

令和 5 年 5 月 9 日現在

機関番号：15301

研究種目：若手研究

研究期間：2020～2022

課題番号：20K17748

研究課題名（和文）iPS肺がんオルガノイドモデルを用いた新規治療法の開発

研究課題名（英文）Novel therapeutic approaches for lung cancer by using iPS cell-derived organoids

研究代表者

枝園 和彦（Shien, Kazuhiko）

岡山大学・大学病院・講師

研究者番号：30708079

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、ヒト多能性幹細胞から3次元で分化誘導した肺組織（肺オルガノイド）とゲノム編集技術を組み合わせた独自の肺がんオルガノイドモデルの作製と、その病態モデルとしての妥当性を検討し、がん細胞と周囲の微小環境を標的とした新規治療戦略の開発を目指した。ヒト多能性幹細胞を用いて肺オルガノイドを作成した後、がん遺伝子の過剰発現あるいはがん抑制遺伝子変異の組み合わせ（共変異）によって、前がん病変様の変化および肺がんの初期腫瘍形成過程を3次元的に再現することに成功した。これらについては、分子標的治療薬への特徴的な薬剤感受性を示し、薬物治療抵抗性克服に向けた新たな知見を得た。

研究成果の学術的意義や社会的意義

従来、肺がんの腫瘍形成過程をヒト由来の細胞を用いて3次元的に再現することは困難であった。本研究では、ヒト多能性幹細胞と新たな遺伝子編集手法を用いることで、「肺オルガノイド（多能性幹細胞から3次元で分化誘導した肺組織）をがん化させる」ことに成功した。今回の新たな3次元肺がんモデルを用いることで、肺がん機序の解明のみならず、肺がん細胞および周囲のがん微小環境を標的とした新規治療薬開発への応用が期待される。

研究成果の概要（英文）：In this study, we generated a unique lung cancer organoid model by combining lung tissue differentiated in 3D from human pluripotent stem cells (lung organoids) and genome editing technology, and examined its validity as a pathological model to develop novel therapeutic strategies targeting cancer cells and their surrounding cancer microenvironment. After generating lung organoids using human pluripotent stem cells, we successfully recapitulated precancerous lesion-like changes and the early tumorigenesis process of lung adenocarcinoma by combining overexpression of oncogenes and loss of tumor suppressor genes. These cells showed characteristic drug sensitivity to molecular targeted therapies, providing new insights into overcoming drug treatment resistance.

研究分野：呼吸器外科

キーワード：非小細胞肺がん 微小環境 オルガノイド iPS細胞

## 様式 C-19、F-19-1、Z-19 (共通)

### 1. 研究開始当初の背景

EGFR 変異肺癌に対して EGFR 阻害剤の有効性が示されたことで、肺癌の治療法は激変し、プレジジョンメディシン時代の幕開けとなった。以降、様々な治療薬が開発され臨床応用されているにも関わらず、がん細胞の治療抵抗性の獲得は避けられない。腫瘍内にはがん細胞のほか、がん関連線維芽細胞 (cancer-associated fibroblasts, CAFs) に代表されるがん細胞周囲間質細胞といった腫瘍微小環境が存在する。それぞれの細胞が相互作用により複雑なネットワークを形成し、がん細胞の悪性化や治療抵抗性に重要な役割を果たしていることが明らかとなりつつある。したがって、肺癌治療成績の向上には、がん細胞の増殖・進展に強く関与するドライバー変異を標的とした治療法のみならず、腫瘍微小環境に起因する治療抵抗性に関する機序について詳細な検討を行い、腫瘍微小環境を標的とした治療法を開発する必要がある。

