

令和 5 年 6 月 5 日現在

機関番号：14401

研究種目：若手研究

研究期間：2018～2022

課題番号：18K16307

研究課題名（和文）オルガノイドを用いた食道癌由来エクソソーム膜蛋白の網羅的解析とバイオマーカー探索

研究課題名（英文）Comprehensive proteomic analysis of exosomes and biomarker development with patient derived organoids from ESCC patients

研究代表者

原 豪男（HARA, TAKEO）

大阪大学・大学院医学系研究科・招へい教員

研究者番号：00781775

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,200,000円

研究成果の概要（和文）：食道扁平上皮癌患者由来オルガノイドの培養上清を回収して、Exosomeの分離を試みたが十分なExosomeの回収は困難であった。そこでまずオルガノイドの培養効率の引き上げを試みた。培養液中のp38 MAPK Inhibitorおよびいくつかの成分を除去することでオルガノイド形成率の改善を認めた。形成したオルガノイドはIHC、PCR、Western blottingにて評価し、患者検体の性質と相違がないことを確認した。さらに培養後の経時的な増殖能をWST-1 assayで評価し、Day7-11の培養上清がExosomeの回収に最も適していることを同定した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

オルガノイド培養では患者由来腫瘍細胞をディッシュ上で培養し、直接アッセイに利用可能であり、将来的に個別化医療への応用も期待される。様々な癌腫でオルガノイド培養の報告があるが、食道扁平上皮癌(ESCC)に対する報告はほとんどなく、培養効率も不十分でさらなる改良が望まれる。今回我々はオルガノイド培養からESCC由来のExosomeの分離を試みたが、培養効率が不十分で分離困難であった。しかしオルガノイド培地内の成長因子の調整で培養効率の改善が可能となった。本研究で改良されたオルガノイド培養は、Exosomeの分離のみならず、感受性試験やオルガノイドバンクといった様々な研究に応用可能と考えられる。

研究成果の概要（英文）：We collected the supernatant from patient derived organoid, and attempted to isolate exosome, but we could not get enough amount of exosome. So, we tried to improve the organoid formation rate with adjusting the component of organoid media. We investigated which component is essential for esophageal organoid, and decided to remove some components, including p38 MAPK inhibitor from organoid media. After improvement of organoid media, we found the organoid formation rate was improved more than 70%. Organoids were harvested and assessed the similarities with original cancer by IHC, PCR-RT, Western blotting, and we confirmed the organoids heritage the characteristics of original cancer. Next, we assessed the proliferation of organoid after seeding, and confirmed the peak of proliferation is Day 7 and the best term to collect the supernatant is Day7-11.

研究分野：Cancer biology

キーワード：Organoid Exosome Biomarker ESCC

1. 研究開始当初の背景

進行食道癌は高率にリンパ節転移・再発を来す予後不良の疾患である。再発診断では一般的に画像検査や血液検査が用いられるが診断に苦慮する場面も多く、より精度の高い診断方法やバイオマーカーの発明が望まれている。近年低侵襲の採血検査のみで癌の存在および遺伝子情報を評価するリキッドバイオプシーが注目されている。リキッドバイオプシーは採血検査により血中を循環する腫瘍細胞(CTC)や腫瘍 DNA(ctDNA)、Exosome 等を採取し腫瘍の有無や遺伝子変異等を同定する検査である。すでに海外では肺がんなど一部の癌腫で承認されており、従来の侵襲的な生検に代わる低侵襲性検査として期待されている。特に Exosome は比較的に入血中内でも安定しており、微小病変の診断や治療効果予測の高精度バイオマーカーとして期待されるが未だ臨床応用には至っていない。Exosome 研究における障壁の一つに入血中内の Exosome には正常細胞および腫瘍由来 Exosome が混在していることが挙げられる。腫瘍由来 Exosome を選択的に分離することに、正確な癌の遺伝子変異や予後予測が可能となり臨床応用の実現が期待される。

本研究では佐藤らが 2011 年に大腸上皮・大腸癌での長期間培養を報告した特殊な培地下での三次元培養法(オルガノイド培養)を用いて、正常細胞および腫瘍細胞をそれぞれ初代培養し、初代培養した正常および腫瘍細胞から Exosome をそれぞれ分離することを計画した。このオルガノイド培養では、採取した細胞を生体内の基底膜成分を模倣したマトリジェル内に包埋し、R-spondin、EGF、Noggin、Wnt など様々な因子を添付した培地で培養する。培養された細胞はマトリジェル内でオルガノイドと呼ばれる三次元組織構造体を形成することが知られている。

我々は 2016 年に倫理委員会の承認を受けた後、食道癌および正常食道上皮の初代培養を開始した。サンプルの処理や培地内添付因子の条件設定を行い、2017 年 6 月にオルガノイド培養を用いた食道癌初代培養を確立した。

2. 研究の目的

我々が開発した食道癌のオルガノイド培養をさらに改良し、Exosome の分離、感受性試験、個別化医療やバイオバンクなどに応用可能な研究ツールとして確立させること。食道癌由来 Exosome の特異マーカーを同定し、新たな再発診断および治療効果予測のバイオマーカーを開発すること。

