

令和 4 年 5 月 9 日現在

機関番号：32612

研究種目：基盤研究(C)（一般）

研究期間：2019～2021

課題番号：19K08610

研究課題名（和文）肺癌オルガノイドライブラリーを用いた新規治療標的の同定

研究課題名（英文）Establishment of lung cancer and normal lung organoid library

研究代表者

浜本 純子（Hamamoto, Junko）

慶應義塾大学・医学部（信濃町）・特任助教

研究者番号：40570239

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,300,000円

研究成果の概要（和文）：申請者は、現在までに100を超える肺癌臨床検体からオルガノイドライブラリーを樹立した。さらに、同一患者由来の非癌部肺からの正常肺オルガノイドライブラリー樹立に関しては、気道は2015年、肺胞typeIは2017年にそれぞれ培養方法確立が報告されたが、肺胞typeIに分化する肺胞typeIIオルガノイドの培養が可能になったのは2020年で、申請者らを含む3つのグループがほぼ同時に発表した。肺腺癌及び小細胞肺癌の一部について各種omics解析により分子異常を同定し、それに伴うフェノタイプの関連を明らかにして、新たな治療標的を同定することができた。

研究成果の学術的意義や社会的意義

オルガノイド樹立の試みは世界各国で行われ始めているが、我々は外科手術だけでなく様々な検査検体からもオルガノイド樹立を試みて成功しており、これらの技術は学術的独自性があるだけでなく、侵襲性の低い検体採取は患者への負担の軽減にもつながる。オルガノイドの特性として、癌部のみならず非癌部からも樹立できるという点から、正常細胞への毒性を考慮に入れた薬剤スクリーニング系の樹立へとつなげることも可能であり、創薬という観点からも大きなインパクトを与えることができると考えられる。

研究成果の概要（英文）：We established the lung cancer organoid library from more than 100 Japanese lung cancer patients. Airway organoid or alveolar type I organoid has been reported in 2015 or 2017 respectively however, culture method of alveolar type II has not been established until recently. We established the normal lung organoid library including airway and alveolar type II from same patient paired with lung cancer organoid first in the world. We identified molecular abnormalities from the analysis of multi-omics data of lung adenocarcinoma and small cell lung cancer organoids. We identified the possible therapeutic targets from the relation of molecular abnormality and phenotype difference.

研究分野：癌

キーワード：肺癌 オルガノイド

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

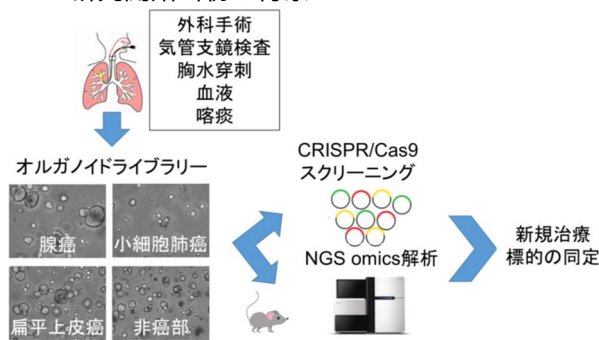


図1 肺癌オルガノイドを用いた肺癌根治治療の開発

肺癌は本邦で癌死因第1位の予後不良疾患である。2004年以降EGFR遺伝子変異、EML4-ALK融合遺伝子といった遺伝子異常を有する肺癌に対しては有効な分子標的治療薬が開発され、患者の予後を改善してきた。しかし、依然として多くの肺癌患者が数年のうちに肺癌の進行によって命を落としていること、進行期肺癌に関しては薬物のみでの根治が難しいことが問題となっている。

近年の癌研究では次世代シーケンサーを用いた臨床検体のゲノム情報の蓄積から、臨

床検体での遺伝子の変化を同定し、その遺伝子変化の分子生物学的な役割を癌細胞株やマウスモデルにより確認する方法が主流であった。しかし、ゲノム情報と表現型 (phenotype) には乖離が見られ、実際、EGFR 遺伝子変異陽性肺癌に対するEGFR-TKI(チロシンキナーゼ阻害剤)の奏効率は70-80%である。また、癌細胞株は、2D培養という非生理的な環境下で培養されている点や細胞株樹立の段階で選択圧がかかっている点などから患者体内での癌微小環境を再現できず、オリジナルの癌細胞とは異なる性質の細胞集団となっているといった批判がある。さらに、樹立にかかる期間は細胞株よりオルガノイドの方が短いことも分かっている(図2)。xenograftモデルは、より生体内に近い状態を模しているとは言え、研究コストの問題や系の確立に時間がかかること、多数の遺伝子に関して同時に評価を行うことが困難なことなどが問題となっており、癌細胞からDNAやRNAを得るプロセス中に失う多くの生物学的情報を維持できる実験系の確立が学術的に問われている。

