

令和 5 年 5 月 23 日現在

機関番号：34419

研究種目：基盤研究(B)（一般）

研究期間：2020～2022

課題番号：20H03773

研究課題名（和文）肺癌の患者由来オルガノイドの高効率な作製法の確立と治療感受性予測への応用

研究課題名（英文）Highly efficient establishment of lung cancer patient-derived organoids and its application for prediction of sensitivities to various treatments

研究代表者

光富 徹哉（Mitsudomi, Tetsuya）

近畿大学・医学部・教授

研究者番号：70209807

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 13,900,000円

研究成果の概要（和文）：肺がん切除標本から肺腫瘍オルガノイド（LT0）を樹立法を確立し、臨床病理学的特徴や遺伝子解析、薬剤感受性の評価を行った。79名の患者から53のLT0が確立され、形態、免疫染色、遺伝子変異等でLT0は親腫瘍の特性をよく反映していた。LT0の長期継代可能症例は、予後不良と関連していた。ドライバー遺伝子に関してはEGFRエクソン20挿入変異1を含む7つの変異が検出された。エクソン30変異細胞はオシメルチニブに感受性があり、この情報をもとに患者をオシメルチニブで治療したところ良好な臨床効果が得られた。これらの結果は、LT0が腫瘍のモデルとして感受性テスト等、治療戦略開発に有用であることを示している。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究においては、従来、消化器癌とくらべて樹立が困難とされてきた非小細胞肺癌において、67%の症例からオルガノイドを樹立できたことは臨床応用を考えた上で意義深い。また、これらのオルガノイドは病理組織学的特徴およびほとんどの遺伝子変化を維持しており、薬物感受性の前臨床的評価に有用であることが期待される。実際、まれなEGFRエクソン20挿入変異を有する患者においてはオルガノイドの薬剤感受性結果に基づいてシメルチニブを投与することで、高い抗腫瘍効果がえられ、臨床的な有用性を示せた。これらのことは学術的、臨床的に意義深いと思われる。

研究成果の概要（英文）：We established a method for creating lung tumor organoids (LT0) from surgically resected lung cancer specimens and characterized them in various ways in search for their clinical applications. We were able to establish 53 LT0s from 79 lung cancer patients, and they accurately reflected the characteristics of the parent tumors in terms of morphology, protein expression, and gene alterations. The success rate was lower for squamous cell carcinoma. The ability for long-term passaging was associated with poor prognosis. We detected seven driver mutations in both LT0s and parent tumors, including one EGFR exon 20 insertion mutation (H773delinsYNPY) which is usually refractory to currently available drugs. However, as this LT0 showed sensitivity to osimertinib, the patient was treated with osimertinib, resulting in significant clinical response. These results suggest that LT0s could be a useful tool for developing treatment strategies.

研究分野：呼吸器外科学、腫瘍学

キーワード：肺癌 オルガノイド 薬剤感受性試験 ドライバー遺伝子 分子標的治療 腫瘍微小環境

## 様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

### 1. 研究開始当初の背景

肺がんは、わが国を含む多くの国で癌死亡原因の一位であり続けている。しかし、近年分子標的薬や免疫チェックポイント阻害剤の登場により治療成績は改善しつつある。分子標的治療については、現在わが国で治療として標的可能な遺伝子変異は EGFR、KRAS、ALK、MET、ROS1、BRAF、RET、NTRK の 8 つであり、これらの異常が検出された場合はそれぞれの阻害剤で治療することになるが、同じ遺伝子の変異であってもその種類と阻害剤の組み合わせで臨床効果は様々である。すなわち治療の更なる個別化が求められている。

これらの問題を解決するためには前臨床モデルを用いて、患者別に候補薬を総合的に評価し、臨床効果を推定することである。この目的のために細胞株が用いられてきたが、患者内の親腫瘍の不均一性を再現していないこと、細胞株の樹立の効率が低いことなどから個々の患者の治療方針の決定には適さない。患者由来オルガノイド (Patient-derived organoid: PDO) は、親腫瘍の不均一性と周囲の微小環境の両方を再現する、新しい前臨床 3 次元 in vitro モデルであり、さらに、それが由来した病理学的・分子生物学的特徴や薬剤感受性を保持している。樹立率は細胞株より高く臨床応用がよりしやすい可能性があるが、消化器癌に比べ肺がん由来オルガノイド (LTO: Lung tumor organoid) 樹立は困難とされておりこれまでの報告も少ない。

