

令和 5 年 6 月 12 日現在

機関番号：35303

研究種目：若手研究

研究期間：2020～2022

課題番号：20K17765

研究課題名（和文）肺癌の組織型とドライバー変異に基づくオルガノイド培養法の最適化

研究課題名（英文）Optimization of organoid culture system based on histology and driver mutations in lung cancer

研究代表者

吉田 将和 (Yoshida, Masakazu)

川崎医科大学・医学部・特任研究員

研究者番号：30868914

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）：近年、癌研究において各臓器癌由来のオルガノイドが樹立され、細胞株や遺伝子改変マウスに代わる新しい癌モデルとして用いられてきている。本研究において、肺癌の組織型とドライバー変異の違いに着目し、オルガノイド培養法の最適化を行った。肺癌オルガノイドの樹立過程で、正常肺由来オルガノイドがより早く増殖し、癌細胞に置き換わる現象が報告されており、樹立を阻む原因の一つと考えられている。肺癌各組織型に対する培養条件を検討することで、MDM2阻害剤フリーの培養液での樹立ができており、理論的にp53野生型肺癌からのオルガノイド樹立が現在可能となっている。

研究成果の学術的意義や社会的意義

臨床病期 Ⅰ期、Ⅱ期の非小細胞肺癌の根治術後、26%に局所や遠隔再発がみられている（Boyd et al. J Thorac Oncol 5: 210-4. 2010）。このような再発症例や、ドライバー変異不明肺癌から、オルガノイドを作製し、in vitroでの薬剤感受性試験を行うことで治療効果を予測できるようになる。オルガノイドが樹立法の改善は、個別化医療の進展や新規治療法開発のための基礎研究に寄与する。

研究成果の概要（英文）：Recently, organoids derived from various cancers have been established and used as new cancer models to replace cell lines and genetically engineered mice in cancer research. In this study, we focused on histological differences and driver mutations of lung cancer, and optimized the organoid culture system. Normal organoids originating from normal lung epithelial cells reportedly proliferate faster and get replaced by cancer cells during the generation of lung cancer organoids, which is considered as one of the reasons for the failure of the establishment. By examining culture conditions for each histological type of lung cancer, we established an organoid culture system in an MDM2 inhibitor-free media, making it theoretically possible to establish organoids from a p53 wild-type lung cancer.

研究分野：呼吸器外科

キーワード：肺癌 オルガノイド 個別化医療

## 1. 研究開始当初の背景

近年、国内外において生検サンプルや切除臓器を活用したオルガノイド研究が進められてきている。オルガノイドは、解剖学的、機能的に生体内に存在する器官に近い特徴を示すことから、これまで困難であった生命現象の解析が可能になってきた (Lancaster MA et al. *Science* 345:1247-1251. 2014)。癌分野においても、各臓器癌に由来するオルガノイドが樹立され、細胞株や遺伝子改変マウスに代わる新しい癌モデルとして、個別化医療や新規治療法の開発に用いられてきている。肺癌においても、そのオルガノイド樹立と培養に関する研究が欧州、米国より報告され (Sachs N et al. *EMBO J.* 38: e2018100300. 2019, Wang et al. *Annals of Oncology* 30: 447-55. 2019)、今後も基礎研究や橋渡し研究への応用が期待される。この中で申請者らは、肺癌切除組織からのオルガノイドの樹立を行い、現在肺癌オルガノイドの作製に成功している。しかしその樹立率は自施設、他施設ともに高くなく、作製と培養法の改善を必要とする。一方で、他臓器癌からのオルガノイド研究は進展しており、ことに大腸癌においては、変異シグナルに着目した培養法の開発を経て、オルガノイドの効率的な樹立が可能となっている (Sato T et al. *Gastroenterology*. 141: 1762-72. 2011)。肺癌は組織型が多く (腺癌、扁平上皮癌、小細胞癌、大細胞癌、腺扁平上皮癌、カルチノイド等)、また腺癌に限っても組織亜型 (e.g. 粘液産生腺癌) やドライバー変異の差により癌の性質は異なっている。肺癌の増殖シグナルの複雑さと多様さが、オルガノイド作製と長期培養を困難にしていることが推察される。

## 2. 研究の目的

我々がこれまでに取り組んできた肺癌オルガノイド作製において、切除肺癌組織に認められていたドライバー変異が、オルガノイド継代培養の過程で消失する現象がしばしばみられている。同様の現象は全英多施設共同肺癌前向き研究プロジェクト: TRACERx に登録された肺癌患者組織を用いた研究においても negative data として報告されており (Hynds et al. *Int J Cancer*. 143: 160-66. 2018)、既存プロトコールにおける培養法は、必ずしも多様な肺癌増殖シグナルに対応できないことが示唆されている。本研究計画において、肺癌の組織とドライバー変異別にオルガノイド培養法の最適化を行う。

## 3. 研究の方法

### 1. 肺腺癌患者由来オルガノイド培養法の検討

1) 申請者らは、EGFR<sup>L858R</sup> 変異トランスジェニック肺癌モデルマウスに対しEGFRのリガンドであるTGF- $\alpha$  を過剰発現させることで、癌が腫大し、予後が増悪することを明らかにした (Tomoshige et al. *Oncogene*. 37: 3894-908. 2017)。EGFR 変異肺癌特異的オルガノイド形成を促すため、EGFR に対するリガンド添加を行い樹立率が向上するかどうかを検討した。

