

令和 6 年 5 月 26 日現在

機関番号：32612

研究種目：基盤研究(B)（一般）

研究期間：2021～2023

課題番号：21H02765

研究課題名（和文）肺癌オルガノイドライブラリーを用いた肺癌シグナル経路異常の解明

研究課題名（英文）Clarification of signal pathway dependency of lung cancer using lung cancer organoid library

研究代表者

安田 浩之（Yasuda, Hiroyuki）

慶應義塾大学・医学部（信濃町）・准教授

研究者番号：70365261

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 12,100,000円

研究成果の概要（和文）：本研究の目的は、肺癌オルガノイドライブラリーなど独自の研究基盤を用いて肺癌細胞の分子異常とシグナル経路異常の関連を明らかにするとともに、治療に直結する癌細胞特異的依存シグナル経路あるいは依存遺伝子を同定することである。研究期間内に、樹立した肺癌オルガノイドに対してニッチ依存性解析を行い、肺癌細胞が増殖のために依存するシグナル経路を複数同定した。具体的には、NKX2-1陰性肺腺癌がWnt経路に依存して増殖すること、小細胞肺癌の一部がIGFシグナル経路に依存して増殖することを明らかにした。これらの知見は、これらシグナル経路を標的とした治療法の有効性を提案するものである。

研究成果の学術的意義や社会的意義

研究期間を通して肺癌のシグナル経路依存性の多様性の理解を進めることができた。その中で、特定のシグナル経路に依存して生存あるいは増殖するサブグループを複数同定した。これら知見は、肺癌における分子異常とフェノタイプの関係性を明らかにするものである。また、近年急速な勢いで同定される癌細胞の分子異常とフェノタイプの間関係を理解するための研究モデルとして患者由来オルガノイドを用いる研究モデルとしての有効性を示している。今回得られた知見は、肺腺癌あるいは小細胞肺癌における新規治療標的を提案するものであり、今後の薬剤開発あるいは臨床応用に向けた重要な知見であると考えている。

研究成果の概要（英文）：In this study, we focused on cancer-specific signal dependency in lung cancer cells. We used a previously established patient-derived lung cancer organoid library. We performed niche dependency analysis for the established organoids, which clarified the diversity of signal dependency of lung cancer cells. Specifically, we found NKX2-1 negative lung adenocarcinoma cells are highly dependent on Wnt signals for cell proliferation. In addition, we found subgroups of small cell lung cancer are highly dependent on IGF signals for proliferation. These findings clarify the biological heterogeneity of lung cancer cells and propose preclinical rationales to target these signal alterations for lung cancer treatment.

研究分野：癌生物学

キーワード：肺癌 オルガノイド

様式 C - 19、F - 19 - 1 (共通)

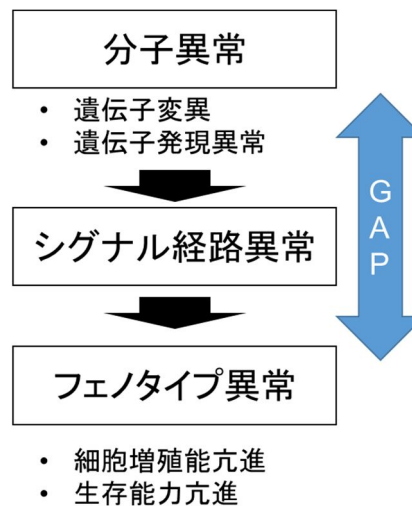
1. 研究開始当初の背景

肺癌は世界で癌死因一位の予後不良の疾患である。近年の次世代シーケンサーの登場等により、癌細胞が有する分子異常（遺伝子変異や遺伝子発現異常）を把握することは可能になってきている。しかし、ゲノム情報のみでは細胞増殖速度やシグナル経路依存性などフェノタイプに関わる生物学的特性を理解することは困難である。つまり、分子異常とフェノタイプの間には大きな乖離がある(Genotype Phenotype Gap) (右図)。

ゲノムあるいはエピゲノムの分子異常は、特定のシグナル経路を活性化あるいは不活性化しシグナル経路異常を経て癌細胞としてのフェノタイプを規定する(右図)。例えば、EGFR 遺伝子チロシンキナーゼドメインの体細胞変異は、EGFR およびその下流のシグナル経路(MAPK 経路や PI3K 経路)を活性化し、癌細胞はそれに依存して細胞増殖能や生存能力を亢進させる。

