

令和 5 年 6 月 21 日現在

機関番号：24303

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2020～2022

課題番号：20K09331

研究課題名(和文) 神経膠腫オルガノイドバンク構築による個別化治療の開発

研究課題名(英文) Development of the personalized medicine by the glioma organoid bank construction

研究代表者

高橋 義信 (Takahashi, Yoshinobu)

京都府立医科大学・医学(系)研究科(研究院)・講師

研究者番号：90347451

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)：本研究では、膠芽腫オルガノイドと2次元培養細胞を樹立し、5世代まで培養した。各世代の培養細胞からDNAを抽出し、ターゲットシーケンシングを実施した。その結果、オルガノイドは元の腫瘍と同じ遺伝子プロファイルを第5世代で保持する傾向があることが示された。WST-1アッセイを用いて吸光度を測定した薬物投与研究は、両方の培養株をシスプラチンで処理した場合に濃度依存的な吸光度の減少を示したのに対し、オルガノイドはテモゾロミドで処理した場合に濃度依存的な吸光度の減少を示さなかった。両細胞培養モデル間の応答の違いが、薬物に対する生体の実際の感受性を示しているかどうかを調べる必要があると考えられた。

研究成果の学術的意義や社会的意義

膠芽腫オルガノイドモデルは、継代を繰り返した後も、2次元培養細胞と比較して元の遺伝子プロファイルを保持する可能性を示しました。したがって、膠芽腫オルガノイドは、腫瘍特異的薬物感受性につながる分子メカニズムの同定のための有用なモデルとなり得る。今後は、オルガノイドの樹立をさらに増やし、ヒトでの安全性や薬物動態が実績で確認済みの既存薬や、市場に出回らずに開発を中止した薬から抗腫瘍効果のある薬剤を同定し、実用化を目指して研究をさらに進めていく予定である。

研究成果の概要(英文)：In this study, glioblastoma organoids and two-dimensional cultured cells were established and cultured up to five generations. DNA was extracted from cultured cells of each generation and targeted sequencing was performed. The results showed that organoids tended to retain the same genetic profile in the fifth generation as the original tumor. Drug administration studies in which absorbance was measured using the WST-1 assay showed a concentration-dependent reduction in absorbance when both cultured strains were treated with cisplatin, whereas organoids did not show a concentration-dependent reduction in absorbance when treated with temozolomide. We may need to investigate whether differences in responses between the two cell culture models indicate the actual sensitivity of the organism to the drug.

研究分野：脳腫瘍

キーワード：膠芽腫 オルガノイド 遺伝子プロファイル 薬物試験

1. 研究開始当初の背景

悪性神経膠腫、とりわけ膠芽腫の5年生存率は10%程度であり、新たな治療法の開発が熱望されている。ゲノム医学の急速な発展とあいまって、神経膠腫の分子生物学的異常の解明から治療法の開発を目指す研究が進歩しつつあり、腫瘍の分子病態異常に応じた個別化分子標的療法の選択が主流となりつつある。近年のがんの薬物療法においても、分子標的治療薬が臨床導入され、がんの薬物療法は高度に専門化し多様化しつつある。悪性神経膠腫の薬物療法においても、欧米では新規の分子標的薬の臨床開発が急速に進展しており、わが国においてもごく近い将来には、これらの薬剤を中心とした診療が行われるようになることが予想される。

先行研究の多くは、分子標的薬のスクリーニングの対象として2次元培養細胞であったが、3次元オルガノイドはより生体に近い環境を再現することが可能であると考えられることから、医薬品開発における化合物スクリーニングの対象として3次元オルガノイドの適用が急速に進んでいる。実際のがんの発育様式を再現することで、がん化の原因となりうる代謝異常、エピジェネティクスの変化、がん微小環境、がん免疫などの因子についても再現することが期待できる。この膠芽腫オルガノイドの安定的な培養・維持が行われれば、悪性神経膠腫の病態解明および新規治療法の開発が飛躍的に進むことが期待される。

2. 研究の目的

膠芽腫において、患者由来オルガノイドが2次元培養細胞と比較して生体に近い環境を再現することが可能であるのかについて、これまで十分に検証されていない。本研究では、患者由来膠芽腫オルガノイドを樹立し、二次元培養細胞と比較してその有用性を検証した。