### 2. 研究の目的

(1) 外科的に切除された NSCLC の検体から LTO および正常肺由来の NLO (normal lung organoid) の樹立法を確立する。

(2) 樹立に関わる因子 (組織型、患者予後等) を明らかにする。

(3) LTO とそれが由来した親腫瘍を病理組織学的、分子生物学的に比較しその異同を検討する

(4) さらにドライバー遺伝子変異をもつ LTO の一部については薬剤感受性試験を行い、実際の患者における臨床効果と比較する。

### 3. 研究の方法

(1) 患者 2019 年 4 月から 2021 年 3 月にかけて、1) 最大腫瘍径が 8mm 以上で、充実部分径/最大腫瘍径比が 0.5 以上の腫瘍、2) 腫瘍細胞の混入のない正常肺組織と腫瘍組織が得られる症例を対象とした。この研究は近畿大学医学部倫理委員会 (24-071) により承認された。手術前にすべての患者から書面によるインフォームドコンセントを得た。本研究のすべての手順は、「人を対象とする医学及び医療に関する研究の倫理指針」に従って実施された。

(2) 組織の取り扱い 肺切除検体を無菌状態で細切した後、1.5U/mL Dispase I (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO) と Liberase TH (Sigma-Aldrich) によって溶解した。この溶液を荒くろ過後遠心分離し、ペレットを洗浄液で 2 回洗浄後 48 ウェルプレート上の 25  $\mu$ L のマトリゲル (コーニング) に埋め込んだ。37  $^{\circ}$ C で 15 分間インキュベートしてマトリゲルを固めた後、各ウェルに培養液を加え、37  $^{\circ}$ C、5%CO<sub>2</sub> 環境下で培養した。培地組成は既報に基づいた [1-3]。これらの工程は、切除後 3 時間以内に完了した。培地は 4-5 日ごとに交換した。LTO と NLO の細胞は、コンフルエントになった時点で継代した。オルガノイドの樹立は、以下の基準で定義した: (i) 3 次元構造の形成、(ii) 3 継代以上の生存、(iii) 3 ヶ月以上の培養維持、または 3 ヶ月以内に凍結保存が可能な増殖能力を有すること。

(3) 組織学的評価 オルガノイドペレットを 4%パラホルムアルデヒド (PFA) で 4 時間固定し、脱水した後、パラフィンに包埋した。ホルマリン固定パラフィン包埋 (FFPE) ブロックを切開し、ヘマトキシリン・エオシン (H&E) 染色を行った。また、免疫組織化学 (IHC) および免疫蛍光法 (IF) を実施した。

(4) 核酸抽出と遺伝子解析 DNeasy Blood & Tissue Kit (QIAGEN, Hilden, Germany) および RNeasy Mini QIAcube Kit (QIAGEN) を用いて、オルガノイドから DNA および RNA をそれぞれ抽出した。OncoPrint cell-free DNA Assay PanCancer panel (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA) を用いて、LTO とそれに対応する親腫瘍との間の遺伝子変化を包括的に分析した。変異は、変異アレル頻度が 0.10%以上と定義した。CNV 解析は、Bioconductor DNACopy パッケージバージョン 3.9 [17] を用いて実施した。

(5) 薬剤感受性テスト 24 ウェルプレート内の2 ウェルからコンフルエントな LTO を回収した。回収したすべての LTO を TrypLE Express Enzyme (Gibco) によりシングルセルに解離し、マトリゲルに包埋して 96 ウェルプレート内の各ウェルに 8  $\mu$ L を播き、培養液とともにインキュベートした。3 日間の培養後、LTO を薬剤で処理した。3 日ごとに薬剤と培養液を交換しながら、LTO を 6 日間処理した。LTO の生存率は、Cell Counting Kit-8 (同仁堂研究所) を用いたホルマザン色素の量をマルチプレートリーダー (Tecan, Mannedorf, Switzerland) による 450nm の吸光度によって決定した。薬剤としては 4 種類の EGFR チロシンキナーゼ阻害剤 (TKI ; エルロチニブ、アファチニブ、オシメルチニブ、ポジオチニブ)、MEK 阻害剤 (トラメチニブ) を用いた。SOS1 阻害剤である BI-3406 は、Boehringer Ingelheim (Ingelheim, Germany) から提供された。

