

令和 6 年 6 月 4 日現在

機関番号：11501

研究種目：若手研究

研究期間：2020～2023

課題番号：20K16950

研究課題名（和文）膵癌organoidを用いた進行度特異的な遺伝子解析および診断マーカーの探索研究

研究課題名（英文）Research on the progression-specific genetic analysis and diagnostic markers detection using pancreatic cancer organoid

研究代表者

角田 道彦（Tsunoda, Michihiko）

山形大学・医学部・客員研究員

研究者番号：30838420

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）：膵癌組織及び膵癌organoid由来のDNAを用いて遺伝子変異解析を行い、organoidにより得られる癌遺伝子情報の安定性や研究利用における有用性について検討を行った。

Comprehensive cancer gene panelを用い、膵癌organoidはFFPE検体と高いvariantの一致率を示し（Simpson score 0.73～0.90）、同様に継代早期・後期の膵癌organoidのvariantは維持された（Simpson score 0.86～0.92）。EUS-FNA検体から樹立した膵癌organoidは、継代を重ねても由来組織と同様の変異を保持することが示された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

遺伝子解析にEUS-FNA検体を直接用いる場合、腫瘍細胞以外の間質組織由来のDNAが混在するため、ホルマリン固定したサンプルから腫瘍部分を選択的にdissectionして用いる必要があり、それでも十分な腫瘍量を得られない場合がある。癌細胞の選択的培養が可能なorganoidを遺伝子解析サンプルとして用いる事で、癌細胞以外に由来するDNAの混在がなく、かつ十分なDNA抽出量が得られるメリットがある。organoidは7-14日で十分な検体量が得られるまでに培養可能であり、化学療法前の薬剤感受性評価や遺伝子パネル解析の検体として臨床応用が可能である。

研究成果の概要（英文）：We studied gene mutation analysis using DNA from pancreatic cancer tissue and pancreatic cancer organoids and investigated the stability of cancer gene information obtained from organoids and its usefulness for research.

Using a comprehensive cancer gene panel, pancreatic cancer organoids showed a high variant concordance rate with FFPE samples (Simpson score 0.73-0.90), and similarly, the variants of early and late passage pancreatic cancer organoids (Simpson score 0.86-0.92). It was shown that pancreatic cancer organoids established from EUS-FNA specimens retain the same mutations as the source tissue even after multiple passages.

研究分野：膵癌 分子生物学

キーワード：膵癌 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

本邦の膵癌罹患患者数は年々増加傾向にあり、5年生存率は男女とも8%程度と極めて低く、早期発見・切除以外に有効な治療法のない難治癌である¹⁾。膵癌の発生過程は、膵上皮内腫瘍性病変が段階的に異形度を増す事で説明される「progression model」が通説である^{2,3)}。切除不能膵癌のゲノム解析が進まない理由は、膵癌組織を安定的に入手する事が困難であるという事実起因する。EUS-FNAは90%以上の正診率で膵癌の診断が可能であるが、解析用の検体としてはその量と質に問題がある。安定した質・検体量をEUS-FNAで得る手法として、組織検体を適切な培地で培養し維持する“organoid”の存在が挙げられる⁴⁾。マウスおよびヒト膵癌組織から得た検体を生体環境に近い3D環境下で培養した“Organoid”は組織学的性質を維持したまま培養・継代が可能であり、すでに研究応用が始まっている^{5,6)}。これまでは膵切除検体から作成されたorganoidを用いた報告が主であったが、2015年にFNA組織検体由来organoidを用いた遺伝子解析が報告されたが、報告例はごく少数である⁷⁾。

2. 研究の目的

申請者は、「ヒト膵癌由来のorganoidはその癌進行度に特異的な染色体異常および遺伝子変異を呈する」という仮説のもとに、まずはEUS-FNA検体から樹立した膵癌organoidの長期培養による遺伝学的安定性を明らかにし、癌遺伝子パネル検査における膵癌organoid検体の有用性を評価する事を第一の目的とした。

3. 研究の方法

1) 膵癌組織サンプルとorganoid培養法

検体は2020年3月から2021年8月までに山形大学医学部附属病院で膵癌に対してEUS-FNAを施行した16症例より得た。検体の回収に当たっては、山形大学医学部倫理委員会の承認(承認番号:2018-277)を得て行った。EUS-FNA検体の採取は、診断に十分な検体量を確保した上で、一回分の穿刺検体を研究用として回収した。Organoid培養は既報に準じた⁸⁾。