従来のがん研究では、腫瘍組織から樹立されたがん細胞株や、不死化した正常組織由来細胞株にがん遺伝子を導入した細胞を用いて分子生物学的解析を行うことによって、がんの特性を評価することが主要な研究方法であった。これらの細胞株ががんの病態解明における有効な基盤であることは論を俟たないが、がん細胞株はがん細胞のみの集団であること、正常組織由来細胞株は不死化させているために厳密な正常細胞とは言えないこと、またこれらは通常 2 次元細胞培養モデルで検討されることから、がん周囲の細胞からの影響を受けている生体内の腫瘍組織を正確に反映しているとは言えない。一方で、「人工多能性幹細胞 induced pluripotent stem cell (iPS 細胞)」は、人間の皮膚などの体細胞にごく少数の因子を導入し培養することによって、様々な組織や臓器の細胞に分化する能力と、ほぼ無限に増殖する能力を獲得した多能性幹細胞である。近年、多能性幹細胞から 3 次元で分化誘導した組織は「オルガノイド」と呼称され、複数の臓器特異的な細胞型より構成され、生体で見られるような構造や機能を保持している。これまでに神経組織や腎臓、胃、肝臓、腸管などのオルガノイドが報告されているが、申請者が所属する研究グループでは既にヒト iPS 細胞から肺オルガノイドを作製する技術を確立しており、これにゲノム編集技術による遺伝子変異導入を組み合わせることで、*in vitro* で生体内の腫瘍微小環境を模倣した肺癌モデルが作製可能になると考えた。オルガノイドにがん関連遺伝子変異を発現させた独自の肺癌オルガノイドモデルを作製することによって、従来の 2 次元がん細胞培養モデルよりも、腫瘍内部の低酸素状態や栄養素勾配、細胞間相互作用などといった生体に類似した環境下でがんの特性を評価できることが期待される。

### 2. 研究の目的

本研究では、ヒト iPS 細胞を用いた肺オルガノイドとゲノム編集技術を組み合わせ、*in vitro* で生体内の腫瘍微小環境を模倣する独自の肺癌オルガノイドモデルの樹立を目的とした。さらに作成したオルガノイドの表現型を評価し、病態モデルとしての妥当性の検討に加え、治療抵抗性機序の一つとされる腫瘍微小環境を標的とした創薬応用を目指した。

### 3. 研究の方法

#### 1) iPS 細胞からの効率的な肺オルガノイドの作製

申請者が所属する研究グループでは、iPS 細胞から肺組織への分化誘導に必要な各種増殖因子や低分子化合物を培養培地に付加することで徐々に肺へと誘導し、肺の前駆細胞を用いた 3 次元培養により肺オルガノイドを作製することに成功している。これらについて、誘導期間や培地に加える各種増殖因子や低分子化合物といった肺オルガノイド作製のための条件の最適化を図り、安定して均質な肺オルガノイドを作製した。iPS 細胞と同様に、ES 細胞からも肺オルガノイドを作成した。肺オルガノイドを分化誘導するプロトコルの作成にあたっては、分化誘導効率を可視化するために、肺前駆細胞マーカーである NKX2.1 のレポーター株を作成した。

#### 2) 単一～複数がん関連遺伝子導入による肺癌オルガノイドモデルの確立

まず、AAVS1 領域にがん遺伝子である野生型 *HER2* を knock-in したヒト iPS 細胞を作成した。それを肺オルガノイドまで分化誘導し、さらにドキシサイクリン投与により *HER2* を過剰発現させた。作成したオルガノイドについて、細胞形態、増殖能、遺伝子発現およびタンパク質発現等を、HE 染色、免疫染色、ウエスタンブロッティング等により評価した。また、複数遺伝子の変異 (共変異, co-mutation) がもたらす変化の評価を目的とし、PiggyBAC システムを用いて、がん遺伝子である野生型および変異型 *KRAS* を、がん抑制遺伝子である *TP53* を欠損させたヒト ES 細胞株に導入した。それを肺オルガノイドまで分化誘導し、さらにドキシサイクリンを投与することで *KRAS* を過剰発現させた。作成したオルガノイドについて、細胞形態、増殖能、遺伝子およびタンパク質発現等を、HE 染色、免疫染色、RNAseq 等で評価した。これらについて、分子標的薬等を投与し、感受性の変化や下流のシグナル変化を検討した。