今後、癌細胞の生物学を理解し、新たな治療方法開発につなげるためには、分子異常の把握のみでは不十分であり、Genotype Phenotype Gap を埋め、癌の分子異常とシグナル経路異常の関係を明らかにする必要がある。特に、癌細胞が特異的に依存するシグナル経路あるいは遺伝子を同定することで、治療法開発に直結する知見を取得することが可能になる。癌細胞特異的なシグナル経路依存性、遺伝子依存性を明らかにするためには、「生きた癌細胞」を用いた臨床を反映する研究モデルが必須である。しかし、現在までにこれらを満たす実験モデルは限られており、肺癌の生物学的理解の大きな障壁となっていた。

申請者らは、世界最大規模の患者由来肺癌オルガノイドライブラリーを構築するとともに肺癌の分子異常の多様性を明らかにしてきた。この独自の研究基盤を活用することで、肺癌の分子異常とシグナル経路異常の関係を解明していくことが可能である。



2. 研究の目的

本研究の目的は、肺癌オルガノイドライブラリーなど独自の研究基盤を用いて肺癌細胞の分子異常とシグナル経路異常の関連を明らかにするとともに、治療に直結する癌細胞特異的依存シグナル経路あるいは依存遺伝子を同定することである。

3. 研究の方法

本研究では上記目的達成のため下記を進める。

ニッチ因子解析による肺癌細胞特異的依存シグナル経路の同定とそのメカニズム解明

従来の癌細胞株モデルでは、培養液に血清を添加して用いる。血清中には様々な増殖因子の成分が含まれるために、癌細胞がどの増殖因子シグナルに依存しているかを評価することは困難である。オルガノイド培養は無血清培地に増殖因子(ニッチ因子)を添加することで培養する。具体的には EGF, IGF, FGF, TGF, WNT, YAP シグナル等を刺激あるいは不活性化することで永続的培養を可能にしている。このニッチ因子を一つずつ添加あるいは除去し、増殖能を評価する(ニッチ因子解析)ことで肺癌細胞が依存するシグナル経路を患者毎に同定することが可能になる。KRAS, EGFR, ERBB2 などの遺伝子異常を有するラインでは EIF (EGF, IGF, FGF) などの増殖因子無しでも細胞増殖が可能であり、逆にこれらの変異がなければ増殖はできない。このように、ニッチ因子解析を行うことで遺伝子変異と細胞の増殖能フェノタイプを統合的に評価することが可能である。

CRIPR/Cas9 knockout ライブラリーを用いた肺癌細胞特異的依存遺伝子の同定

我々は肺癌細胞がどの遺伝子に依存して増殖するかを明らかにするためキナーゼ(673 遺伝子)あるいは転写因子(s 遺伝子)に対する CRISPR/Cas9 knockout ライブラリーを独自に開発した。すでに、実験系が想定通りに機能することも確認している。本研究ではこれを用いて、肺癌細胞が特異的に依存する遺伝子を明らかにする。

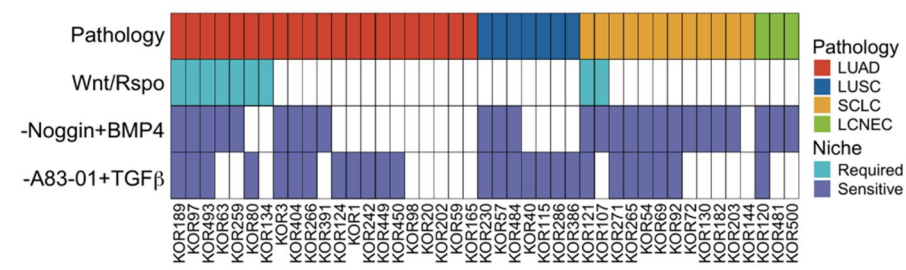
治療標的としての妥当性の検証

上記、実験で得られた肺癌細胞特異的シグナル経路異常、遺伝子依存異常が治療標的として妥当かどうかを in vitro および in vivo 実験により検証する。具体的には同定したシグナル経路あるいは遺伝子に対する阻害薬などを用いて、in vitro での細胞増殖能、アポトーシスの評価、in vivo での腫瘍形成能の評価(マウスゼノグラフト実験)などを行う。