これらの問題を解決する新たな細胞培養法として、他癌腫において「患者体内で生きていた状態で培養できる」と言われているオルガノイドの樹立が盛んに報告されているが、肺癌組織からのオルガノイド樹立に関しては報告が少なく、樹立方法に関しても確立されているとは言い難い。肺癌のオルガノイドライブラリーを確立し、それに対してゲノムワイドの遺伝子ノックアウトシステムであるCRISPR/Cas9スクリーニングを行うことができれば、患者個人の癌の性質に合わせたオーダーメイドな治療を行うための標的となる遺伝子を、各検体に対して短期間に同定することができると考えられる。

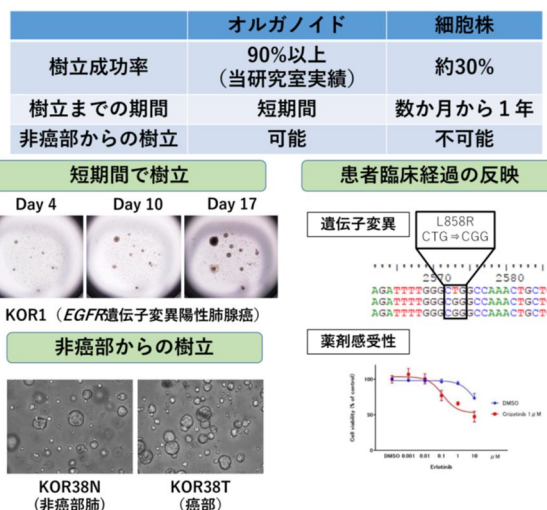


図2 肺癌オルガノイドの利点

2. 研究の目的

本研究の目的は、肺癌患者臨床検体からオルガノイドモデルを樹立し、CRISPR/Cas9及び次世代シーケンサーを組み合わせたスクリーニングを施行することにより、肺癌の新規治療標的を同定し、肺癌患者の予後改善につなげることである。

3. 研究の方法

樹立したオルガノイドからDNAやRNAを抽出し、次世代シーケンサーを用いたomics解析(whole exome/genome sequencing, RNA sequencing, Methylation array, ATAC sequencing)を行った。また、培地のニッチ解析を通じて、各オルガノイドの増殖に重要なpathwayを検討した。

4. 研究成果

肺癌は組織型の違いで主に腺癌、扁平上皮癌、小細胞肺癌に分類されているが、現在までにそれぞれ65, 10, 41ラインのオルガノイドを樹立することができた。その中の一部については各種omics解析により分子異常を同定し、それに伴うフェノタイプの関連を明らかにした(Fukushima,

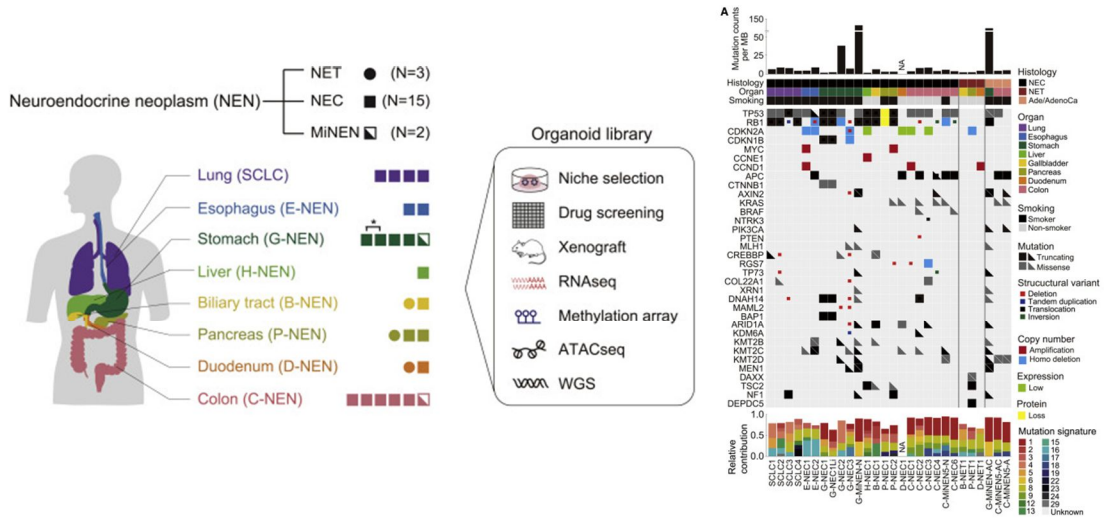


図3 小細胞肺癌(SCLC)を含む神経内分泌細胞オルガノイド omics 解析
Kawasaki, Hamamoto *et al.*, *Cell* 2020

樹立したオルガノイドのうち腺癌の一部について CRISPR/Cas9 を施行したが、現在までに治療標的の同定には至っていない。

一方、正常肺オルガノイドに関しては、気道は2015年、肺胞 type I は2017年にそれぞれ培養方法確立が報告されたが(Kong *et al.*, *Stem Cell Research & Therapy* 2021)、肺胞 type I に分化する肺胞 type II オルガノイドの培養方法は明らかになっていなかった。申請者らは培地のニッチ解析を通じて肺胞 type II オルガノイドの培養に成功し、申請者らを含む3つのグループがほぼ同時に発表した(Salahudeen *et al.*, *Nature* 2020, Katsura *et al.*, *Cell Stem Cell* 2020, Ebisudani, Hamamoto *et al.*, *Cell Report* 2021、図4)。