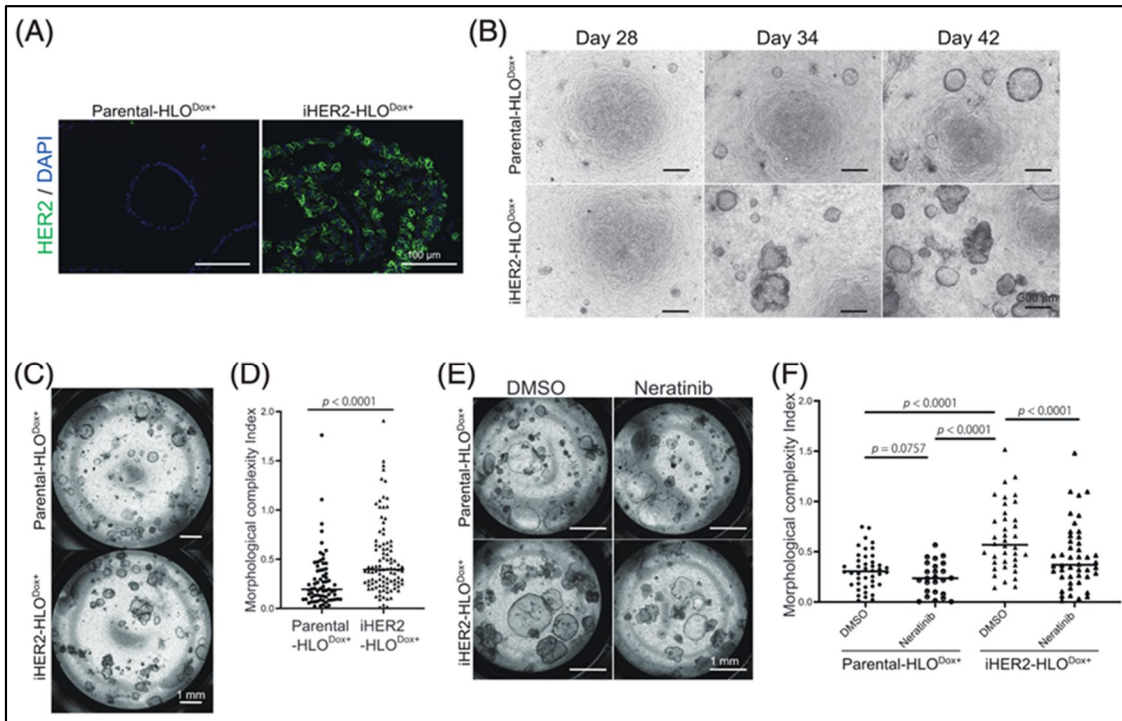
#### 3) 腫瘍微小環境を標的とした治療法の開発

肺癌オルガノイドについて、別途樹立した線維芽細胞株を加えて共培養し、生体内における腫瘍微小環境をより精巧に再現したモデルを作製し、肺癌オルガノイドとの相互作用を解析した。

#### 4. 研究成果

##### 1) ドキシサイクリン依存性 *HER2* 過剰発現株を用いた、ヒト肺がんオルガノイドの作成

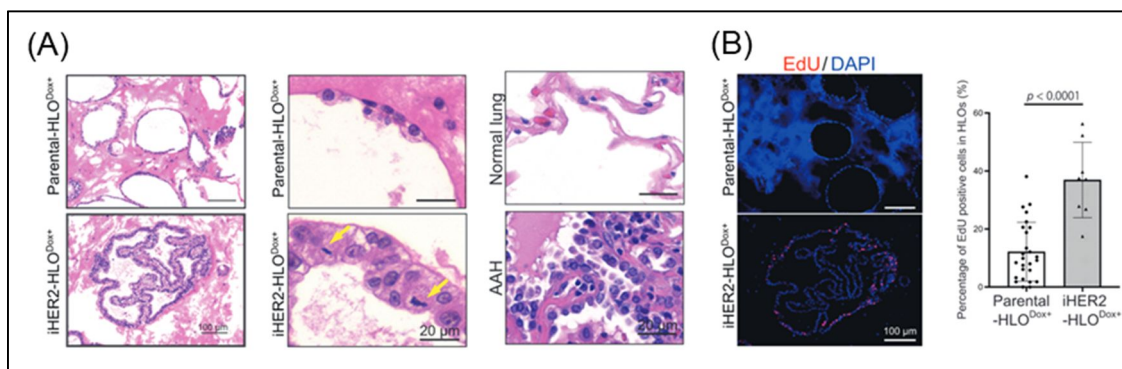
AAVS1 領域に野生型 *HER2* を knock-in したヒト iPS 細胞を作成した。それを肺オルガノイド (Human lung organoid, HLO) まで分化誘導し、ドキシサイクリンにより *HER2* を過剰発現させたところ、*HER2* 過剰発現 HLO は親株と比較して明らかに形態が複雑化しており、Morphological complexity index (MCI) の有意な増加を認めた (図 1A-D)。これらに EGFR/*HER2* 分子標的治療薬である neratinib を投与したところ、*HER2* 過剰発現 HLO において、neratinib 投与が MCI を有意に低下させた (図 1E,F)。

