

令和 5 年 5 月 31 日現在

機関番号：17102

研究種目：基盤研究(B)（一般）

研究期間：2020～2022

課題番号：20H03530

研究課題名（和文）ヒト膵癌組織を使用した抗癌剤スクリーニングシステムの構築とその治療応用

研究課題名（英文）Construction of an anticancer drug screening system using human pancreatic cancer tissue and therapeutic application

研究代表者

小菌 真吾（KOZONO, Shingo）

九州大学・医学研究院・共同研究員

研究者番号：40706850

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 13,600,000円

研究成果の概要（和文）：本研究の目的はヒトの膵癌組織から樹立したオルガノイドを利用して膵癌に対する新規の抗癌剤をスクリーニングするシステムを開発することである。ヒト膵癌切除組織よりオルガノイドを樹立し組織標本と比較することで、分化度が高いほどCAFが供給する微小環境因子に強く依存しており、新たな治療標的になり得ることが分かった。オルガノイドとCAFの共培養ではCAFの有無によって分化度が変化する分化可塑性を示しており、微小環境因子依存性の違いに応じて、薬物治療反応性の差異を認めた。PSC単培養での薬剤スクリーニングのアクセシ系を構築し、既承認薬ライブラリーから膵癌に対して腫瘍縮小効果を示す化合物を同定した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

3D培養モデルを使ったヒト膵癌オルガノイドとCAFを共培養することで、膵癌の分化度に応じて微小環境因子への依存性が異なることがわかった。分化度が高いほど微小環境因子への依存性が高く、CAFの有無によって分化度が変化する分化可塑性を示していたため、微小環境因子依存性を評価することが新たな治療標的になり得ることが示唆された。CAFの1つであるPSCを用いたスクリーニングシステムを構築することで、新たな膵癌の治療薬となり得る化合物を同定することができた。このスクリーニングシステムを応用することで、新たな抗癌剤治療薬の開発につながると期待される。

研究成果の概要（英文）：The purpose of this study is to develop a system to screen novel anticancer drugs for pancreatic cancer using organoids established from human pancreatic cancer tissue by establishing PDAC organoids and comparing them with tissue specimens, we found that organoids retain the morphological characteristics of primary tumors and are strongly dependent on niche factors with higher degree of differentiation. CAFs supply niche factors and maintain the differentiated PDAC phenotype. Our data suggests that these niche factors induce distinct molecular features that may represent novel therapeutic targets in differentiated PDAC. We established new drug screening system using PSC and found drug candidates from a library of approved drugs. Finally, we identified a compound that suppresses tumor growth.

研究分野：医歯薬学

キーワード：オルガノイド CAF Niche factors 膵星細胞 ハイスループットスクリーニング

## 様式 C-19、F-19-1、Z-19 (共通)

### 1. 研究開始当初の背景

膵癌は非常に予後不良な疾患であり、先進国における癌関連死の第4位となっている。近年の新規の強力な抗がん剤レジメンの登場により予後は改善の傾向にはあるが、革新的な改善には至っていない。膵癌が、早期から浸潤転移をきたす生物学的悪性度が高いこと、さらには抗癌剤に抵抗性を示すことが多い点が、生存率の改善が見られない原因として考えられ、新規抗癌剤の開発は社会的要請度・貢献度・緊急性が高い。これまでも膵癌細胞のみをターゲットとした多くの抗癌剤が膵癌治療に臨床応用されてきたが、効果は十分ではなく臨床における膵癌治療薬の選択肢は限られている。その原因として、ヒトの膵癌組織で認められる **desmoplasia** といわれる著明な間質増生による癌間質相互作用の関与が挙げられる。我々の研究室では、この癌間質相互作用を通して膵癌の抗癌剤抵抗性に大きな影響を及ぼしていることを多数報告してきた。その知見をもとに、**desmoplasia** を誘導する原因細胞である膵星細胞(PSC)をターゲットとした薬剤の検索に主眼を置いた研究も精力的に進めてきた。しかし、新規膵癌治療薬として有望と思われる薬剤の臨床応用まで結び付けられずにいる。その原因としてこれらの研究が、すでに樹立されたある特定の膵癌細胞株や、その細胞株を利用したマウス膵癌モデルに基づく限定的な研究成果であり、臨床試験を立案するだけの質の高いエビデンスを構築できていないことによると考える。

