

令和 5 年 7 月 6 日現在

機関番号：15401

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2017～2019

課題番号：17K10591

研究課題名(和文) 微小重力環境を用いた胃癌オルガノイドの確立と新規治療開発のための基盤的研究

研究課題名(英文) Basic research for gastric organoids using microgravity environment

研究代表者

田邊 和照 (Tanabe, Kazuaki)

広島大学・医系科学研究科(保)・教授

研究者番号：40379847

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)：本研究では、胃癌細胞株並びに胃癌臨床検体から癌オルガノイドの樹立をまず確立することに成功した。これを用いて免疫細胞接触を可能とするオルガノイドモデル作成を目指した検討を行った。その結果、免疫細胞接触可能となる培養系が確立できた。さらに重力可変装置を用いて各重力負荷変化によってオルガノイドの増殖力などが変化することが明らかとなった。これはインテグリンを介したMAPK経路の活性化が機序と考えられた。過重力環境(3G)下では従来より1.5倍の増殖速度が得られることから、臨床検体からオルガノイド作成時間を短縮できる可能性が示唆された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

胃癌臨床検体を用いたオルガノイド樹立の報告は最近いくつか行われるようになり、これらを用いた機能解析が行われつつある。これまでの癌細胞株を基盤とした新規薬剤開発には限界があり、患者本人の癌組織を用いた癌ゲノム医療、テーラーメイドの薬剤感受性試験が今後主流となっていくものと考えられる。癌オルガノイドを用いた薬剤感受性試験の意義について現在検証中であるが、本研究はそれに加え免疫細胞接触可能モデルを構築したという点で新規性があると考えられる。今後これらを用いて薬剤感受性、実際の臨床との相同性などを確認し新規治療開発の一助となるよう研究を継続したい。

研究成果の概要(英文)：Recently, some studies have been reported patient-derived GC organoids (GCOs) as personalised treatment for selecting effective chemotherapeutic drugs for patients. However, it takes time for the establishment of GCOs to enable the anticancer drug susceptibility test, and it has not yet reached a useful clinical application. In this study, we succeeded in promoting the x1.5 growth of the GCOs by changing the gravity using a 3D-clinostat (Gravite). When the GCOs that had undergone the change in gravity to promote growth were returned to normal gravity, they exhibited the same phenotype as the GCOs cultured in normal gravity again. Furthermore, since the GCOs showed an anticancer drug sensitivity equivalent to that of the GCOs cultured in normal gravity, there is a possibility of clinical application as a method for shortening the culture period of the GCOs for personalised treatment.

研究分野：消化器外科

キーワード：胃癌 化学療法 オルガノイド 免疫

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

高度進行胃癌の予後は未だ不良で、特に胃癌の特性である heterogeneity が胃癌の治療予測・治療抵抗性に関与している可能性がある。申請者らはこれまで抗がん剤の種類により臓器特異性があることを明らかにした(Tanabe et al. Ann Oncol 20151) 他)。このことはこれまでの胃癌細胞株を用いた胃癌治療開発では不十分であることを示しており、より生体に近い環境での研究が望まれていた。一方、佐藤らはマウス小腸からオルガノイドと呼ばれる生体内組織に似た構成要素を含む構造の三次元培養法を確立し、臨床検体からの大腸腫瘍オルガノイドを樹立した(Cell Stem Cell. 2016)。胃癌においても Seidilitz Tらにより 2018 年胃癌オルガノイドの樹立の報告がなされている(Gut. 2018)。オルガノイドは in vivo の臓器と同様に幹細胞を豊富に含むとされる。

オルガノイドを癌研究における利点として、

不死化の必要がない

臨床検体からの癌オルガノイドが作成可能

長期継代培養や凍結保存が可能 などが挙げられる。

申請者らは胃癌の heterogeneity を考慮すると患者の体内で生じている腫瘍動態についてオルガノイドを用いることでそれぞれの対象臓器ごとに詳細に解析できると考え、これまでに胃癌や大腸がんなどの消化器癌オルガノイドの樹立を行い(Sakamoto N et al. eLife. 2017)、さらに患者臨床検体からの胃癌オルガノイド培養システムの樹立もすでに確立した。胃癌オルガノイドと 5-Fu などの抗がん剤感受性についての報告がされている(Steele NG et al. Cell Mol Gastroenterol Hepatol 2018)が、免疫チェックポイント阻害剤やリンパ球など免疫細胞による細胞障害性の予測の評価法の開発が期待されている。しかしながら、通常のオルガノイド培養法においては、細胞外マトリックスであるマトリゲル内に包埋することが必要で、われわれの検討ではマトリゲル内にはリンパ球は侵入することはできなかった。これまでの報告では作成した癌オルガノイドを single cell 化した後にリンパ球と共培養するとした報告(Dijkstra KK et al. Cell 2018)はあるもののオルガノイドの特徴である 3 次元構造を保った状態での免疫療法感受性モデルは確立されておらず、3 次元培養下での免疫細胞接触を可能とするモデル開発が急務と考える。