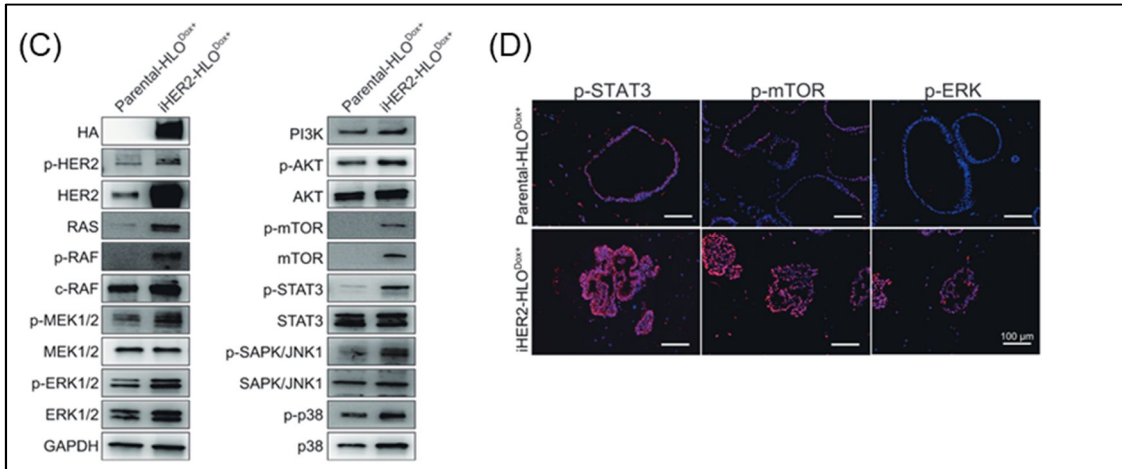


**図 1. *HER2* 導入 iPS 由来肺オルガノイド (iHER2-HLO) の作成と *HER2* 過剰発現による形態および薬剤感受性の変化**

(A) 免疫染色による *HER2* 発現の確認、(B-D) *HER2* 過剰発現 HLO で Morphological complexity index (MCI) が有意に増加、(E,F) *HER2* 過剰発現 HLO は抗 *HER2* 分子標的治療薬に感受性を示す

興味深いことに、*HER2* 過剰発現 HLO は、肺がん患者検体における異型腺腫様過形成 (Atypical Adenomatous Hyperplasia, AAH) に類似した組織像を呈した (図 2A)。これらについては、EdU (5-ethynyl-2'-deoxyuridine) によりラベリングされた細胞が親株に比較して有意に多く、増殖能の増加が示唆された (図 2B)。ウエスタンブロッティングおよび免疫染色では、がん関連パスウェイである p-STAT3, p-mTOR, p-ERK の過剰発現を認めた (図 2C,D)。