(6) LTO 由来異種移植片の作製 動物実験は、近畿大学実験動物委員会 (KAME-2020-054) の「医学系研究用実験動物の取扱いについて」に基づき実施した。24 ウェルプレート内の 2-4 ウェルにコンフルエントになった LTO を回収し、1 : 1 のマトリゲルと PBS を 200  $\mu$ L 加えて再懸濁した。懸濁した LTO を 5-7 週齢の重症複合免疫不全雄マウスの脇腹に皮下接種した。腫瘍の大きさを毎週モニターし、腫瘍の大きさが 1.5cm に達する前に切除した。

(7) 統計解析 カテゴリ変数および連続変数は、それぞれ Fisher の正確検定および Mann-Whitney U 検定を用いて比較した。全生存期間 (OS) およびがん特異的生存期間 (CSS) は、少なくとも 24 ヶ月のフォローアップ期間がある患者を対象とした算出した。OS および DFS 確率は Kaplan-Meier 法を用いて推定し、生存曲線はログランク検定を用いて比較した。すべての生存解析は、EZR ソフトウェアを用いて行った。

#### 4 . 研究成果

(1)LTO の樹立と患者特性との関連 合計 78 人の患者が登録された。内一名は 2 種類の異なる組織型の腫瘍を有していたため、合計 79 の腫瘍サンプルから LTO の樹立を試みた。また、腫瘍とは別に対応する 45 個の正常肺組織から NLO(normal lung organoid)を確立することを試みた。

79 検体 (67%) から 53 個の LTO の樹立に成功し、その内訳は、腺がん (ADC) 71% (35/49)、扁平上皮がん (SQ) 48% (11/23)、小細胞がん (SCLC、3/3)、combined SCLC (2/2)、腺様嚢胞がん 1%、多形肺がん 1%であった (図 1)。

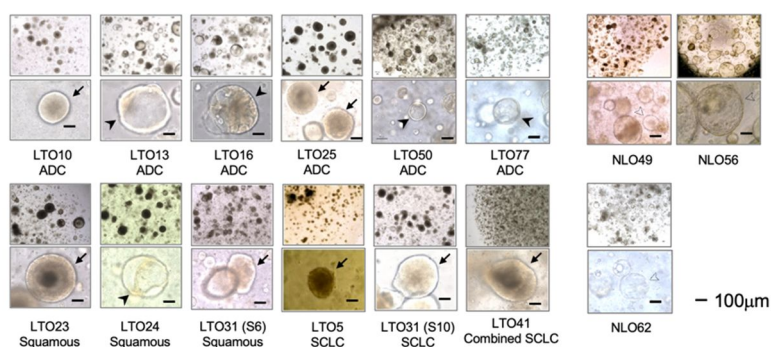


図 1 樹立された LTO の位相差顕微鏡写真

樹立する関わる因子について検討したところ、SQ は他のがん種よりも樹立が困難であった (SQ vs. 他のがん種 ; 樹立率、それぞれ 48% vs. 75%、 $p=0.034$ ) (表 1)。ADC 49 サンプルに限定すると、lepidic-predominant ADC は、他の ADC サブタイプに比べて有意に低い樹立率を示した (lepidic vs. other subtypes; establishment rate, 40% vs. 79%、 $p=0.022$ ) (表 1)。