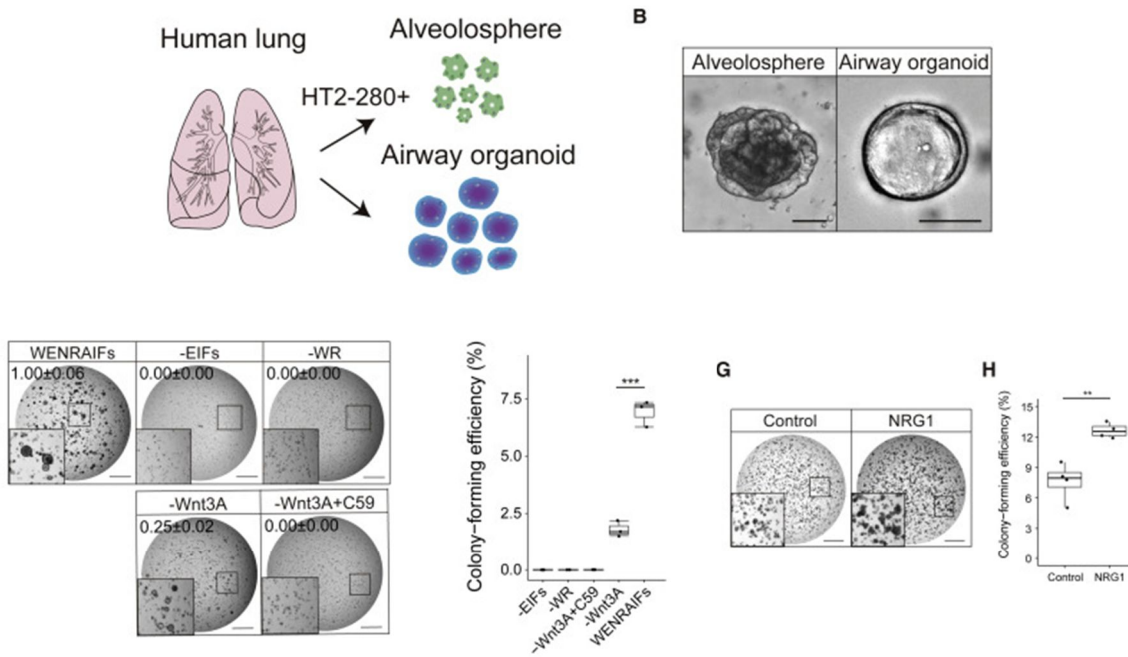


図4 正常II型肺胞細胞培養方法の樹立
Ebisudani, Hamamoto *et al.*, *Cell Report* 2021

5. 主な発表論文等

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

| | |
|---|-------------------------------|
| 1. 著者名 Ebisudani Toshiki, Sugimoto Shinya, Haga Kei, Mitsuishi Akifumi, Takai-Todaka Reiko, Fujii Masayuki, Toshimitsu Kohta, Hamamoto Junko, Sugihara Kai, Hishida Tomoyuki, Asamura Hisao, Fukunaga Koichi, Yasuda Hiroyuki, Katayama Kazuhiko, Sato Toshiro | 4. 巻 35 |
| 2. 論文標題 Direct derivation of human alveolospheres for SARS-CoV-2 infection modeling and drug screening | 5. 発行年 2021年 |
| 3. 雑誌名 Cell Reports | 6. 最初と最後の頁 109218 ~ 109218 |
| 掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.celrep.2021.109218 | 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 Kawasaki, Toshimitsu, Matano, Fujita, Fujii, Togasaki, Ebisudani, Shimokawa, Takano, Takahashi, Ohta, Nanki, Igarashi, Ishimaru, Ishida, Sukawa, Sugimoto, Saito, Maejima, Sasagawa, Lee, Kim, Ha, Hamamoto, Fukunaga, Maekawa, Tanabe, Ishihara, Hamamoto, Yasuda, Sekine, Kudo, Kitagawa, Kana, Nakagawa, Sato | 4. 巻 183 |
| 2. 論文標題 An Organoid Biobank of Neuroendocrine Neoplasms Enables Genotype-Phenotype Mapping | 5. 発行年 2020年 |
| 3. 雑誌名 Cell | 6. 最初と最後の頁 1420 ~ 1435.e21 |
| 掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.cell.2020.10.023 | 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 | 安田 浩之 (Yasuda Hiroyuki) (70365261) | 慶應義塾大学・医学部(信濃町)・講師 (32612) | |

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