4. 研究成果

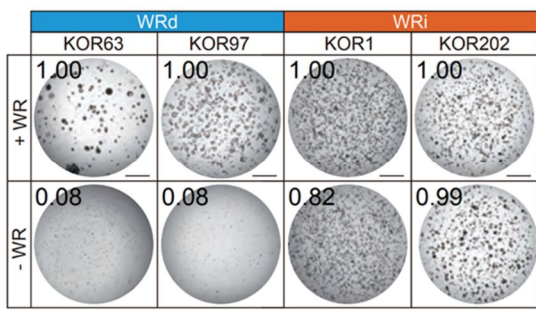
本研究期間内に、樹立した約120ラインの肺癌オルガノイドに対して、Wnt、EGF、FGF、IGF、TGF、YAP 経路等に対するシグナル依存性を評価するためのニッチ依存性解析を行った。その中で、肺癌のライン毎に多様なシグナル依存性があることを明らかにした。右図は、肺癌オルガノイドに対して行ったニッチ依存性解析の結果例である。肺腺癌(LUAD)、肺扁平上皮癌(LUSC)、小細胞肺癌(SCLC)、大細胞神経内分泌癌(LCNEC)など組織型特有のニッチ依存性を明らかにした。

肺癌オルガノイドの多様なニッチ依存性

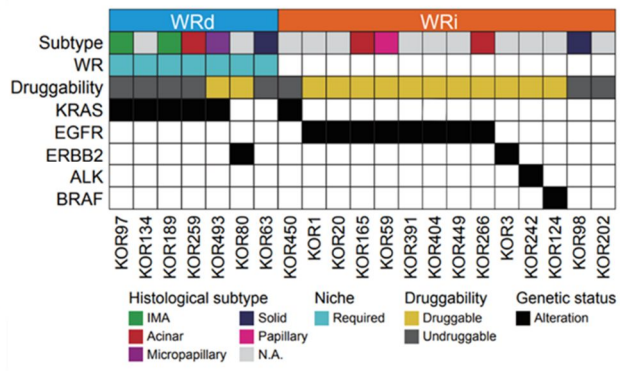


Ebisudani T, Yasuda H et al. *Cell Rep* 2023

肺腺癌オルガノイドにおけるWnt依存性・非依存性サブグループ



W: Wnt-3A, R: R-spondin



Ebisudani T, Yasuda H et al. *Cell Rep* 2023.

これらの知見は、肺癌の組織型毎に依存するシグナル経路の違いを明らかにするものであり、肺癌発生におけるシグナル経路の多様性を意味している。

特に重要な知見として、このニッチ依存性解析の中から肺腺癌の中に Wnt 経路に依存して増殖するサブグループを同定した。上図は、肺腺癌オルガノイドに対して行ったニッチ依存性解析の結果例である。図(左)に示す通り Wnt 経路のリガンドである Wnt-3A(W)および R-spondin(R)を培養液から除去することで増殖を停止するラインを複数確認した。このような Wnt 経路に依存性を示す(WRd)ラインは、肺腺癌オルガノイド全体の約3分の1を占めていた。本知見は、肺腺癌の中に Wnt 経路を標的とした治療が有効なサブグループが存在することを示している。また、肺腺癌の中で Wnt 依存性と非依存性のサブグループが存在する分子メカニズムを検証するため、さらなる研究を行った。その結果、肺腺癌における Wnt 依存性は、肺の重要な転写因子である NKX2-1(別名 TTF-1)の発現の有無によって規定されることを見出した。さらに、これら Wnt 経路を標的とした治療が TTF-1 の発現を消失した Wnt 依存性肺腺癌に有効であることを検証するために、in vitro および in vivo 実験を行った。Wnt 経路阻害薬を用いることにより、Wnt 依存性肺腺癌オルガノイドの in vitro での増殖能が低下すること、免疫不全マウスでの腫瘍形成能が低下することを確認した。