表 1 LTO 樹立に関わる因子

A. All tumors (n = 79)			
Variables	All tumors		p value
	Not-established (n=26)	Established (n=53)	
Age (year old)	74.5 (46-85)	72.0 (50-89)	0.645
Gender	F11 M15	F14 M39	0.200
Smoking	Never 8 Ever 18	Never 14 Ever 39	0.791
Pack/year	27 (0-126)	30 (0-108)	0.933
CT maximum tumor diameter (cm)	2.7 (0.9-8.9)	2.6 (0.8-5.5)	0.463
Presence of ground glass opacity	No 23 Yes 3	No 41 Yes 12	0.208
CT consolidation size (cm)	2.7 (0.9-8.9)	2.50 (0.4-5.5)	0.450
SUVmax	5.34 (1.40-22.0)	7.26 (1.58-40.7)	1.000
<b>Histology</b>	<b>SQ 12 non-SQ 14</b>	<b>SQ 11 non-SQ 42</b>	<b>0.034</b>
Pathological tumor diameter (cm)	2.5 (0.5-6.7)	2.5 (0.8-6.0)	0.743
Pathological invasive size (cm)	2.0 (0.0-6.7)	2.0 (0.6-6.0)	0.567
Pathological stage	0/III/20 III/IV 6	III 41 III/IV 12	1.000
Pleural invasion	Negative 14 Positive 10	Negative 36 Positive 17	0.448
Lymphatic vessel invasion	Negative 19 Positive 5	Negative 40 Positive 13	0.780
Blood vessel invasion	Negative 18 Positive 6	Negative 35 Positive 18	0.596
Grade	G1 3 G2/3/4 20	G1 6 G2/3/4 45	1.000

Data about pleural invasion, lymphatic vessel invasion, blood vessel invasion are lacked in two cases. Data about grade is lacked in five cases. CT, computed tomography; SUV, standardized uptake value; EGFR, epidermal growth factor receptor; F, female; M male; SQ, squamous cell carcinoma.

B. Adenocarcinomas (n = 49)			
Variables	Adenocarcinomas		p value
	Not-established (n=14)	Established (n=35)	
Age (year old)	73 (46-83)	74 (58-89)	0.594
Gender	F9 M5	F13 M22	0.116
Smoking	Never 8 Ever 6	Never 14 Ever 21	0.348
Pack/year	0 (0-112.5)	10 (0-96)	0.451
CT maximum tumor diameter (cm)	2.7 (0.9-5.5)	2.8 (0.8-5.5)	0.862
Presence of ground glass opacity	No 11 Yes 3	No 25 Yes 10	1.000
CT consolidation size (cm)	2.7 (0.9-5.5)	2.5 (0.4-5.5)	0.917
SUVmax	3.50 (1.40-16.89)	5.25 (1.58-20.60)	0.310
<b>Lepidic Predominance</b>	<b>Yes 6 No 8</b>	<b>Yes 4 No 31</b>	<b>0.022</b>
Pathological tumor diameter (cm)	2.5 (0.5-4.0)	2.5 (0.8-6.0)	0.436
Pathological invasive size (cm)	1.4 (0.0-3.5)	2.0 (0.6-6.0)	0.079
Pathological stage	0/III/11 III/IV 3	III 28 III/IV 7	1.000
EGFR mutation	Wild type 7 Mutant 7	Wild type 19 Mutant 16	1.000
Pleural invasion	Negative 9 Positive 4	Negative 23 Positive 12	1.000
Lymphatic vessel invasion	Negative 11 Positive 2	Negative 29 Positive 6	1.000
Blood vessel invasion	Negative 11 Positive 2	Negative 26 Positive 9	0.702
Grade	G1 3 G2/3/4 10	G1 5 G2/3/4 29	0.666

Data about pleural invasion, lymphatic vessel invasion, blood vessel invasion are lacked in a case. Data about grade is lacked in two cases. CT, computed tomography; SUV, standardized uptake value; EGFR, epidermal growth factor receptor; F, female; M male.

