

令和 6 年 6 月 23 日現在

機関番号：32206

研究種目：基盤研究(C)（一般）

研究期間：2018～2023

課題番号：18K07918

研究課題名（和文）膵癌組織由来オルガノイド培養系のゲノム医療への応用

研究課題名（英文）Utilization of organoid culture system for pancreatic cancer genome analysis

研究代表者

樋口 肇 (Higuchi, Hajime)

国際医療福祉大学・医学部・主任教授

研究者番号：20306682

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,400,000円

研究成果の概要（和文）：膵癌は間質が豊富で腫瘍DNA検体を採取することが困難である。本研究では、膵癌クリニカルシーケンス検査のための検体採取法を検討した。癌組織由来のオルガノイド培養系を確立したが、クリニカルシーケンスにおける有用性は未だ確立できなかった。一方、超音波内視鏡下組織採取法（EUS-TA）により採取した組織検体を用いてクリニカルシーケンス検査を行い、19ゲージ穿刺針を用いて採取したEUS-TA検体における全エキソーム解析は5例中5例（100%）で成功した。今後、EUS-TAによる組織採取の効率を高め、全エキソーム解析あるいは全ゲノム解析に使用可能な良質なDNA検体を採取する方法を確立する必要がある。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究は、治療困難かつ予後不良な悪性腫瘍である膵癌に対するprecision medicineの精度向上のための基礎的検討である。KRASがドライバー遺伝子として大部分を占める膵癌においては、現時点ではクリニカルシーケンスの意義は大きくはない。しかしながら、新規薬剤（抗KRAS薬を含む）の開発に伴い、感受性因子あるいは抵抗性因子の探索や併存するドライバー変異の探索など、将来的に重要性が増すと考えられる。

研究成果の概要（英文）：Clinical sequence is expected to pancreatic cancer precision medicine. We investigated the technology to obtain pancreatic cancer DNA for clinical sequencing. Although we developed an organoid culture system derived from pancreatic cancer tissue, its usefulness in clinical sequencing has not yet been established. In contrast, we found an endoscopic ultrasonography-guided tissue acquisition (EUS-TA) with 19 gauge needle effectively obtained tissue samples. Whole exome sequencing was succeeded in 100% of the 5 cases tested. In the future, it is necessary to improve the efficiency of tissue collection using EUS-TA and establish a method to collect high-quality DNA samples that can be used for whole exome analysis or whole genome analysis.

研究分野：clinical oncology

キーワード：膵癌 オルガノイド EUS-TA クリニカルシーケンス

### 1. 研究開始当初の背景

膵癌に対する薬物療法の成績は近年改善傾向である。一方で、これらの治療に対して不耐・不応となる例も多く、切除不能進行膵癌の治療成績はいまだ不良である。大腸癌に対して効果をあげている抗 VEGF 薬あるいは抗 EGFR 薬、あるいは胃癌に対して効果をあげている抗 HER2 薬は、膵癌に対しては有効性が証明されずそれらの治療薬開発の多くは現時点では失敗に終わっている。さらに、多くの癌種において有効性が期待されている免疫チェックポイント阻害剤(抗 PD-1 薬、抗 PD-L1 薬、抗 CTLA-4 薬)も、膵癌に対する有効性は証明されておらず、有効性予測のためのバイオマーカー開発などが重大な課題として残っている。このような状況下において、膵癌に対してもゲノム遺伝子解析に基づく治療薬選択という治療戦略が検討され始めており、Precision Medicine として大きな期待を集めている。しかし、膵癌に対するゲノム医療において、ゲノム遺伝子解析のための検体調整法や治療標的分子の同定・選択、選ばれた治療標的分子に対する治療薬の効果ならびに作用機序など、多くの課題が残されている。

膵癌は間質が豊富な腫瘍であり、がん遺伝子パネル検査をはじめとするがんゲノム解析検査において、検体中の腫瘍細胞含有率が低いことが問題となり、少ない検体から効率よくゲノム DNA を採取する技術の開発が望まれている。多くの膵癌症例は初診時より切除不能と診断され、超音波内視鏡下組織採取法(EUS-TA)により組織診断が行われる。そのため、手術検体に比べて得られる DNA 量が少ない EUS-TA 検体を用いた検体をゲノム NA 解析に用いることが可能であるかという点も、重要な問題である。