2) 正常膵組織サンプルとorganoid培養法

検体は2020年3月から2021年8月までに山形大学医学部附属病院で膵切除術を施行した3症例より得た。術前診断において膵癌以外の疾患と診断された症例を選択し、切除膵の正常膵実質部分を採取した。Organoidの培養、樹立、継代に関しては膵癌検体と同様の方法で行った。

3) 次世代シーケンサーによる癌遺伝子パネル解析

Ion AmpliSeq™ Comprehensive Cancer Panel (ThermoFisherScientific, Waltham, MA, USA)により次世代シーケンス解析を行った。ライブラリー調整として40ng DNAおよび5ng cfDNAについて製品プロトコルに従って16,000マルチプレックスPCRにより409の癌遺伝子および癌関連遺伝子のエクソン領域について増幅し、ライブラリーのqualityとして全自動電気泳動システム(4150 TapeStation, Agilent Technologies)を用いてHigh Sensitivity D100 Screen Tapeにより評価を行った。この調整したライブラリーについてエマルジョンPCRによりクローナル増幅を行った後、Ion 540 半導体チップ上に装填しIon Gene Studio S5 System (ThermoFisherScientific)により塩基解読を行った。解読されたリード配列についてYuM-HPC(540 core CPUs, 7.8T RAM)を用いてAmpliSeqGATK(v86, In house プログラム)を用いて超並列データ解析を行い、バリエーション判定、マイクロサテライト不安定性解析そしてCNA解析等を行った。バリエーション判定としてVariant Allele Fraction(VAF)を0.05(5%)とし、山形高齢健常者およびgnomAD (The Genome Aggregation Database)においてアレル頻度を認めないものについては体細胞系バリエーション、アレル頻度を認めるものについては胚細胞系バリエーションとした。

4) Variant一致率の評価(Simpson係数)と統計解析

Comprehensive Cancer Panelで変異解析を行ったFFPE検体、Organoid、血清cfDNAにおいて、検体間でのvariant発現一致率の評価方法として、Simpson係数を用いた。Simpson係数はOverlap coefficientとも呼ばれ、集合体の類似度を評価する手法である。集合体A、Bの共通要素を集合体A、Bのうち少ない要素数で除した数値である。Organoid樹立に成功した群(n=12)と不成功群(n=4)の2群において、年齢はt-test、膵癌進行度や背景疾患についてはFisher's exact testを行い、各因子のorganoid樹立成否に対する関連を評価した。OrganoidおよびFFPE検体から抽出したDNAをGenomic Screen Tapeで測定した結果得られたDNA検体のDIN、およびcfDNAの% cfDNAと濃度について、前者はorganoidとFFPE検体の2群、後者は培地中cfDNAと血清cfDNAの2群についてt-testを行い、p<0.01を有意と判定した。

4. 研究成果

1) 膵癌および正常膵由来organoidの病理学的評価

EUS-FNAおよび外科切除により組織検体を採取した症例の内、organoid培養の樹立が可能であったのは膵癌organoid16症例中12例(5継代以上の培養継続が可能だったもの10例)、正常膵organoid3症例中2例であった。膵癌organoid樹立に成功した12例と不成功の4例で、膵癌進行度や背景因子に有意差は認めなかった。膵癌organoidは観察用切片を作製し、H-E染色、免疫染色を行い正常膵組織標本、同一患者のEUS-FNA標本と比較した。正常膵(Figure.1A-a,b)、膵癌(Fig.1A-c,d)ともにorganoidは内腔構造を有する球形の細胞集塊を形成し、生体内と同様の細胞極性を有した状態を確認した。正常膵organoidは上皮細胞単層のcyst様構造を認めるものが多いのに対し、膵癌organoidは内部に小嚢胞を複数伴うものなど多様な形態を呈していた。H-E染色(Fig.1Ba-c)では、膵癌organoidは一部内腔構造を保ちながら核密

度の高い細胞集塊を形成し (Fig.1Bc) CK19 (Fig.1Bd-f) p53 (Fig.1g-i) 免疫染色では FNA 検体の腫瘍細胞が CK 陽性 (Fig.1e) p53 も部分的に陽性 (Fig.1h) を示すが、いずれにおいても間質のない organoid 細胞集塊は全体が均一に陽性を示している (Fig.1f, i)。

