46回日本臓器保存生物医学会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 上野康晴、関根圭輔、村田聡一郎、谷口英樹
2. 発表標題 再生医療を目指したヒューマンオルガノイド研究
3. 学会等名 第46回日本臓器保存生物医学会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 関根圭介、奥田諒、金子千夏、井上達也、碓井彩華、上野康晴、谷口英樹
2. 発表標題 微小環境を伴う三次元的癌組織の人為的創出
3. 学会等名 第77回日本癌学会学術総会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 谷口 英樹
2. 発表標題 創薬への応用を目指すヒューマン・オルガノイド研究の最前線
3. 学会等名 第4回再生医療産業化展（招待講演）
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 谷口 英樹
2. 発表標題 がん微小環境の再構成を目指すヒト膵癌オルガノイド創出技術の開発
3. 学会等名 第26回日本癌病態治療研究会（招待講演）
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 上野 康晴、奥田 諒、金子 千夏、碓井 彩華、関根 圭輔、谷口 英樹
2. 発表標題 微小環境を伴うヒト膵癌オルガノイドの再構築に基づく新規膵癌薬剤評価系の構築
3. 学会等名 第76回日本癌学会学術総会
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 関根 圭輔、奥田 諒、井上 達也、金子 千夏、碓井 彩華、上野 康晴、谷口 英樹
2. 発表標題 腫瘍微小環境を模倣するヒト膵癌オルガノイドは薬剤耐性を示す
3. 学会等名 第76回日本癌学会学術総会
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 奥田 諒、関根 圭輔、上野 康晴、佐藤 準也、高橋 正希、井上 達也、金子 千夏、碓井 彩華、谷口 英樹
2. 発表標題 癌微小環境を模倣した患者由来ヒト膵がんオルガノイドの創出
3. 学会等名 第76回日本癌学会学術総会
4. 発表年 2017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	谷口 英樹  (Taniguchi Hideki)  (70292555)	東京大学・医科学研究所・教授    (12601)	