### 2. 研究の目的

本研究では、膵癌ゲノム遺伝子解析における検体採取において、初代オルガノイド培養系が応用可能であるか、オルガノイド培養系を用いた薬剤感受性検査が抗腫瘍効果予測に有用であるかを検討することを、当初の目的とした。また、超音波内視鏡下穿刺法により採取された組織検体を用いた遺伝子パネル検査ならびに全エクソーム解析検査が可能であるかを検討することを目的とした。

### 3. 研究の方法

オルガノイド培養系は、膵癌組織をコラゲナーゼ処理後、collagen enriched-Matrigel へ包埋し、無血清、bFGF 20 ng/ml、EGF 20 ng/ml、HGF 5 ng/ml、R-spondin-1 500 ng/ml、BSA 1.8%、Wnt3A 100 ng/ml を基本条件として培養を行った。得られたオルガノイドを用いた薬剤感受性評価の検討は、細胞内 ATP 測定アッセイ (Cell titer-Glo assay) を用いた。

### 4. 研究成果

膵癌組織を用いたオルガノイド培養系を確立し、得られたオルガノイドを用いて ATP 測定アッセイを用いた薬剤感受性評価を行う実験系を確立した(図 1A, B)。キナーゼ阻害剤である Dasatinib は、膵癌由来オルガノイド (PAX260 および PAX339) に対して用量依存性に用量依存性の細胞障害性を示し、それらを Cell titer-Glo assay により定量的に評価することが可能であった。

また、得られたオルガノイドより DNA を抽出し、遺伝子解析に供した。しかしながら本検討における初期の解析により、EUS-TA により得られた少量の検体を用いた全ゲノム解析において、オルガノイド培養系を経由することなく良好なエクソームシーケンス結果が得られた。2019 年 4 月より 2023 年 3 月までに、EUS-TA により得られた組織を用いて遺伝子検査を試みた 11 症例を対象に解析を行ったところ、全エクソーム解析を試みた 6 症例においては、6 例(100%)で解析に成功した。また、その他の 5 症例においては遺伝子パネル検査を試みたが、胃癌術後のため EUS による穿刺経路が確保できなかった 1 例を除いて、全例解析に成功した。

解析により得られた遺伝子異常は、KRAS、

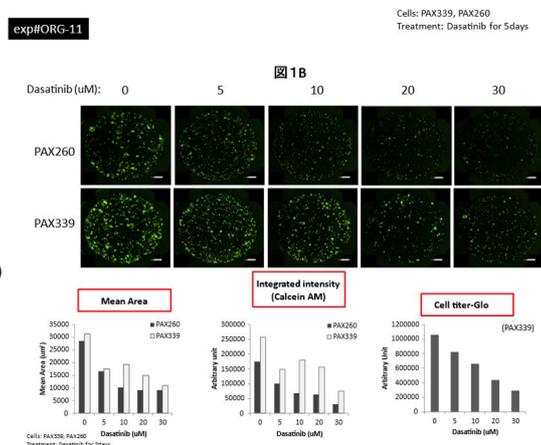
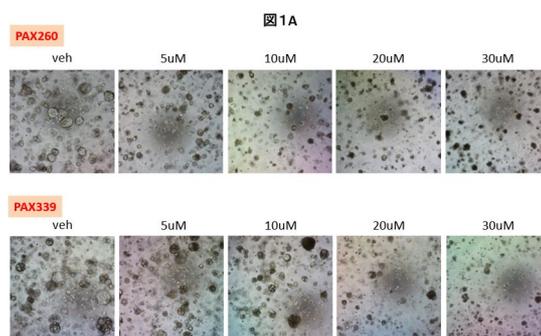
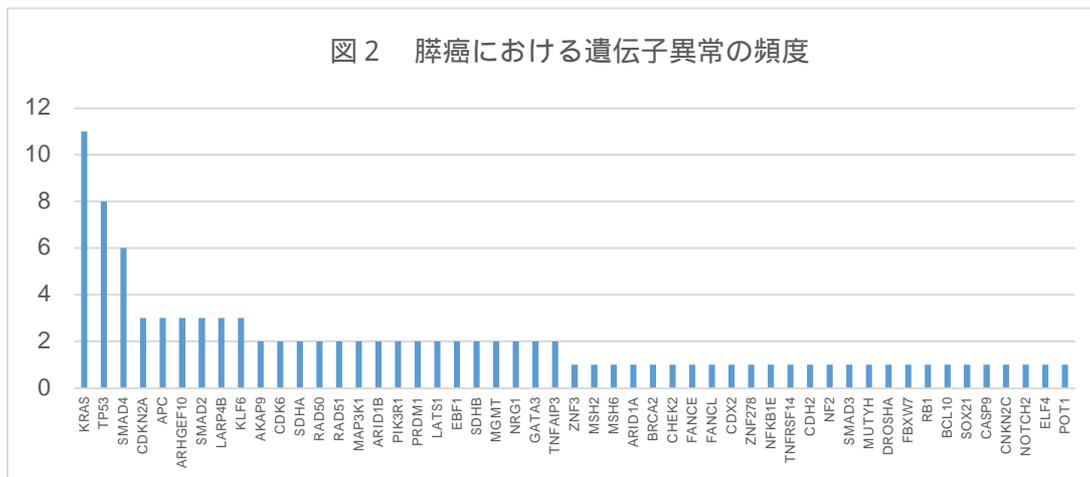