### 2. 研究の目的

本研究の目的は、ヒトの膵癌組織から樹立したオルガノイドおよび PDX マウスモデルを利用して、膵癌に対する新規の抗癌剤をスクリーニングするシステムを開発、さらには患者それぞれの膵癌組織における抗癌剤感受性を検索してテーラーメイド治療を提供するシステムを構築することである。我々は、膵癌自然発生遺伝子改変マウスや膵癌組織より樹立したオルガノイド、ヒト由来の癌組織を利用した PDX マウスモデルを導入した質の高い研究を進めエビデンスレベルの向上に努めてきた。次の新たなステップとしてヒトの膵癌組織を利用した薬剤スクリーニングシステムを構築することを立案する。このシステムにより新規膵癌抗癌剤開発スクリーニングとその効果判定のスピードが著しく促進され、各々の膵癌患者において薬剤の感受性をスピーディーに明らかとすることで膵癌のテーラーメイド治療を提供できることが期待される。

### 3. 研究の方法

#### ①ヒト膵癌手術切除標本からのオルガノイドの安定的樹立手技の確立

安定的にヒト膵癌手術切除標本よりオルガノイドを樹立する手技の確立が本研究の重要なポイントとなる。我々は手術により摘出された膵癌組織を用いて膵癌組織由来オルガノイドを樹立する方法を独自に確立してきた。しかし、すべての手術切除膵癌組織よりオルガノイドを樹立することは難しく、オルガノイドの長期培養が困難な場合に遭遇する。この問題を解決するため、我々はこれまでの癌間質相互作用における知見の蓄積から、癌間質相互作用に関与する因子が非常に重要であると考えている。

#### ②ヒト膵癌細胞由来オルガノイドとヒト PSC 細胞の共培養による新規オルガノイドモデルおよびそのライブラリーの確立

3D 培養モデルにおける膵癌組織由来のオルガノイドは膵癌細胞由来の細胞のみで形成され、生体内の間質増生が著しい膵癌組織像を再現できない。我々の研究室ではオルガノイドとは別に樹立した膵星細胞とオルガノイドを共培養することで間質増生を伴う膵癌組織の再現に成功している。本研究では、オルガノイドを樹立する場合に膵癌細胞と間質細胞を初めからともにオルガノイド 3D 培養液中で培養してオルガノイド樹立の確立を高めることを目指し、間質組織が豊富な膵癌組織に近似したオルガノイドを樹立する。樹立されたオルガノイドは大量培養されたのち、ヒト膵癌オルガノイドライブラリーとして保存され、薬剤スクリーニングに利用される。

#### ③ヒト膵癌由来オルガノイドライブラリーと用いた新規抗癌剤スクリーニング法の確立

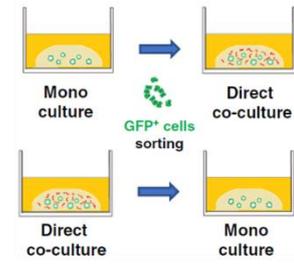
ヒト膵癌由来オルガノイドライブラリーは、患者の臨床情報や治療情報、次世代シーケンズを利用した遺伝子変異情報が合わせて保存されデータ解析に応用される。