(2) LT0 と親腫瘍との形態学的、免疫組織学的、分子生物学的異同 ADC、SQ、SCLC から樹立された代表的な LT0 の組織的特徴を、対応する親腫瘍と比較した。H&E 染色による組織学的特徴は、組織学的サブタイプにかかわらず、LT0 と由来した親腫瘍の間で同等であった。IHC 分析では、甲状腺転写因子-1 (TF-1) と p40 の発現レベルは、LT0 と対応する親腫瘍の間で一致していた。IF 解析では、3 つの ADC LT0 の内腔上皮で MUC1-C の発現が陽性であったが、SCLC LT0 の内腔上皮では、対応する親腫瘍と同様でなかった。さらに、SCLC LT0 では、核と細胞質の比率が高い腫瘍細胞が高密度に集まったクラスター構造など、SCLC の典型的な形態が確認された。これらの所見は、LT0 が対応する親腫瘍の組織学的特徴を保持していることを示唆するものであった。

次に、11 個の LT0 とそれに対応する 9 個の親腫瘍の遺伝子変異の異同を検討した。11 個の LT0 のうち 4 個は、同じ 2 個の LT0 から異なる時点でそれぞれ 2 回サンプリングされたものである。7 つの変異が LT0 とそれに対応する親腫瘍で検出された (EGFRx3, TP53x1, PTENx1, RETx1, CTNNB1x1)。一方、3 つの変異は親腫瘍のみにあり (TP53x2, PIK3CAx1)、1 つの変異は LT0 のみに存在した (PTEN)。

(3) LT0 の長期培養と患者予後の相関性 長期培養は 10 回以上の継代と定義した。長期培養された LT0 は 10 例 (10/79, 13%) あり、その内訳は ADC 6 例、SQ 3 例、SCLC 1 例であった。長期培養型とそれ以外の型では、臨床的・病理的特徴に有意差はなかった。長期培養と臨床転帰の関係を評価するため、切除後 2 年 (24 ヶ月) 以上経過した長期モデルとその他のモデルの OS と CSS を比較した。対象は 70 名で、追跡期間中央値は 30.7 (範囲: 0.6-43.4) カ月であった。LT0 が長期モデルであった患者の 2 年 OS は、他の患者よりも悪い傾向にあった (66.7% (95%CI 28.2-87.8) vs 85.0% (73.2-91.9), log-rank test p=0.122)。特に、2 年 CSS では、長期モデルを使用した患者の予後が、非設立モデルや短期モデルを使用した患者の予後と比較して悪いことが示された (66.7% (28.2-87.8) vs 91.3% (80.2-96.3), log-rank test p=0.017)。

(4) 免疫不全マウスにおけるオルガノイド由来異種移植 (ODX) 8 つの LT0 (ADC5, SQ2, SCLC1) に対して ODX の確立を試みたところ、3 株で ODX の確立に成功した (樹立率、38%)。3 つの LT0 の組織型は SQ (LT027)、SCLC (LT043)、ADC (LT052) とそれぞれ異なっていた。組織学的評価により、ODX が対応する親腫瘍の特徴的な特徴を保持していることが確認できた。

(5) LT0 の薬剤感受性アッセイ 2 つの EGFR 変異 LT0 である LT016 (EGFR エクソン 19 欠失) および LT013 (EGFR エクソン 21 L858R) は、3 つの EGFR-TKI-エルロチニブ、アファチニブ、オシメルチニブに感受性を示した; しかし IC50 値は、HCC827 (EGFR エクソン 19 欠失) および NCI-H3255 (EGFR エクソン 21 L858R) という二つの EGFR 変異細胞株より EGFR 変異 LT0 のほうが高い値だった。トラメチニブと BI-3406 の併用療法は、エルロチニブではなく、KRAS G12V を保有する LT052 細胞の増殖を阻害した。SCLC オルガノイドである LT043 は、SCLC 患者の標準レジメ

ンであるエトポシド+シスプラチンに感受性があった。

(6) 希少な EGFR エクソン 20 H773del insYNPY 変異を有する親患者における薬剤反応予測への LTO の有用性と臨床効果 LTO9 は EGFR エクソン 20 H773del insYNPY を有していたがそのがん原性や薬剤感受性は不明である。この変異を導入した Ba/F3 細胞は IL-3 に依存せずに増殖し(図 2A)、この変異が形質転換能を有することが示された。さらにこの細胞の増殖は、アファチニブ、オシメルチニブ、およびポジオチニブによって阻害された(図 2B)。ポジオチニブは、 $[IC_{50} \text{ 値}] / [\text{各薬剤の Ct rough 濃度}]$ として算出される感度指数(SI)が最も低く、オシメルチニブも低い IC<sub>50</sub> 値と SI 値を示した(図 2B)。