3. 研究の方法

【患者由来膠芽腫オルガノイドと2次元培養細胞の樹立】

京都府立医科大学付属病院で膠芽腫と診断され摘出された腫瘍標本を用いて、膠芽腫オルガノイドと2次元培養細胞を樹立した。樹立した培養細胞を安定的に維持継代した。また、液体窒素で凍結保存し腫瘍バンクを作成した。

【腫瘍組織、膠芽腫オルガノイドおよび2次元培養細胞の遺伝子プロファイルの比較】

膠芽腫オルガノイドと2次元培養細胞は5代目まで継代培養を行った。

摘出した腫瘍組織と、初代、3代目と5代目の膠芽腫オルガノイドと二次元培養でそれぞれDNAを抽出した。時勢大シーケンサーを用いて、143遺伝子のターゲットシーケンスを行い、遺伝子プロファイルの変化を比較した。

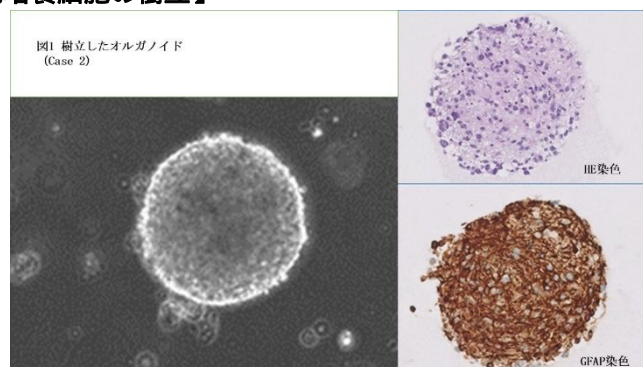
【膠芽腫オルガノイドおよび2次元培養細胞の薬剤投与試験の比較】

5代の各培養株で、シスプラチン(CDDP)(0.1, 1, 10, 100 $\mu\text{g}/\text{ml}$)とテモゾロミド(TMZ)(100, 200, 400, 800 $\mu\text{M}/\text{ml}$)の4種類の濃度を投与し、投与0-72時間後でWST-1アッセイを用いて吸光度を測定し細胞の生存率を評価する薬剤投与試験を行った。

4. 研究成果

【患者由来膠芽腫オルガノイドと2次元培養細胞の樹立】

膠芽腫オルガノイドと2次元培養細胞の樹立を4例で試みた。2例で両培養細胞の樹立が行えた。樹立できなかったのは2例のオルガノイドで、2例ともに再発症例であった。樹立したオルガノイドはGFAP染色で陽性でありグリア由来の細胞であることを確認した。(図1)



【腫瘍組織、膠芽腫オルガノイドおよび2次元培養細胞の遺伝子プロファイルの比較】

ターゲットシーケンスの結果では、Case2で元の腫瘍は、創薬可能な6遺伝子が候補としてあげられた。最初の継代で、2次元培養細胞は6つの遺伝子のうち5つを維持し、さらに4つの変異遺伝子を獲得した。しかし、継代3は継代1で同定された前の9つの遺伝子のいずれも示さず、異なる創薬可能な遺伝子 SETD2 を示した。継代5にはまだ SETD2 が含まれていたが、最初の継代で見つかった5つの元の変異遺伝子のうち2つを取り戻した。このことは、2次元培養細胞モデルの遺伝子プロファイルがさまざまな変化を経験し、細胞の継代中に元の創薬可能な遺伝子

標的が維持されないことを示唆していると考えられた。一方オルガノイドモデルでは、最初の継代で 2 次元培養細胞モデルの最初の継代でも見つかった元の腫瘍に関連する 6 つの創薬可能な遺伝子のうち、TP 53 と CD274 の 2 つの遺伝子が追加されたのと同じ 5 つが含まれていた。オルガノイドモデルの 3 番目の継代は、見つかった 1 つの追加の創薬可能な遺伝子を除いて、最初の継代と同様であった。5 番目の継代は、最初の継代で見つかったのと同じ遺伝的プロファイルに戻り、複数の継代の過程で遺伝的プロファイルを維持できることを示唆した。