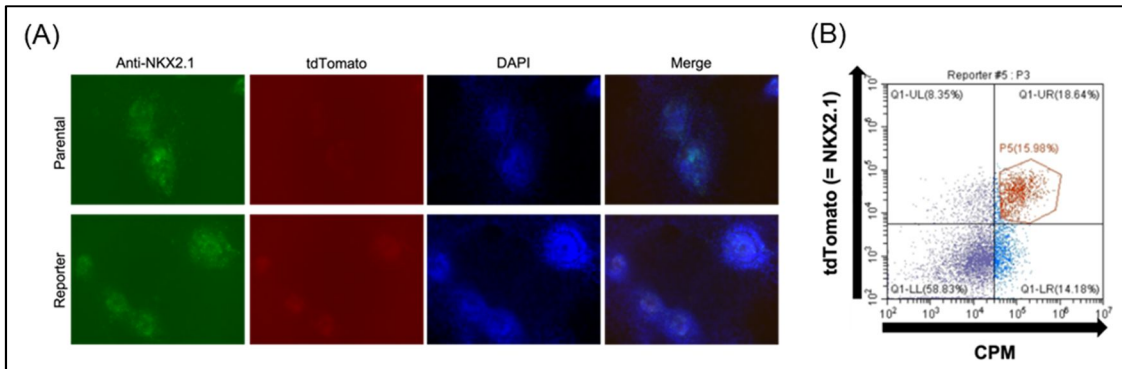


**図 2. *HER2* 導入 iPS 由来肺オルガノイド (iHER2-HLO) における組織学的変化と下流シグナルの変化**

HER 過剰発現によって (A) 前がん病変 (AAH) 様の組織像変化、(B) 増殖能 (EdU 陽性細胞) の増加、(C,D) がん関連パスウェイの活性化を認める

## 2) NKX2.1 のレポーター株の作成

次に、肺胞への分化誘導効率の可視化を目的として、SEES4 (ヒト ES 細胞株) の NKX2.1 遺伝子の 3' UTR 領域 に対し、CRISPR-Cas9 を用いて IRES-tdTomato-PGK-Neo カセットを挿入した。作成した NKX2.1 レポーター株を肺前駆細胞へ誘導し、免疫染色したところ、tdTomato の発現と NKX2.1 抗体による染色の overlap を確認できた (図 3A)。また、肺前駆細胞で NKX2.1 と同時に発現が見られる Carboxypeptidase M (CPM) に対する抗体を用いて Flow cytometry を行ったところ、CPM 強陽性の細胞集団に tdTomato の発現が見られた (図 3B)。このレポーター株を用いて、肺前駆細胞誘導プロトコルの最適化と、各分化誘導実験における効率の可視化を行った。



**図 3. NKX2.1 のレポーター株の作成**

## 3) ドキシサイクリン依存性変異型 *KRAS* 過剰発現および *TP53* 欠損株を用いた、ヒト肺がんオルガノイドの作成

続いて、がん抑制遺伝子とがん遺伝子の co-mutation ががん化に与える影響の評価を目的として、*TP53* を欠損させたヒト ES 細胞に *KRAS* 野生型および *KRAS*-G12C 変異型遺伝子を導入した。これらについて *KRAS* の発現量を比較したところ、いずれの株でも同等の発現を示した (図 4A)。これらを HLO まで分化誘導したところ、NKX2.1 陽性であり、かつ 2 型肺胞上皮細胞のマーカーである SFTPC も陽性であった (図 4B)。また、ドキシサイクリンによる *KRAS* 過剰発現により、*KRAS*-G12C 変異株で明らかなオルガノイドの形態異常と核異型を認め、がん化の過程を 3 次元的に再現することに成功した (図 4C,D)。

