

令和 4 年 6 月 7 日現在

機関番号：11301

研究種目：若手研究

研究期間：2019～2021

課題番号：19K16764

研究課題名（和文）肺がん3Dオルガノイド長期継代株の樹立手法の確立と臨床応用

研究課題名（英文）Establishment of a method for the establishment of long-term lung cancer 3D organoid passaging lines and their clinical application

研究代表者

野津田 泰嗣 (Notsuda, Hirotugu)

東北大学・大学病院・助教

研究者番号：00636037

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）：本研究の目的は、がんのトランスレーショナルリサーチ（橋渡し研究）、個別化医療に資する新規実験手法の開発とその実験手法の確立を目指すことである。研究期間を通して、肺がん3Dオルガノイドを用いた新規実験手法をある程度確立させることができた。また、その実験手法を用いて、2Dモデルと同様の実験結果が得られることが証明され、今後の臨床応用に向けても非常に重要性が高い研究であったと考える。免疫療法を除く、肺がんの治療効果判定や、遺伝子変異の機能解析などに応用が可能であり、研究を継続、発展させていきたいと考えている。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究の成果によって、従来医学研究のために使用してきた2D細胞培養法とマウスを使用した動物実験に加えて第3の実験手法をある程度確立することができた。2D細胞培養法は、実験結果が真に生体で起こっている反応や環境を反映しているか評価が困難であるという欠点を有する。また動物実験には倫理的な問題と費用の問題が存在する。その点、研究者が開発に着手した3Dオルガノイドを用いた新規実験法は、それらの問題をクリアすることができる革新的な実験手法であり、その学術的意義や社会的意義は非常に大きいものとする。

研究成果の概要（英文）：The purpose of this study is to develop and establish novel experimental methods that contribute to translational research (bridging research) and personalized medicine for cancer. Through the research period, we were able to establish a novel experimental method using lung cancer 3D organoids to some extent. It was also proved that the same experimental results as 2D models could be obtained using that experimental method, and we believe that this research was of great importance for future clinical applications. We hope to continue and develop this research because it can be applied to determine the efficacy of lung cancer treatment, except for immunotherapy, and to analyze the function of gene mutations.

研究分野：肺がん

キーワード：肺がん3D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

悪性腫瘍(がん)の予防、診断、治療法の開発、発展、また、がんそのものの生態や増殖機序の解明のためには、現在でも動物実験が必要不可欠である。しかし、動物実験には常にコスト・ベネフィット(動物が受ける苦痛と実験から得られる成果の比較)、つまり生命倫理の問題と動物実験にかかる高額な費用の問題が存在する。一方で、がん細胞株を使用し、ディッシュ上で培養する二次元モデル(以下、2Dモデル)は、利用のしやすさという利点の反面、得られた実験結果が真に生体内での結果に反映されるのか評価が困難であるという欠点を有する。ゆえに、がんの臨床・基礎研究いずれに対しても、これらの欠点を補い、信頼性、再現性の高い新規実験手法の開発とその確立が必要とされている。近年、患者検体の三次元オルガノイド培養(以下、がん3Dオルガノイド)は、動物実験や2Dモデルと比較して、大きな優位性を持つ新規実験手法として注目をあびている。なぜなら、2Dモデルと異なり、がん3Dオルガノイドは、継代後も遺伝的、表現型的に安定しており、さらに、初代がん組織(患者検体)の遺伝子異常を維持したまま増殖するからである。この高い遺伝的、表現型的再現性は、がん3Dオルガノイドが基礎研究の結果を臨床試験へ応用するトランスレーショナルリサーチ(橋渡し研究)の理想的な実験モデルとなり得ることを示している。また、一患者に対し、患者オリジナルのがん3Dオルガノイドを作成することができれば、動物実験を経ることなく、その患者に特化したがんの診断、治療法の選択(個別化医療)が可能となるため、臓器別のがん3Dオルガノイドの開発が盛んとなっている。しかし、がん3Dオルガノイドのこうした将来性が脚光を浴びる一方で、多くのがん種ではがん3Dオルガノイド生成の成功率、樹立株の出現率が極めて低いことが問題としてあげられている。申請者は肺がん3Dオルガノイド樹立株の作成に従事し、適切な培養条件、培養液組成を模索し続けてきた。そして肺がん3Dオルガノイドの臨床応用に向けて、より理想的な培養条件、培養法を確立できるのではないかと、という学術的な問いに至った。