2) 癌遺伝子パネル解析に用いる検体の質的評価

正常膵および膵癌の organoid および同一患者の FFPE 組織検体から DNA を抽出し、同 organoid の培地上清および同一患者の血清検体から cfDNA を抽出した。得られた DNA および cfDNA は 4150 TapeStation System (Genomic DNA ScreenTape, Cell-free DNA ScreenTape) で質的評価を行った (Fig.2)。Organoid と FFPE 検体の DNA 分解の指標である DIN (DNA integrity number) の散布図 (Fig.2a) organoid と FFPE 検体における DIN 値の比較 (Fig.2b) を示す。Organoid から抽出した DNA は $DIN7.43 \pm 0.93$ 、FFPE 検体では $DIN4.23 \pm 2.40$ と前者が有意に高い DIN を保持し、FFPE 検体では断片化された DNA の検出が目立つ。Organoid から抽出した DNA は 52,408bp にピークをもつ低分解の均質な検体であるが、FFPE 検体は塩基長にばらつきがある。Organoid から抽出した DNA が遺伝子解析用の検体として品質を保持しているといえる。

3) 膵癌および正常膵 organoid の somatic variant と oncogenic KRAS variant

DNA が質的・量的に解析可能と判断された、正常膵 2 症例、膵癌 3 症例について、Ion AmpliSeq™ Comprehensive Cancer Panel により次世代シーケンス解析を行った。なお、膵癌症例については、Organoid 培養樹立可能であった症例の中で、病理医により腫瘍細胞含有率が 20%以上と確認できた EUS-FNA 検体を選択した。膵癌 organoid と正常膵由来 organoid の両者における somatic variant 数と、膵癌の 9 割に認められる KRAS variant について Table.2 に示す。409 癌遺伝子中、山形高齢健康者および gnomAD (Genome Aggregation Database) において variant を認めず、COSMIC (the Catalogue Of Somatic Mutations In Cancer) v94 データベースに登録されている変異を somatic variant として評価した。コントロール・膵癌 organoid においてこの定義を満たす somatic variant は 6.4~11.4% (中央値: 7.3%, 6.9~7.7) であった。膵癌 organoid では 3 症例において各々異なる KRAS variant の発現を認めるが、正常膵由来 organoid では 2 症例とも変異は検出されなかった。膵癌から樹立した organoid は driver mutation である KRAS variant をいずれも発現し、病理学的評価とあわせて、膵癌診断に用いる検体として適切であると考えられた。

4) FFPE 検体・Organoid・血清 cfDNA における somatic variant

Organoid と FFPE 組織検体および血清中 cfDNA が有する variant の一致率について評価した (Table.3)。FFPE 検体と organoid の variant 比較が可能であった 3 症例の代表的 variant と VAF (variant allele frequency) を Fig.3a に示す。FFPE 検体と organoid の variant 一致率は、膵癌 2 症例において、2 集団における類似性を評価する Simpson score が 0.73-0.83 と高い一致率を示し (Table.4) 各々の膵癌症例において FFPE 検体と organoid で共通する variant の異なるクラスターを形成している事が分かる (Fig.3a)。また、organoid の早期・後期継代においても同様に評価した結果、variant の一致率は高く (Simpson score 0.86-0.92, Table.4) 継代を経ても安定的に存在する事が示された (Fig.3b)。コントロールは 1 症例のみの評価だが、Simpson score 0.41 と低値にとどまった。一方、organoid と血清 cfDNA の variant 一致率は検体間でばらつきが大きく (Table.3) 評価可能であった膵癌 2 症例においても Simpson score は 0.52-0.56 と低値を示した。また、膵癌症例の KRAS variant は FFPE 検体および organoid でいずれも発現を認めたが、血清検体では確認されなかった (Table.4)。ddPCR により KRAS のアミノ酸変異タイプごとに定量的解析を行ったところ、NGS で KRAS variant を認めた organoid、FFPE 検体はいずれも ddPCR において発現を確認できたが、血清検体では認めなかった (Fig.4)。この結果から、本検討においては、遺伝子解析を行う検体として、保存血清より膵癌 organoid が適切である事が示された。