図2 膵癌における遺伝子異常の頻度



TP53、SMAD4、CDKN2A のほかに、APC、ARHGGEF10、SMAD2、KLF6、CDK6、RAD50/51、MAP3K1、ARID1B、PIK3R1、PRDM1、MGMT、NRG1、GATA3、ZNF3、MSH2、MSH6、ARID1A、BRCA2、CHEK2、FANCE、FANL、CDX2 などを含む多彩な遺伝子にわたり、その多くは少数例にみられるコピー数変化（増幅あるいは減弱）であった（図2）。

膵癌組織において、遺伝子パネル検査のみならず全エクソームシーケンス検査を行うことが可能であり、超音波内視鏡下生検により採取された少量の組織検体においても解析成功率は高く、実施可能であることが明らかになった。膵癌組織由来オルガノイド培養技術は、ゲノムDNA解析にも応用可能と考えられるものの、培養に要する期間や経費の問題、また培養に伴う付加的遺伝子変異などの問題もあり、今後一層の検討が望まれる。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計2件（うち査読付論文 1件/うち国際共著 1件/うちオープンアクセス 0件）

|  |                     |
|--|---------------------|
| 1. 著者名<br>樋口 肇                         | 4. 巻<br>34          |
| 2. 論文標題<br>オルガノイド培養系と膵癌個別化治療への応用       | 5. 発行年<br>2019年     |
| 3. 雑誌名<br>BIO Clinica                  | 6. 最初と最後の頁<br>85-88 |
| 掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子）<br>なし          | 査読の有無<br>無          |
| オープンアクセス<br>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<br>-           |

|   |                       |
|---|-----------------------|
| 1. 著者名<br>Kobayashi-S Suzuki-M Ueno-M Maruki-Y, Okano-N, Todaka-A, Ozaka-M Tsuji-K Shioji K Do- K Kojima-Y Tsumura-H Tanaka-K Higuchi-H Kawabe-K Imaoka-H Yamashita-T Miwa-H Nagano-H Arima-S Hayashi-H Naganuma-A Yamaguchi-H Hisano-T Umemoto-K Ishii-S Nakashima-K Suzuki-R Kitano-Y Misumi-T Furuse-J Ishii-H | 4. 巻<br>27            |
| 2. 論文標題<br>Comparing the Efficacy and Safety of Gemcitabine plus Nab-Paclitaxel versus Gemcitabine Alone in Older Adults with Unresectable Pancreatic Cancer  | 5. 発行年<br>2022年       |
| 3. 雑誌名<br>Oncologist . 2022 Oct 1;27(10):e774-e782  | 6. 最初と最後の頁<br>774-782 |
| 掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子）<br>10.1093/oncolo/oyac157   | 査読の有無<br>有            |
| オープンアクセス<br>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<br>該当する          |