2. 研究の目的

肺がんのトランスレーショナルリサーチ(橋渡し研究)、個別化医療に資する新規実験手法の開発とその実験手法の確立を目指すものである。悪性腫瘍(がん)の予防、診断、治療法の開発、発展、また、がんそのものの生態や増殖機序の解明のためには、現在でも動物実験および二次元細胞培養モデルが必要不可欠であるが、それぞれに利点と欠点が存在する。近年、がん患者検体を使用した三次元培養モデルであるがん3Dオルガノイド培養は、動物実験や二次元培養モデルと比較して、大きな優位性を持つだけでなく、信頼性、再現性の高い新規実験手法として注目を集めつつある。ゆえに、本研究の目的は、肺がん3Dオルガノイドの理想的培養・継代法を確立するとともに、肺がん3Dオルガノイドを使用した薬剤スクリーニングなど、肺がん患者の個別化医療に向けた臨床応用を探索することである。

3. 研究の方法

1) 患者肺がん組織を使用したがん3Dオルガノイドの作成(20例を予定)

患者への説明と同意のもと、肺がんの手術検体を使用する。オルガノイド作成用のがん組織は約3mm大に細断し、PBS溶液で洗浄する。Liberase THを含有するADMEM溶液に細断したがん組織小片を浸し、振とう、がん組織から細胞を分離する。フィルターを使用して細胞のみを取り出し、細胞数を計測する。80000個の細胞を50µlのMatrigelで懸濁して混合液を作り、これを24ウ

エルプレートに吐出する。37 の培養器内で Matrigel が硬化した後、すでに温めてある適当な添加物を含む培養液を Matrigel 周囲に加える。

2) がん 3D オルガノイドの継代

継代間隔や継代比率には検体差があり一律に決定はできないが、21 日を経過しても十分量のオルガノイド生成が得られない場合は失敗例とする。培養液を吸引後、TryPLE を加え、オルガノイドを 1~5 個細胞程度まで分解、再懸濁する。懸濁液を 15ml チューブに移し、ADMEM 溶液を加えて遠心した後、上清を吸引、チューブの底に残った細胞塊を適当な量の Matrigel にて懸濁し、プレートに吐出する。

3) がん 3D オルガノイドの質的診断と凍結保存

がん 3D オルガノイドは、5 回以上継代が可能かつ継代比率が 1 対 3 を超えるものを「樹立株」と定義する。樹立株は縦列型反復配列法 (STR 法) にて DNA 鑑定を施行し、オリジナルの手術検体と比較検討される。また、ホルマリン固定パラフィン包埋検体 (FFPE 検体) 標本を作成し、病理組織学的、免疫組織化学的に診断する。加えて、細胞 (オルガノイド) 活性を測定して、3D オルガノイドの倍加時間を計測する。樹立株は、培養液を吸引後、Recovery Cell Culture Freezing Medium (Gibco) を加えて 3D オルガノイドを再懸濁、凍結保存用チューブに回収し、-80 で一晩凍結後、液体窒素タンクにて保存する。

4. 研究成果

2019年度は肺がん3Dオルガノイド作成に関して、大きな進捗が認められた。なぜなら、申請者の前勤務研究室であったトロント大学、プリンセスマーガレットがん研究所のMing Tsao研究室より、一本の論文が報告されたからである。Shi RらによってOrganoid Cultures as Preclinical Models of Non-Small Cell Lung Cancerがclinical cancer researchに報告された。申請者も名を連ねるこの論文内で、申請者は肺腺癌の3Dオルガノイドの作成にあたり、すべての樹立株が申請者の作成したものである。今後、臨床へ応用される道筋がつつあるが、やはり成功率の問題が存在する。事実、肺腺癌の3Dオルガノイドは申請者が作成して以来、まとまった成功例の報告がない。これには単細胞化したがん細胞を3Dオルガノイドにまで成長させる上で、培養液のみならず、がん細胞そのものの成長速度などに問題があると考えている。そこで、がん細胞の成長刺激となる培養液内のサプリメントの変更、追加、濃度調整のみならず、何か成長を規定する遺伝子変異や増幅がないか検討した。中でも申請者はYAP-TAZに着目し、腫瘍細胞同士の接触が成長刺激となる可能性を検討した。Hippo-YAP/TAZシグナル伝達経路はがんの発症や悪性化に深く関与することが示されており、YAP-TAZの核内移行が遺伝子の発現を制御することがわかっている。また、このYAP-TAZの核内移行は細胞同士の接触がシグナルとなっていることもわかっている。よって、申請者は、肺がん細胞は互いの接触によって増殖シグナルが誘発されているという仮説をもとに、肺腺癌患者の組織検体の免疫染色を行い、YAP-TAZの局在を評価、さらに増殖能の評価をしようと試みた。