2. 研究の目的

上記の背景および研究成果をもとに、未だ解決できていない免疫細胞接触可能な癌オルガノイドを用いた薬剤感受性システムを確立し、さらに臨床リアルタイムに行える癌オルガノイド薬剤感受性試験を臨床応用するための研究基盤を確立することを目的とする。

3. 研究の方法

胃癌オルガノイドモデルの確立を行い、これまで私達が明らかにしてきた CD24, CD137 を治療標的とした新規治療の可能性を検証し臨床応用へ展開するための研究基盤を確立することを目的として計画している具体的な研究項目は次のものである。

免疫細胞接触可能な胃癌オルガノイドモデルの確立とバイオマーカー探索

癌外科手術材料から胃癌組織のサンプルを採取する。これまで消化器癌オルガノイドについては大腸癌、膵癌での樹立の報告はあるが、胃癌については現在のところ認められず培養条件について検討していく必要がある。一般に胃癌は腸上皮化生を背景に発生する腸型胃癌と、固有胃腺

を背景に発生する胃型胃癌に大別される。これまでの検討から腸上皮化生粘膜は小腸や大腸粘膜の培養条件で増殖効率が高く、固有胃腺については胃の培養条件のみで増殖可能であることを確認している（図1）。また、胃癌組織は一般に heterogeneity な組織型を有していることから、以上のことを踏まえ、採取したサンプルを3つに分け、一方は胃もしくは小腸/大腸の条件下での増殖能や形態の違いについて検討を行う。一方は形態学的・免疫学的に胃型・腸型胃癌としての特性を確認する。

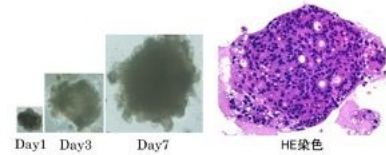


図1. 臨床検体より樹立した大腸癌オルガノイド

胃癌オルガノイドを用いたがん免疫化学療法感受性試験

試験

1.と併行して胃癌外科手術材料からの胃癌組織サンプルの一部を重力制御装置 Gravite®内で培養する。本機は培養試料を直行する2軸のまわりに360°回転させることで重力ベクトルを時間軸で積分することにより10-3Gの微小重力環境を実現し、培養液中心での三次元培養が可能となるのが特徴である(図2)。よって本研究では腫瘍細胞をマトリゲル™への包埋は行わず10-3Gの微小重力環境下での培養によりオルガノイドの作成を目指す。培養条件については微小重力による増殖シグナル等の影響があるためオルガノイド通常培養の条件とは異なる可能性があるが、細胞増殖や形態変化について通常培養との違いについて検討を行い適切な培養条件をもとめ微小重力環境下での胃癌オルガノイドモデルの確立を目指す。また、通常環境下、1%低酸素環境下でのオルガノイド形成能に違いがあるかについても合わせて解析を行う



図2. 微小重力環境下三次元培養

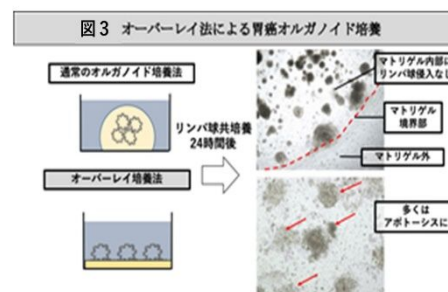
重力制御装置を利用したオルガノイド培養モデル確立と機序の解明

これまで、重力変化により間葉系幹細胞など重力変化で細胞増殖能や遺伝子発現変化が生じ、その変化は細胞の特徴によって異なることを明らかにしてきた。また重力による増殖力への影響はインテグリンを介したMAPK経路の活性化との結果が得られている。胃癌オルガノイドでは、過重力環境下では通常重力と比較し約1.5倍の増殖速度亢進が得られ幹細胞性も向上する事が確認された。通常、臨床検体採取から癌オルガノイドを作成し薬剤感受性試験を行えるまで約2ヶ月間要することから、重力制御装置を用いて作成期間を短縮できればリアルタイムな薬剤感受性試験の実現に貢献できると考える。最適な重力条件(2-3G)、過培養期間、薬剤感受性を行う際の通常重力への移行タイミングなど適切な条件設定について検討を行う。その上で通常重力培養と過重力培養での薬剤感受性の比較をフローサイトメトリー、MTSアッセイを行い、幹細胞マーカー、Wntシグナル、分化マーカー変化などqPCRにて確認する