LTO9 が由来した患者は新たな転移性肺病変を有しており、化学療法によって病勢コントロールがされていたが、副作用の浮腫が高度となり休薬を余儀なくされたため、再び増悪傾向にあった。上記の薬剤スクリーニングの結果、ポジオチニブ、オシメルチニブが有効である可能性があったが、わが国ではポジオチニブは未承認であるため、十分な説明と患者同意の上オシメルチニブの投与を行った。その結果、患者の肺転移巣は縮小し血清 CEA 値は有意に低下した(図 2C)。

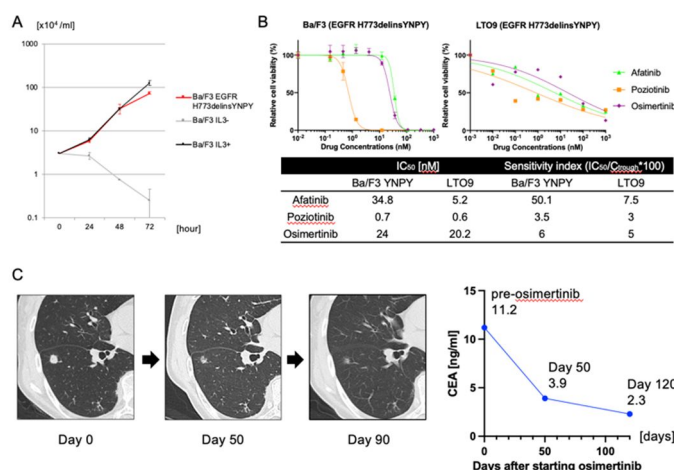


図2 希少な EGFR エクソン 20 H773del insYNPY 変異を有する患者における薬剤反応予測への LTO の有用性と臨床効果

(7) 結論. 今回の検討では、組織学的特徴およびほとんどの遺伝子変化 LTO を高効率で樹立することができた。SCLC や組織学的グレードの高く悪性度の高い ADC 由来する LTO は樹立率も高く、長期間培養可能である傾向があった。また、一名の患者では実際に LTO の感受性が治療選択に有用であることを示すことができた。

LTO は、分子標的薬の臨床効果を予測するための前臨床モデルとして、また、希少な変異を持つがん患者に対する標的治療法の開発において有用である。樹立率の更なる向上、さらに忠実に親腫瘍の特徴や腫瘍微小環境、薬剤感受性などを正確に再現する方法等が今後の課題である。

< 引用文献 >

[1] Kim M, Mun H, Sung CO, Cho EJ, Jeon HJ, Chun SM, et al. Patient-derived lung cancer organoids as in vitro cancer models for therapeutic screening. Nat Commun. 2019;10:3991.  
 [2] Sachs N, Pappasypoulos A, Zomer-van Ommen DD, Heo I, Böttinger L, Klay D, et al. Long-term expanding human airway organoids for disease modeling. Embo j. 2019;38.  
 [3] Pauli C, Hopkins BD, Prandi D, Shaw R, Fedrizzi T, Sboner A, et al. Personalized In Vitro and In Vivo Cancer Models to Guide Precision Medicine. Cancer Discov. 2017;7:462-77.

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計2件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 古賀教将, 須田健一, 小原秀太, 藤野智大, 西野将矢, 濱田顯, 千葉真人, 武本智樹, 宗淳一, 光富徹哉
2. 発表標題 肺腫瘍切除検体由来のLung Tumor Organoidの樹立と解析
3. 学会等名 第120回日本外科学会定期学術集会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 Takamasa Koga, Junichi Soh, Kenichi Suda, Shuta Ohara, Toshio Fujino, Masaya Nishino, Akira Hamada, Masato Chiba, Masaki Shimoji, Toshiki Takemoto, Tetsuya Mitsudomi
2. 発表標題 Establishment of patient-derived organoids from resected primary lung cancer as an in vitro model for drug screening.
3. 学会等名 第18回日本臨床腫瘍学会学術集会
4. 発表年 2021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
---------	---------