遺伝子解析に膵癌 EUS-FNA 検体を直接用いる場合、腫瘍細胞以外の間質組織由来の DNA が混在するため、ホルマリン固定したサンプルから腫瘍部分を選択的に dissection して用いる必要があり、それでも十分な腫瘍量を得られない場合がある¹¹⁾。癌細胞の選択的培養が可能な organoid を遺伝子解析サンプルとして用いる事で、癌細胞以外に由来する DNA の混在がなく、かつ十分な DNA 抽出量が得られるメリットがある。本検討においても、オルガノイドから抽出した DNA は低分解の均一なサンプルが得られた (Fig.2)。膵癌 organoid は、由来組織の遺伝学的再現性が高く、長期的に維持培養が可能である事はコンセンサスが得られており¹⁰⁾、EUS-FNA で採取される少量検体でも organoid の樹立が可能であると報告されている^{12,13)}。しかし、継代により新たな変異を発現する可能性は完全に否定できず、培養初期と継代後の遺伝子解析を行った報告はない。膵癌 3 症例とも、2 継代にわたって FFPE 検体の variant 再現性は高く、かつ継代を経ても高い variant 一致率を示した (Table.3)。遺伝子解析に organoid を用いる場合、早期継代でサンプルを採取する方が時間とコスト両面から適切であると考えられ、7-10 日で DNA を抽出する事が可能である。本邦において、2021 年 8 月に血液検体を用いた "liquid biopsy" を実現するがんゲノムプロファイル (FoundationOne® Liquid CDx, 中外製薬) も保険診療で行える体制が整った。非侵襲的な手法であり、経時的に発現変異を捉える事が可能であるなど、liquid biopsy のメリットは大きい¹⁴⁾。FoundationOne® Liquid CDx を用いた場合、組織検体と血液検体での変異一致率は 75%と報告されている²⁴⁾。しかし、cfDNA に占める腫瘍由来 DNA (circulating tumor DNA; ctDNA) の割合は低く、癌遺伝子変異の検出率に影響し¹⁶⁾、血漿のみの解析では正常細胞内のクローン造血由来の遺伝子変異と区別することが困難である。本検討では、FFPE と organoid で KRAS variant は一致しているが、保存血清検体中の cfDNA では発現がなく (Table.4)、ddPCR による validation でも血清 cfDNA のみ変異は確認されなかった (Fig.4)。Liquid biopsy で用いる検体は血漿が望ましいとされており、健康成人・肺癌・大腸癌患者の血漿と血清中の cfDNA を用いて比較検討を行った報告では、血漿の方が driver 遺伝子の allele frequency が有意に高いと報告している¹⁷⁾。膵癌患者 113 人の血漿 cfDNA における KRAS 変異発現を評価した報告では変異検出率は 23%であ

り、validation cohort でも 20.5%であったと述べている¹⁸⁾。本検討においても KRAS 変異検出において organoid が cfDNA より優れている事が示された事から、liquid biopsy の解釈は慎重に行うべきであり、質と量の両面から補完する organoid の有用性は高い。

本検討の limitation として、評価したサンプルが少数であるため一個体の情報に偏っている可能性が挙げられ、現在 organoid を樹立している他のコホートにおいても、同様の評価を行う必要がある。また、本研究の当初の目的は、癌進行度を反映した染色体異常や遺伝子変異の評価であったが、organoid 樹立まで予想以上に時間を要したため、研究期間内に実質する事ができなかった。今後は、膵癌の薬剤抵抗性の要因となる間質の存在を考慮し、間質細胞との共培養を行った上で検討を進める予定である。

Reference

- 1) 田中英夫. 日本臨床. 2015;73:37-41.
- 2) Hruban RH, et al. Clin Cancer Res. 2000;6(8):2969-72.
- 3) Notta F, et al. Nature. 2016;538(7625):378-382.
- 4) Tiriach H, et al. Gastrointest Endosc. 2018;87(6):1474-1480.
- 5) Xu H, et al. J Hematol Oncol. 2018;11(1):116.
- 6) Huang L, et al. Nat Med. 2015;21(11):1364-71.
- 7) Boj SF, et al. Cell. 2015;160(1-2):324-38.
- 8) Li ML, et al. Proc.Natl Acad.Sci.U.S.A 1987; 84:136-140.
- 9) Gustuv J, et al. Biomol.Detect.Quantif. 2019; 17:100078.
- 10) Sylvania F B, et al. Cell. 2015;15;160(1-2):324-38.
- 11) 小田 義直ら.ゲノム診療用病理組織検体取扱い規程. 2018.
- 12) Nikitas G, et al. BMC Dev Biol. 2020;20(1):4.
- 13) Herve T, et al. Gastrointest Endosc 2018; 87(6) :1474-1480.
- 14) Iwama E, et al. Cancer 126:219-227, 2020.
- 15) Yongqian S, et al. Sci Rep. 2017;7(1):583.
- 16) Jason D M, et al. J Clin Oncol. 2018;36(16):1631-1641.
- 17) Fabio PS, et al. Clin Chem. 2020;66(7):946-957.
- 18) Shiwei G, et al. Br J Cancer. 2020;122(6):857-867.