#### ④抗癌剤スクリーニングシステムを応用したテーラーメイド膵癌治療システムの確立

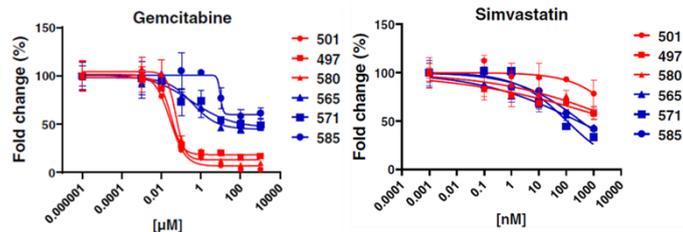
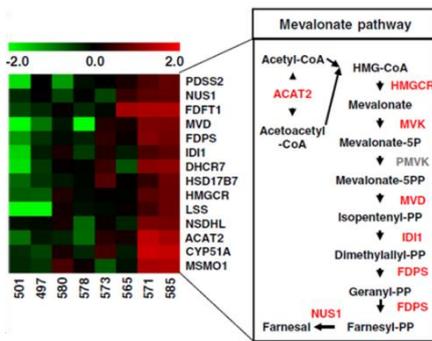
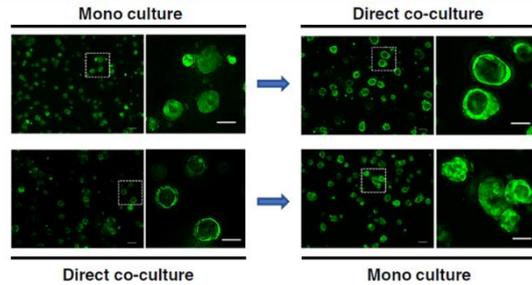
今回の研究で確立を目指す膵癌オルガノイドを利用した抗癌剤スクリーニングシステムは、容易に膵癌患者に主眼を置いたテーラーメイド治療に応用可能である。今回我々が開発を目指す膵癌細胞、間質細胞(PSC)を利用した間質増生を伴うオルガノイドモデルを利用し、ハイスループットスクリーニングの技術を用いることで素早く正確に多くの抗癌剤に対する臨床効果を反映した感受性のスクリーニングを行うことが可能である。

#### 4. 研究成果

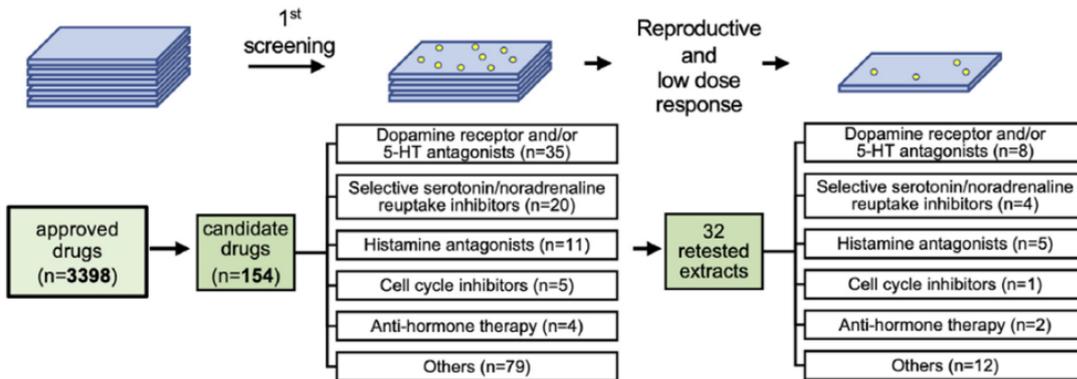
まず、ヒト膵癌切除組織よりオルガノイドを樹立した。組織標本と比較し、膵癌オルガノイドは primary tumor の形態学的特徴を保持しており、分化度が高いほど微小環境因子 (Niche factors) に強く依存していることがわかった。さらに膵癌オルガノイドを PSC と共培養すると、高分化型は単培養では増殖がみられず、CAF である PSC に強く依存していた。微小環境因子の有無と同様に、CAF の有無によって分化度が変化する分化可塑性を示しており (右図)、微小環境因子により誘導される分子生物学的特徴は、phenotype 別の



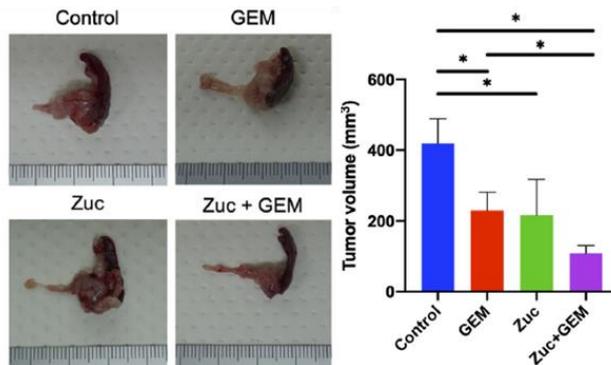
治療標的になり得ると考えられた。微小環境因子 high 依存性の膵癌オルガノイドはメバロン酸代謝関連 gene の発現が亢進し、low 依存性では cell cycle 関連 gene の発現が亢進していた。これらの微小環境因子依存性に応じて、薬物治療反応性の差異を認めた (下図)。これらの結果より、膵癌オルガノイドライブラリーの作成に向けて phenotype や微小環境因子依存性の評価が重要であると考えられた。