3. 研究の方法

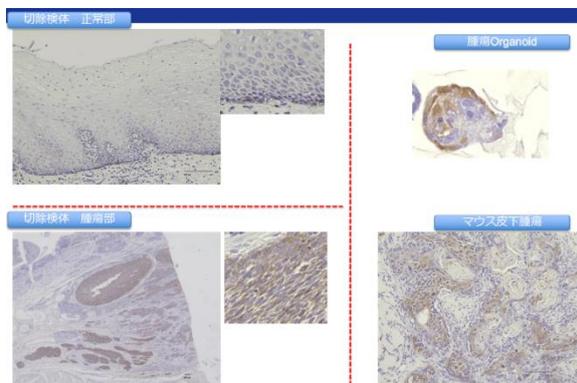
患者から採取した腫瘍細胞および正常上皮細胞をオルガノイド培養し、その培養上清を回収した後、培養上清から Exosome の分離を行う。Exosome の抽出は前実験で効率が良かった超遠心法を使用する。抽出した Exosome は nano sight で蛋白などの不純物が混じっていないか確認した後、Western blot 法で CD63, CD81, CD9 の発現を確認する。分離した Exosome は iTRAQ 法で膜蛋白の網羅的解析を行う。食道癌由来の Exosome で特異的に発現している膜蛋白を同定した後、バイオマーカーとしての有用性を検証する。

4. 研究成果

まず我々は患者より採取した食道扁平上皮癌細胞をオルガノイド培養した後、培養上清を回収して、超遠心法による Exosome の分離を試みたが、初代培養で形成したオルガノイドの数が十分ではなく、Exosome の回収は不可能であった。

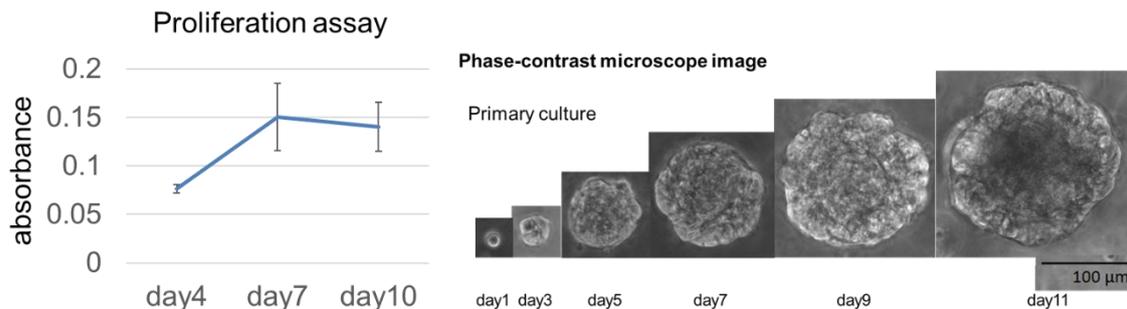
そこで我々はオルガノイド培養を改良することを余儀なくされた。元々このオルガノイド培養の培地は大腸正常上皮を培養するのに必要な組成で作られていたため、これらの付加されている因子が本当に食道扁平上皮癌に必要なかそれぞれ検証を行った。その結果 p38 MAPK inhibitor をはじめいくつかの因子は食道扁平上皮癌のオルガノイド培養に必要でないことが分かった。さらにそれらの因子を除去したオルガノイドメディアではより形成率が改善することを発見した。

この新たに作成した培地で形成した食道扁平上皮癌のオルガノイドの再現性はオリジナルの腫瘍および PDX で形成した腫瘍と HE スライドおよび IHC (Ki67, SOX2, p53, CD44, ALDH1) を用いて比較し検証した。右図に示す様に、それぞれのサンプルの IHC 染色 (ALDH1) を行ったところ、オリジナル腫瘍と同様にオルガノイドも ALDH1 の発現を認めた。一方で正常上皮では ALDH1 の発現はほとんど認めなかった。



次に Exosome の分離に最適な培養日数を決定するために培養後の経時的な増殖能を WST-1 assay および CellTiter-Glo Assay で評価し、Day7 に増殖能がプラトーに達することを同定した。今後は Day7-11 で培養液の上清から Exosome の分離を行うこととした。

2022 年度において Total16 例のオルガノイド培養を行い、内 12 例でオルガノイドの形成を認めた (形成率 75%)。これらのオルガノイドから回収した培養上清は保存しており、今後 Exosome の分離を行う予定としている。



また我々は同一患者より術前治療前後、術後の 3 回の採血を行い、血球成分を除去した血しょうの保存を行っており、これらの検体は食道扁平上皮癌の特異マーカーを同定した後の Validation として使用する予定である。

5. 主な発表論文等

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

| | |
|--|-----------------------|
| 1. 著者名 Kijima Takashi, Nakagawa Hiroshi, Shimonosono Masataka, Chandramouleeswaran Prasanna M., Hara Takeo, et al. | 4. 巻 7 |
| 2. 論文標題 Three-Dimensional Organoids Reveal Therapy Resistance of Esophageal and Oropharyngeal Squamous Cell Carcinoma Cells | 5. 発行年 2019年 |
| 3. 雑誌名 Cellular and Molecular Gastroenterology and Hepatology | 6. 最初と最後の頁 73 ~ 91 |
| 掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.jcmgh.2018.09.003 | 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1件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件）

| |
|--|
| 1. 発表者名 原 豪男 |
| 2. 発表標題 The chemosensitivity test using organoids culture in esophageal squamous cell carcinoma |
| 3. 学会等名 第77回日本癌学会学術総会 |
| 4. 発表年 2018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 |
|---------------------------|-----------------------|----|
|---------------------------|-----------------------|----|

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