Figure.1

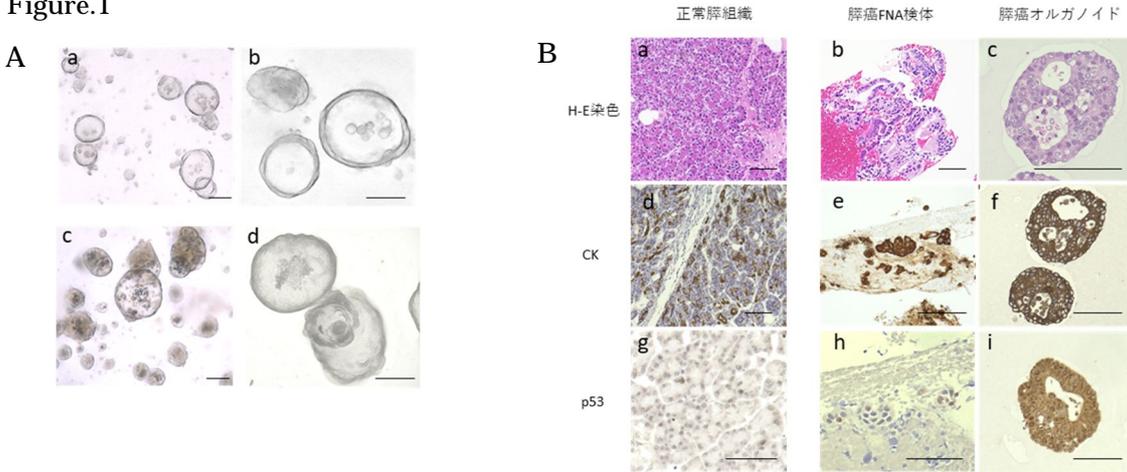


Figure.2a

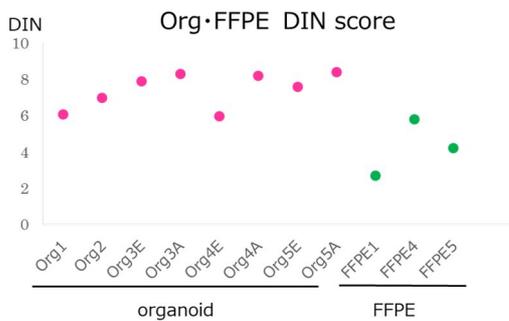


Figure.3a

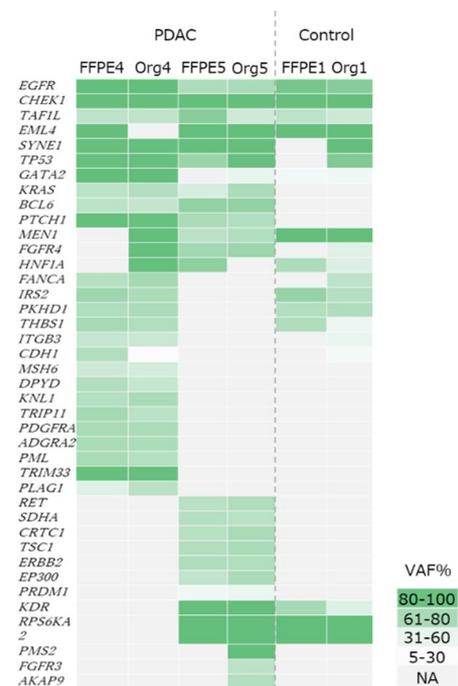


Figure.2b

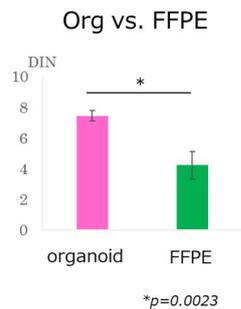


Figure.3b

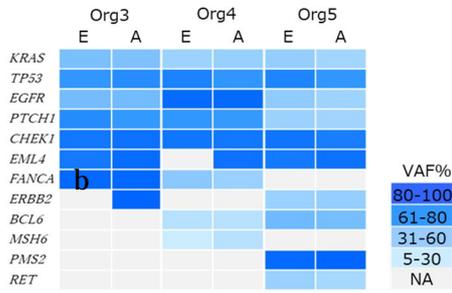


Figure.4a

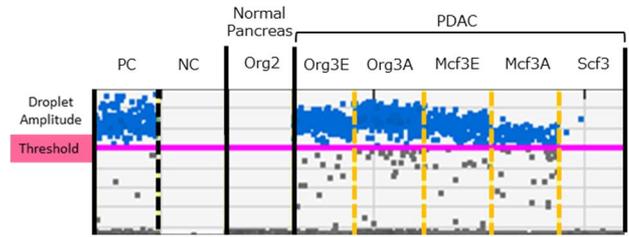


Figure.4b

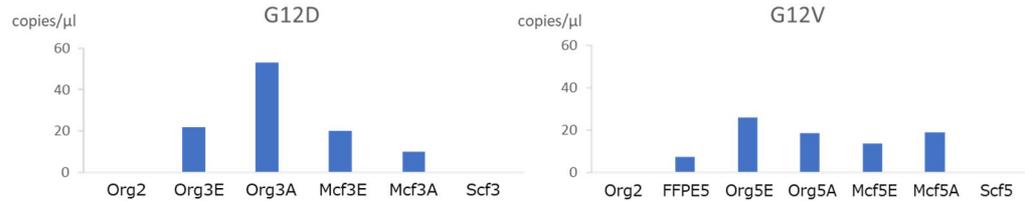


Table.1 Organoid の somatic variant と KRAS variant ・ アミノ酸変異

	Organoid	Passage*1	Somatic variants*2	KRAS	
				AA change*3	VAF*4
Control	Org1	E	47 (11.4%)	NA	NA
	Org2	E	34 (8.3%)	NA	NA
PDAC	Org3	E	28 (6.8%)	G12D	0.643
		A	32 (7.8%)	G12D	0.625
	Org4	E	30 (7.3%)	G12R	0.489
		A	29 (7.1%)	G12R	0.511
	Org5	E	29 (7.1%)	G12V	0.520
A		26 (6.4%)	G12V	0.463	

*1. 継代数1-2回のearly passage : E, 継代数9-10回のadvanced passage : A, *2. Somatic variantsはすべてsingle nucleotide variant, ()は409癌遺伝子中のvariant発現割合, *3. AA : amino acid, *4 VAF : variant allele frequency.

Table.2 FFPE 検体 ・ Organoid ・ 血清 cfDNA における somatic variant

Case ID.	Variants number			Overlaps*2 (Number/Simpson score)						
	FFPE	OR	Scf*1	FFPE-Org*3	OrgE-OrgA*4	Org-Scf*5				