次に、PSC と膵癌オルガノイドとの共培養での薬剤スクリーニングシステムの樹立のため、まず PSC の単培養での薬剤スクリーニングのアッセイ系を構築した。活性化した PSC は癌間質相互作用によって膵癌の浸潤・進展を促進している。この PSC が活性化から不活性化となる形態的な指標として脂肪滴に着目した。BODIPY 染色を用いた脂肪滴の蛍光強度を指標とし、既承認薬ライブラリーの 3398 種類の化合物を用いたハイスループットスクリーニングを行ったところ、32 種類の候補化合物を同定した (下図)。



候補化合物は in vitro での検証で実際に PSC が不活性化されていることを確認できた。そのうちの 1 つである zuclopenthixol (Zuc) を膵癌同所移植モデルマウスに投与すると、gemcitabine + Zuc 併用群で腫瘍の縮小効果を認めた (右図)。膵癌オルガノイドライブラリーは作成途中だが、これらの知見を活かし、今後は膵癌オルガノイドと PSC の共培養のスクリーニングシステムが構築できると考える。



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 1件）

1. 著者名 Shinkawa Tomohiko, Ohuchida Kenoki, Nakamura Masafumi	4. 巻 14
2. 論文標題 Heterogeneity of Cancer-Associated Fibroblasts and the Tumor Immune Microenvironment in Pancreatic Cancer	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Cancers	6. 最初と最後の頁 3994
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.3390/cancers14163994	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 Shinkawa Tomohiko, Ohuchida Kenoki, Mochida Yuki, Sakihama Kukiko, Iwamoto Chika, Abe Toshiya, Ideno Noboru, Mizuuchi Yusuke, Shindo Koji, Ikenaga Naoki, Moriyama Taiki, Nakata Kohei, Oda Yoshinao, Nakamura Masafumi	4. 巻 41
2. 論文標題 Subtypes in pancreatic ductal adenocarcinoma based on niche factor dependency show distinct drug treatment responses	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Journal of Experimental Clinical Cancer Research	6. 最初と最後の頁 89
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1186/s13046-022-02301-9	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3件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 新川智彦、大内田研宙、持田郁己、井手野昇、水内祐介、進藤幸治、池永直樹、森山大樹、仲田興平、中村雅史
2. 発表標題 異なる薬物治療反応性を示す微小環境因子依存性に基づいた新たな膵癌サブタイプ分類
3. 学会等名 第122回日本外科学会定期学術集会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 新川智彦、大内田研宙、中村祥一、持田郁己、久野恭子、奥田翔、大坪慶志輝、岩本千佳、進藤幸治、池永直樹、森山大樹、永井俊太郎、仲田興平、中村雅史
2. 発表標題 膵癌における微小環境因子が腫瘍分化度に与える影響およびその分化度に応じた薬物治療反応性についての検討
3. 学会等名 第121回日本外科学会定期学術集会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 新川智彦、大内田研宙、奥田翔、大坪慶志輝、岩本千佳、進藤幸治、仲田興平、大塚隆生、中村雅史
2. 発表標題 微小環境因子依存性に基づいた膵癌subtype分類および薬物治療抵抗性についての検討
3. 学会等名 第75回日本消化器外科学会総会
4. 発表年 2020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
研究分担者	進藤 幸治 (SHINDO Koji) (00788432)	九州大学・大学病院・助教  (17102)	
研究分担者	木庭 遼 (Koba Ryo) (10866776)	九州大学・医学研究院・共同研究員  (17102)	
研究分担者	水内 祐介 (MIZUUCHI Yusuke) (20849088)	九州大学・大学病院・助教  (17102)	
研究分担者	久保 真 (KUBO Makoto) (60403961)	九州大学・医学研究院・准教授  (17102)	
研究分担者	宮坂 義浩 (MIYASAKA Yoshihiro) (40507795)	福岡大学・医学部・講師  (37111)	

6. 研究組織（つづき）

	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	水元 一博  (MIZUMOTO Kazuhiro)  (90253418)	国際医療福祉大学・赤坂・医療福祉マネジメント学部・教授    (32206)	

	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
研究協力者	新川 智彦  (SHINKAWA Tomohiko)		

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