〔学会発表〕 計5件（うち招待講演 0件/うち国際学会 2件）

|  |
|--|
| 1. 発表者名<br>Katsuhito Takahashi, Yasutomo Miyaji, Hajime Higuchi, Yoshihiro Komohara, Jun Yashima, Hiromasa Yamamoto, Ken Suzawa, Yuko Takahashi, Shinichi Toyooka, Hiroyuki Narahara, Junko Yotsumoto, Yu Oyama, Yasuo Ono, Satoshi Teraoka, Shinsuke Aida |
| 2. 発表標題<br>Genetic abnormalities and aberrant expression of genes involved in chromosome segregation and mitosis in patients with chromosomally unstable malignant soft tissue tumors harboring extensive somatic loss-of-heterozygosity (LOH).            |
| 3. 学会等名<br>American Society of Clinical Oncology (ASCO) 2022 annual meeting (国際学会)   |
| 4. 発表年<br>2022年  |

|   |
|---|
| 1. 発表者名<br>1.Satoshi Kobayashi, Motoko Suzuki, Makoto Ueno, Yuta Maruki, Junji Furuse, Akiko Todaka, Masato Ozaka, Kunihiro Tsuji, Kazuhiko Shioji, Keitaro Doi, Yasushi Kojima, Hidetaka Tsumura, Kazunari Tanaka, Hajime Higuchi, Ken Kawabe, Takeharu Yamanaka, Hiroshi Ishii. |
| 2. 発表標題<br>Gemcitabine plus nab-paclitaxel versus gemcitabine alone in elderly patients aged 76 years or older with unresectable pancreatic cancer: A propensity score-matched multicenter prospective observational study.   |
| 3. 学会等名<br>American Society of Clinical Oncology (ASCO) 2021 annual meeting (国際学会)  |
| 4. 発表年<br>2021年   |

|   |
|---|
| 1. 発表者名<br>高橋 克仁, 宮地 康僚, 樋口 肇, 菰原 義弘, 相田 真一, 山本 寛斉, 諏澤 憲, 高橋 侑子, 豊岡 伸一, 楢原 啓之, 四元 淳子, 大山 優, 矢嶋 淳, 大野 烈士, 寺岡 慧 |
| 2. 発表標題<br>悪性軟部腫瘍の免疫ゲノムプロファイリング LOHはT・Bリンパ球浸潤と生存に相関する   |
| 3. 学会等名<br>第58回日本癌治療学会学術集会  |
| 4. 発表年<br>2020年   |

|  |
|--|
| 1. 発表者名<br>片岡 幹統, 樋口 肇                           |
| 2. 発表標題<br>当院における免疫チェックポイント阻害剤(ICI)と消化管関連irAEの現状 |
| 3. 学会等名<br>日本消化管学会                               |
| 4. 発表年<br>2021年                                  |

|   |
|---|
| 1. 発表者名<br>高橋 克仁, 元木 文子, 樋口 肇, 佐野 弘子, 土居 浩一, 能勢 直弘, 坂本 武郎, 豊岡 伸一, 山本 寛斉, 正木 紀行, 相田 真介, 矢嶋 淳, 寺岡 慧 |
| 2. 発表標題<br>希少がん・軟部肉腫のMSIプロファイリングとゲノム情報に基づくペンプロリズマブ治療  |
| 3. 学会等名<br>第57回日本癌治療学会学術集会  |
| 4. 発表年<br>2019年   |

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

|               | 氏名<br>(ローマ字氏名)<br>(研究者番号)                            | 所属研究機関・部局・職<br>(機関番号)                       | 備考 |
|---------------|--|---|----|
| 研究<br>分担<br>者 | 高橋 克仁<br><br>(Takahashi Katsuhito)<br><br>(40211338) | 国際医療福祉大学・国際医療福祉大学三田病院・教授<br><br><br>(32206) |    |

6. 研究組織（つづき）

|                   | 氏名<br>(ローマ字氏名)<br>(研究者番号)                        | 所属研究機関・部局・職<br>(機関番号)                      | 備考 |
|-------------------|--|--|----|
| 研究<br>分<br>担<br>者 | 潮見 隆之<br><br>(Takayuki Shiomi)<br><br>(80348797) | 国際医療福祉大学・医学部・教授<br><br><br><br><br>(32206) |    |

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 |
|---------|---------|
|         |         |