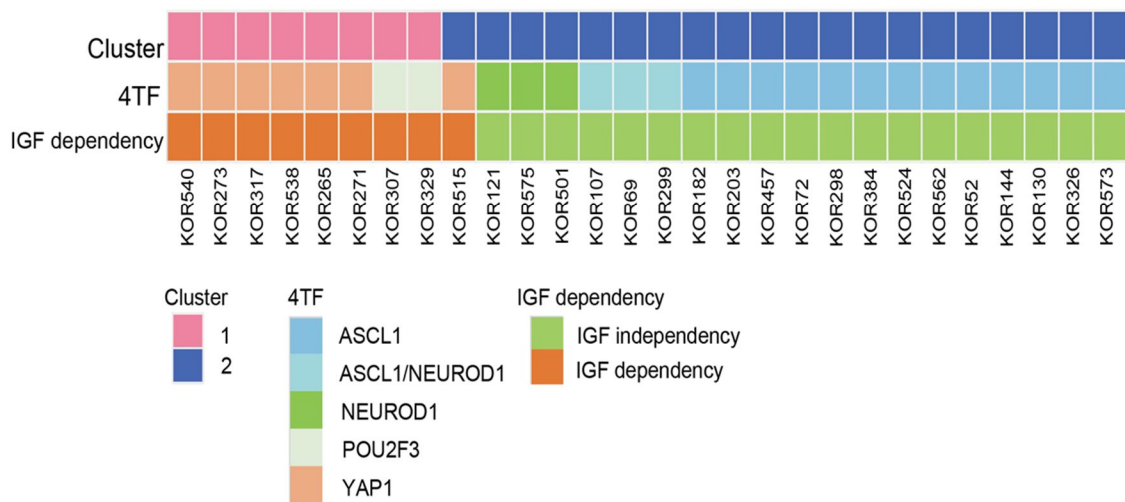
本知見は、肺腺癌のうちの約1割を占める TTF-1 陰性肺腺癌に対して Wnt 経路を標的とした治療戦略が有効である可能性を示唆するものであり、今後の新たな肺癌治療法開発につながる重要な知見であると考えている。本研究成果は、Cell Reports 誌に発表した(Ebisudani T et al. 2023)。

小細胞肺癌は、肺癌全体の約15%程度を占める疾患であり、5年生存率が10%以下の予後不良の疾患である。小細胞肺癌患者の多くが進行期で診断されるが、有効な治療薬がなく更なる疾患の生物学的理解とそこからの治療標的の同定が求められている。

我々は、既に小細胞肺癌由来のオルガノイドを数多く樹立している。研究期間内に、これら小細胞肺癌オルガノイドに対して、ニッチ依存性解析を行った。近年、小細胞肺癌は転写因子の発現パターンにより、ASCL1 タイプ、NEUROD1 タイプ、POU2F3 タイプ、YAP1 タイプの4タイプに分類されることが報告されている。詳細なニッチ依存性解析の

結果、POU2F3 タイプ、YAP1 タイプの2つのタイプの小細胞肺癌が IGF 経路に依存して増殖することを見出した。また、POU2F3 タイプ、YAP1 タイプの小細胞肺癌オルガノイドが、IGF1R 阻害薬の存在下で in vitro での細胞増殖能、in vivo での腫瘍形成能を低下させることを確認した。

小細胞肺癌オルガノイドにおける IGF 経路依存性



上図は、小細胞肺癌オルガノイドにおける IGF 経路依存性のパターンを示している。

本知見は、小細胞肺癌領域における IGF1R 経路を標的とした治療法開発の有効性を提案するものであり、肺癌医療の向上に資する重要な知見である。

以上、研究期間を通して肺癌のシグナル経路依存性の多様性の理解を進めることができた。その中で、特定のシグナル経路に依存して生存あるいは増殖するサブグループを複数同定した。ともに、今後の臨床応用に向けた重要な知見であると考えている。

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 0件）

1. 著者名 Ebisudani T, Hamamoto J, Togasaki K, Mitsuishi A, Sugihara K, Shinozaki T, Fukushima T, Kawasaki K, Seino T, Oda M, Hanyu H, Toshimitsu K, Emoto K, Hayashi Y, Asakura K, Johnson TA, Terai H, Ikemura S, Kawada I, Ishii M, Hishida T, Asamura H, Soejima K, Nakagawa H, Fujii M, Fukunaga K, Yasuda H, Sato T.	4. 巻 42(3)
2. 論文標題 Genotype-phenotype mapping of a patient-derived lung cancer organoid biobank identifies NKX2-1-defined Wnt dependency in lung adenocarcinoma	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 Cell Reports	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） 10.1016/j.celrep.2023.112212.	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	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
---------	---------