2) 正常上皮由来オルガノイドの増殖を抑える方法として、p53 野生型細胞 (正常および癌双方) に apoptosis を誘導できる MDM2 阻害剤: nutlin-3a 培養液に添加する方法で

癌オルガノイドを選択的に増殖させることが可能であり、我々は主にこの方法で肺癌オルガノイドを樹立してきた (Yokota et al. NPJ Precis Oncol. 5, 29. doi: 10.1038/s41698-41021-00166-41693. 2021)。しかし、当該阻害剤の使用は、およそ 4 割を占める p53 野生型肺癌からのオルガノイド樹立を困難にする欠点がある。そこで我々は Sachs らの AO medium (Sachs, N. et al. Long-term expanding human airway organoids for disease modeling. EMBO J. 38, embj.2018100300 2019) より growth factor である FGF-7、FGF-10、Rspodin-1、Noggin を除いた培地で癌選択的にオルガノイドの樹立が可能であるかどうかを検討した。

3)肺腺癌細胞株、また肺腺癌由来オルガノイド培養における conditioned medium を用いた樹立法の検討。

すでに培養が可能になっている肺腺癌より分泌される growth factor を含んだ培養液を用いて新たなオルガノイドの樹立効率が上がるかどうかを検討した。

2. 肺扁平上皮癌およびその他の組織型を持つ肺癌からのオルガノイド培養法の検討  
肺腺癌での検討と同様に growth factor を除いた条件で、癌選択にオルガノイドが樹立できるかどうかを検討した。さらにすでに長期培養が可能となっているオルガノイドの conditioned medium の使用が有効であるかどうかを調べた。

3. 樹立オルガノイドにおける核型・遺伝子型の解析および原発巣との比較

樹立オルガノイドが癌でありまた患者ゲノムの特徴を持つことを評価するため、核型解析を行うとともに、whole exome sequencingを行い検出された変異を患者癌から直接抽出したゲノムと比較した。

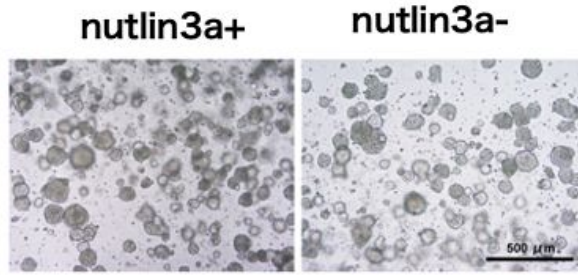
#### 4 . 研究成果

a) 術前診断により EGFR 変異が明らかになっている肺癌患者、あるいは女性、非喫煙者で画像診断から EGFR 変異を有する可能性のある肺癌患者、術後切除組織よりオルガノイドの樹立を試みた。培養液中に EGFR のリガンドである TGF- $\alpha$ を添加したもの、また使用しなかったものを比較し樹立率を比較した。結果、EGFR 変異を有すると最終的に診断された患者肺癌からの樹立効率は、当該リガンドの使用により改善は見られなかった。

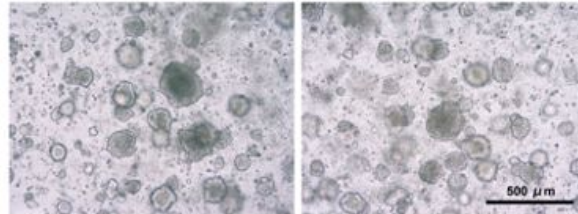
b) 肺腺癌患者また肺扁平上皮癌患者から手術により切除した癌組織からそれぞれ nutlin-3(-)、また nutlin-3(+)下でオルガノイド樹立が可能であった(図 1)。光学顕微鏡像では樹立条件で差は認められず、また動原体に対する probe を用いた Fluorescence In Situ Hybridization (FISH)法から明らかな染色体異数性が示され癌由来であることが示唆された。

図 1

肺腺癌由来  
オルガノイド



肺扁平上皮癌由来  
オルガノイド



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 Yokota Etsuko, Iwai Miki, Yukawa Takuro, Yoshida Masakazu, Naomoto Yoshio, Haisa Minoru, Monobe Yasumasa, Takigawa Nagio, Guo Minzhe, Maeda Yutaka, Fukazawa Takuya, Yamatsuji Tomoki	4. 巻 5
2. 論文標題 Clinical application of a lung cancer organoid (tumoroid) culture system	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 NPJ Precis Oncol	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1038/s41698-021-00166-3	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 深澤拓也, 横田悦子, 岩井美樹, 湯川拓郎, 羽井佐実, 瀧川奈義夫, 物部泰昌, 吉田将和, 前田豊, Minzhe Guo, 猶本良夫.
2. 発表標題 個別化医療のための切除肺癌組織由来オルガノイドの作製肺癌.
3. 学会等名 第38回 日本呼吸器外科学会学術集会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 深澤拓也, 横田悦子, 岩井美樹, 湯川拓郎, 吉田将和, 羽井佐実, 瀧川奈義夫, 猶本良夫, 前田豊, Minzhe Guo, 山辻知樹
2. 発表標題 肺癌オルガノイド培養システムの確立とその臨床応用.
3. 学会等名 第80回 日本癌学会学術総会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 横田悦子, 深澤拓也, 岩井美樹, 湯川拓郎, 吉田将和, 羽井佐実, 瀧川奈義夫, 前田豊, 山辻知樹
2. 発表標題 患者由来肺癌オルガノイドの樹立と個別化医療への応用
3. 学会等名 第61回日本肺癌学会学術集会
4. 発表年 2020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
---------	---------