4. 研究成果

免疫細胞接触可能な胃癌オルガノイドモデルの確立とバイオマーカー探索

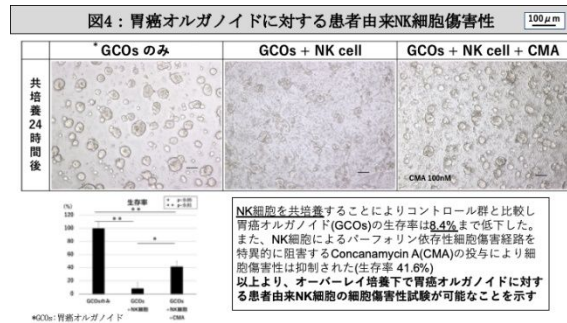
まず通常の癌オルガノイドが包埋されたマトリゲル内部にはリンパ球などの免疫細胞が浸潤していかないことを確認した。その上で免疫細胞接触可能な胃癌オルガノイドモデルの確立を行った(図3:オーバーレイ法)。通常のオルガノイドとオーバーレイ法にて作成したオルガノイドの性質について網羅的に遺伝子解析を行っ



たところ、ほぼ同等の遺伝子発現であることも確認できた。

胃癌オルガノイドを用いたがん免疫化学療法感受性試験

前 で確立された免疫細胞接触可能オルガノイドモデルを用いて実際に患者由来のNK細胞を用いて胃癌オルガノイドに対する細胞障害性を確認したところ、コントロール群と比較して著明にオルガノイドに対する障害性を認め、これにより我々の作成したオーバーレイ法による胃癌オルガノイド培養系は免疫反応系を評価しうるモデルであることを示すことができた(図4)。



重力制御装置を利用したオルガノイド培養モデル確立と機序の解明

これまで、重力変化により間葉系幹細胞など重力変化で細胞増殖能や遺伝子発現変化が生じ、その変化は細胞の特徴によって異なることを明らかとなっており、胃オルガノイドにおいても重力変化によって増殖力への影響やその機序について明らかとするための検討をつづける。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計4件（うち査読付論文 3件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 2件）

1. 著者名 Misumi T, Tanabe K, Fujikuni N, Ohdan H	4. 巻 13
2. 論文標題 Stimulation of natural killer cells with rhCD137 ligand enhances tumor-targeting antibody efficacy in gastric cancer.	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 PLoS One	6. 最初と最後の頁 e0204880
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1371/journal.pone.0204880	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -
1. 著者名 Yamaguchi K, Yoshida K, Tanahashi T, Takahashi T, Matsushashi N, Tanaka Y, Tanabe K, Ohdan H	4. 巻 21
2. 論文標題 The long-term survival of stage IV gastric cancer patients with conversion therapy	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Gastric Cancer	6. 最初と最後の頁 315-323
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1007/s10120-017-0738-1	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 太田浩志, 田邊和照, 大段秀樹	4. 巻 44
2. 論文標題 腫瘍オルガノイド研究の現状と展望	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Medical Science Digest	6. 最初と最後の頁 232-235
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 Tanabe K, Takahashi M, Urushihara T, Nakamura Y, Yamada M, Lee SW, Tanaka S, Miki A, Ikeda M, Nakada K.	4. 巻 23
2. 論文標題 Predictive factors for body weight loss and its impact on quality of life following gastrectomy.	5. 発行年 2017年
3. 雑誌名 World J Gastroenterol	6. 最初と最後の頁 4823-4830
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.3748/wjg.v23.i26.4823	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -

〔学会発表〕 計0件

〔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	大段 秀樹 (Ohdan Hideki) (10363061)	広島大学・医系科学研究科(医)・教授 (15401)	
研究分担者	弓削 類 (Yuge Rui) (20263676)	広島大学・医系科学研究科(保)・教授 (15401)	
研究分担者	坂本 直也 (Sakamoto Naoya) (20571798)	広島大学・医系科学研究科(医)・助教 (15401)	

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------