Case4 は、元の遺伝子プロファイルに 3 つの創薬可能な変異しか示さなかった。これら 3 つの変異のうち、CDKN2A のみがオルガノイドモデルで維持された。2 次元培養細胞モデルは 5 番目の継代で消失した。(図 2)

以上の結果から 2 次元培養モデルと比較してオルガノイドモデルでは、5 代目においても初代と同様の遺伝子プロファイルを保持する傾向にあった。細胞株を継代しても、オルガノイドモデルでは初代と同様の遺伝子プロファイルを保持できていたことから、2 次元培養モデルよりも生体に近い実験モデルとなり得る可能性が示唆された。

図2 Landscape of genomic alterations: Actionable and Druggable mutations



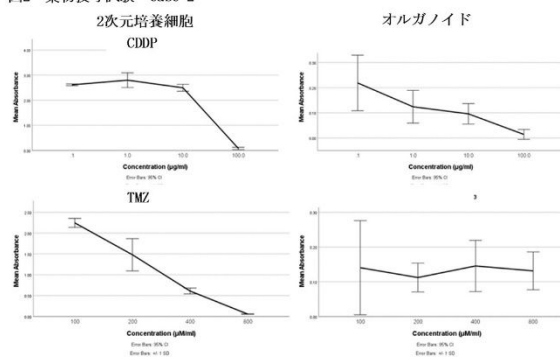
Landscape of genomic alterations: Mutations including VUS (variant of unknown significance)



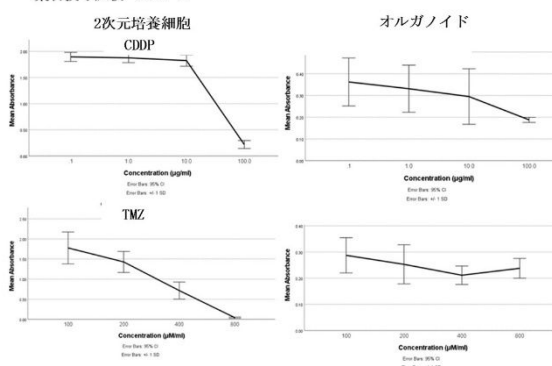
【膠芽腫オルガノイドおよび 2 次元培養細胞の薬剤投与試験の比較】

両症例の 2 次元細胞培養は CDDP および TMZ に感受性があり、薬物の用量依存性であった。一方、オルガノイドモデルは、CDDP に対する感受性が低く、吸光度の用量依存的な減少のみを示しました。GBO モデルへの TMZ の投与は、症例 2 と症例 4 の両方に効果がなかった。薬剤投与試験では、シスプラチンの投与で両培養株ともに濃度依存性に吸光度の減少を認めただのに対して、GBO ではテモゾロミド投与において濃度依存性に吸光度の減少を認めなかった。オルガノイドモデルと 2 次元培養細胞モデルの薬物試験では反応が異なっており、実際の生体の薬物に対する感受性を示すものであるかを検討する必要があると考えられる。

図2 薬物投与試験 Case 2



薬物投与試験 Case 4



継代を重ねても膠芽腫オルガノイドは 2 次元培養細胞と比較して元の遺伝子プロファイルを保持する可能性を示した。したがって、膠芽腫オルガノイドは腫瘍特異的薬剤感受性へつながる分子メカニズムの同定にも有用なモデルとなり得る可能性を示した。

今後はさらにオルガノイドの樹立数を増やし、既存薬ライブラリーを用いた薬物スクリーニングを行う予定である。また、ヒトでの安全性と体内動態が実績によって既に確認されている既存薬もしくは上市に至らず開発中止となった薬剤から抗腫瘍効果を有する薬剤を見つけ出し、実用化につなげることを目的に研究をさらに進めていく予定である。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔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	武内 勇人 (Takeuchi Hayato) (40838132)	京都府立医科大学・医学(系)研究科(研究院)・客員講師 (24303)	
研究分担者	橋本 直哉 (Hashimoto Naoya) (90315945)	京都府立医科大学・医学(系)研究科(研究院)・教授 (24303)	
研究分担者	梅林 大督 (Umebayashi Daisuke) (90635575)	京都府立医科大学・医学(系)研究科(研究院)・助教 (24303)	

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