2020年度は2019年に報告した論文をさらに発展させて、申請者の前勤務研究室であったトロント大学、プリンセスマーガレットがん研究所のMing Tsao研究室との連絡をより密にして、がん3Dオルガノイドの作成効率の上昇を目指したが、残念ながら全世界的なコロナウイルス感染症に伴う大都市のロックダウンにより、研究の停滞を余儀なくされた。しかし、国内で出来ることに注力し、昨年着目したYAP-TAZの免疫染色に着手し、肺腺癌30症例について染色および解析を終えた。YAP-TAZは、腫瘍細胞同士の接触が成長刺激となり、Hippo-YAP/TAZシグナル伝達経路を介してがんの発症や悪性化に深く関与することが示されており、YAP/TAZの核内移行が遺

伝子の発現を制御することがわかっている。免疫染色の結果、ほぼすべての症例にYAP-TAZの細胞核内および細胞質内の発現亢進を認めた。さらにYAP-TAZの局在や、予後との関連、病理病期との間に相関を認めなかった。このことは、そもそも腫瘍細胞同士の接触とYAP-TAZの発現亢進はがんの成長に必須である可能性を示しているものと考えられた。がん細胞株を使用したオルガノイド作成の成功率は高く、さらにオルガノイド増殖抑制アッセイや、がん関連線維芽細胞、リンパ球との共培養などを行い、腫瘍周囲の微小環境の評価や免疫チェックポイント阻害薬の効果判定にがん3Dオルガノイドを使用できるようなモデルの確立に向けて研究を継続することとした。

2021年度は2019年に報告した論文をさらに発展させて、オルガノイド増殖抑制アッセイや、がん関連線維芽細胞、リンパ球との共培養などを行い、それぞれに肺癌3Dオルガノイドが有用かどうか検討した。結果はリンパ球との共培養に関しては、培地であるマトリジェルを通過してオルガノイドへ浸潤した腫瘍浸潤リンパ球を確認することができず、実際の腫瘍周囲の微小環境を評価することは出来なかった。リンパ球の抽出法や、培養法に関してまだ検討する課題が多く、免疫系の実験への応用には数多くのハードルがあることがわかった。一方で、オルガノイド増殖抑制アッセイや、がん関連線維芽細胞の培養に関しては高い成功率を維持しており、今回、オルガノイド増殖抑制アッセイを用いて、BRAF遺伝子変異陽性細胞株に対するEGFRチロシンキナーゼ阻害薬の効果判定を行い、その機能解析を行った。これは、以前行った2Dモデルでの解析を肺癌3Dオルガノイドでも再現可能か確認したもので、結果を世界肺癌学会で報告し、英文誌へ投稿した(J Thorac Oncol . 2022 Feb ; 17(2) : 277-288.)。本研究の目的は、肺がんのトランスレーショナルリサーチ(橋渡し研究)、個別化医療に資する新規実験手法の開発とその実験手法の確立を目指すことである。研究期間を通して、肺癌3Dオルガノイドを用いた新規実験手法をある程度確立させることができた。また、その実験手法を用いて、2Dモデルと同様の実験結果が得られることが証明され、今後の臨床応用に向けても非常に重要性が高い研究であったと考える。免疫療法を除く、肺癌の治療効果判定や、遺伝子変異の機能解析などに応用が可能であり、研究を継続していきたいと考えている。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計2件（うち査読付論文 2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 Ku-Geng Huo , Hirotsugu Notsuda, Zhenhao Fang, Ningdi Feng Liu, Teklab Gebregiworgis, Quan Li, Nhu-An Pham, Ming Li, Ni Liu, Frances A Shepherd, Christopher B Marshall, Mitsuhiro Ikura, Nadeem Moghal, Ming-Sound Tsao	4. 巻 17
2. 論文標題 Lung Cancer Driven by BRAF G469V Mutation Is Targetable by EGFR Kinase Inhibitors	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 J Thorac Oncol	6. 最初と最後の頁 277-288
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.jtho.2021.09.008	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 Shi R, Radulovich N, Ng C, Liu N, Notsuda H, Cabanero M, Martins-Filho SN, Raghavan V, Li Q, Mer AS, Rosen JC, Li M, Wang YH, Tamblyn L, Pham NA, Haibe-Kains B, Liu G, Moghal N, Tsao MS.	4. 巻 26
2. 論文標題 Organoid Cultures as Preclinical Models of Non-Small Cell Lung Cancer.	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Clin Cancer Res.	6. 最初と最後の頁 1162-1174
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1158/1078-0432.	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 -

〔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
---------------------------	-----------------------	----

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
---------	---------