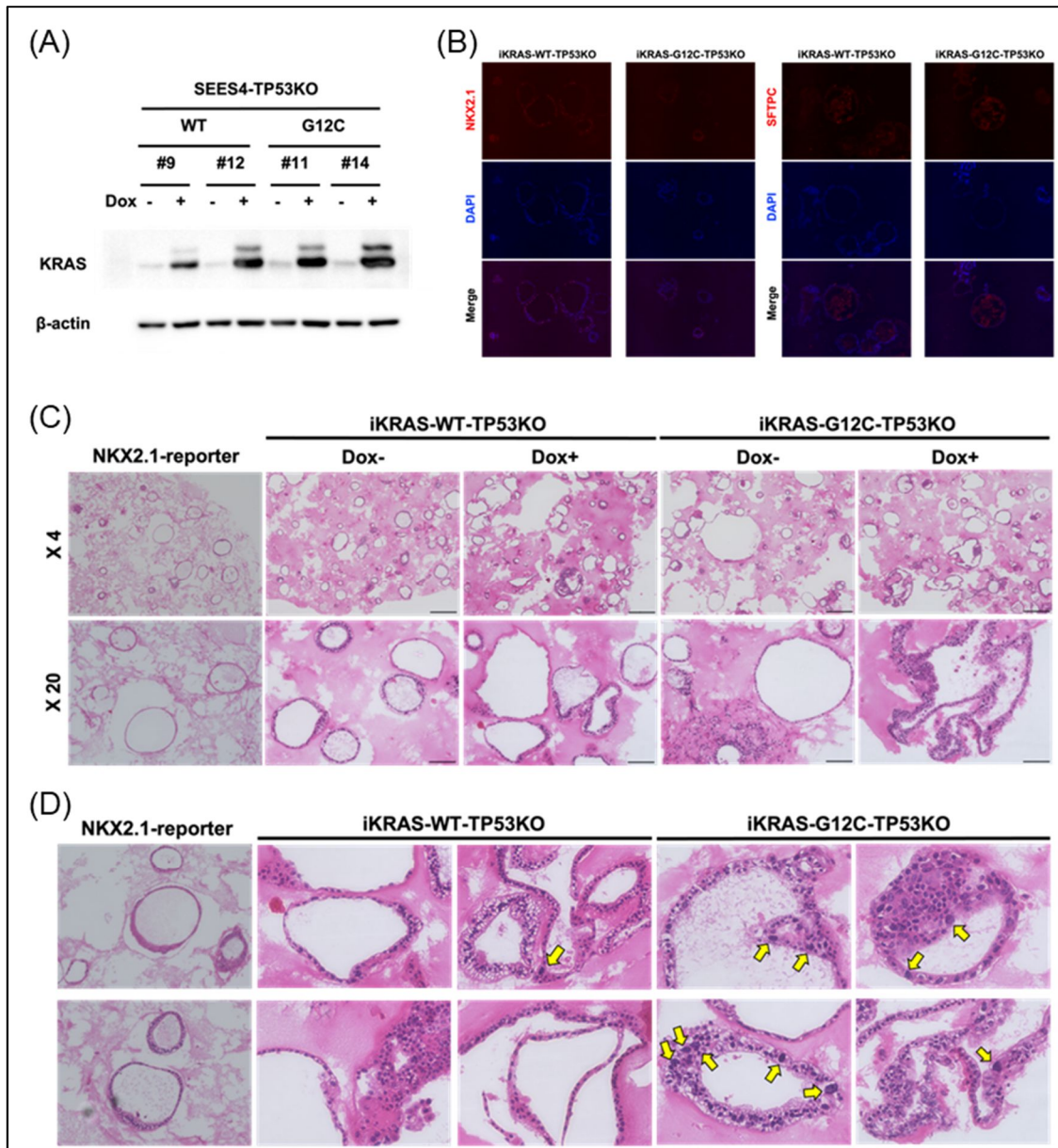


図 4. *TP53* および *KRAS-G12C* 共変異 (co-mutation) による HLO の変化

(A) *KRAS* 野生型および *KRAS-G12C* 変異型導入株いずれも同等の *KRAS* 発現量、(B) HLO まで分化誘導した *TP53/KRAS-G12C* 共変異株で *NKX2.1* および *SFTPC* いずれも陽性、(C,D) *KRAS* 過剰発現により *TP53/KRAS-G12C* 共変異株で明らかな HLO の形態異常と核異型あり (⇒)

#### 4) まとめ

以上より、本研究ではヒト多能性幹細胞を用いて肺がんオルガノイドを作成した後、がん遺伝子の過剰発現あるいはがん遺伝子とがん抑制遺伝子変異の組み合わせ (co-mutation) によって、前がん病変様の変化および肺がんの初期腫瘍形成過程を 3 次的に再現することに成功した。これらの肺がんオルガノイドについては、別途樹立した線維芽細胞株を加えて共培養することで生体内における腫瘍微小環境をより精巧に再現したモデルを作製し、肺がんオルガノイドの表現型の変化や薬剤感受性の変化等の検討を行っている。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計1件（うち査読付論文 1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 Miura Akihiro, Yamada Daisuke, Nakamura Masahiro, Tomida Shuta, Shimizu Dai, Jiang Yan, Takao Tomoka, Yamamoto Hiromasa, Suzawa Ken, Shien Kazuhiko, Yamane Masaomi, Sakaguchi Masakiyo, Toyooka Shinichi, Takarada Takeshi	4. 巻 149
2. 論文標題 Oncogenic potential of human pluripotent stem cell derived lung organoids with HER2 overexpression	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 International Journal of Cancer	6. 最初と最後の頁 1593 ~ 1604
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1002/ijc.33713	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
---------	---------