Control	1	39	46	30	16	0.41	-	-	9	0.3
	2	-	33	24	-	-	-	-	18	0.75
PDAC	3-E	-	28	30	-	-	25	0.89	12	0.52
	3-A	-	32	-	-	-	-	-	-	-
	4-E	-	30	-	26	0.87	25	0.86	-	-
	4-A	37	29	-	26	0.90	-	-	-	-
	5-E	-	30	25	22	0.73	25	0.92	14	0.56
	5-A	32	27	21	21	0.78	-	-	-	-

*1. Scf : Serum cfDNAのvariant数, *2. Overlaps : 共通のvariant数, *3. FFPE検体とorganoidの共通variant数, *4. Organoidの早期継代 (OrgE) と晚期継代 (OrgA) 間での共通variant数, *5. Organoidと培地中cfDNA間の共通variant数.

Table.3 FFPE 検体と Organoid および血清検体における KRAS variant

		FFPE	Org-E	Org-A	Scf
Control	ID1	NA	NA	-	NA
	ID2	-	NA	-	NA
	ID3	-	G12D	G12D	NA
PDAC	ID4	G12R	G12R	G12R	-
	ID5	G12V	G12V	G12V	NA

*1. Scf : Serum cfDNA

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計1件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 角田道彦
2. 発表標題 局所進行膵癌の至適治療 EUS-FNA検体を用いた術前化学療法に向けた薬剤感受性評価の可能性
3. 学会等名 第30回JDDW2022 第64回日本消化器病学会大会 神戸
4. 発表年 2022年～2023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
研究協力者	松田 松田 (Matsuda Akiko)	山形大学 (11501)	
研究協力者	小山 創志 (Oyama Soshi)	山形大学 (11501)	

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