

令和 6 年 5 月 21 日現在

機関番号：12601

研究種目：基盤研究(C)（一般）

研究期間：2021～2023

課題番号：21K07957

研究課題名（和文）膵癌患者由来オルガノイドを用いたプレシジョン医療の検討

研究課題名（英文）Precision medicine using patient-derived organoid of pancreatic cancer

研究代表者

齋藤 友隆（Saito, Tomotaka）

東京大学・医学部附属病院・助教

研究者番号：10815781

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）：膵癌患者由来オルガノイドを用いた薬剤スクリーニングのプラットフォームの確立を目的とした。膵癌の針生検検体からオルガノイドを30株樹立に成功し、そのうちの20株に対して薬剤試験を行った。膵癌で用いられるゲムシタピン、5-FU、イリノテカン、オキサリプラチン、パクリタキセルの5薬剤について薬剤感受性を判定したところ、オルガノイドの種類によって感受性の違いがあることがわかった。また3株のオルガノイドについては分子標的薬のスクリーニングを施行し、同様の結果を得た。難治癌である膵癌に対する、新規治療戦略を構築するために役立つ研究と考えられる。今後、臨床応用にむけてさらなる研究が望まれる。

研究成果の学術的意義や社会的意義

膵癌は難治癌であり、効果的な治療戦略の開発が望まれる。本研究では膵癌患者より得られた検体からオルガノイドを樹立し、薬剤感受性を調べることで、治療戦略に役立つプラットフォーム作成を目的とした。オルガノイドを30株樹立に成功し、そのうちの20株に対して薬剤試験を施行可能であり、有用な結果を得た。今後、臨床応用にむけてさらなる研究が望まれる。

研究成果の概要（英文）：The aim of this study was to establish a drug screening platform using patient-derived organoids (PDOs) from pancreatic cancer. We successfully established 30 PDOs from needle biopsy specimens of pancreatic cancer patients, and drug screening was conducted on 20 of these PDOs. Sensitivity to five drugs commonly used in pancreatic cancer treatment (gemcitabine, 5-fluorouracil (5-FU), irinotecan, oxaliplatin, and paclitaxel) was determined, revealing differences in drug sensitivity depending on the type of PDO. Additionally, screening of molecular targeted drugs was performed on three PDOs, yielding similar results. This research is believed to contribute to the development of novel therapeutic strategies for the challenging cancer, pancreatic cancer. Further studies are warranted for potential clinical applications in the future.

研究分野：膵癌

キーワード：膵癌 オルガノイド 個別化医療

1. 研究開始当初の背景

膵癌は年々増加し、日本人の癌死の第4位を占めるに至り、その予後は5年生存率9%程度と依然として難治癌である。膵癌の病態の解明と予後改善につながる治療法の開発は急務である。近年、遺伝子変異に加え、遺伝子発現、代謝解析、タンパク質解析などのマルチオミクスを用いた癌の統合的な理解が急速に進んできており、膵癌においても、遺伝子変異の網羅的な解析が進んできた他に、遺伝子発現の解析に基づいて基本的には2つのサブタイプが報告された。**basal-like**型は予後不良で組織学的には低分化型膵癌と関連しており、**classical**型は予後良好で組織学的には高分化型膵癌と関連しているが、遺伝子発現や分子サブタイプに基づいた新たな治療戦略は未だなく、今後の開発が期待されている。また癌の微小環境の重要性が注目されている(Mueller and Fusenig, Nat Rev Cancer 2004)が、特に間質が非常に豊富な膵癌では、腫瘍間質相互作用の理解が不可欠で、腫瘍関連線維芽細胞のサブタイプが報告されたり、癌細胞のサブタイプと間質浸潤細胞のサブタイプの関連が報告されたりと、癌の微小環境の重要性、複雑さが再認識されている。

膵癌患者由来オルガノイドは膵癌の病態を理解するための強力なツールであり、膵癌患者から樹立されたオルガノイドバンクを用いて、遺伝子変異、遺伝子発現の解析、薬剤スクリーニングを施行し、膵癌で用いられるゲムシタピンなどの化学療法に対するオルガノイドの薬剤感受性シグナチャーが、ヒト膵癌患者の薬剤感受性と相関し、オルガノイドを用いた薬剤スクリーニングがヒト膵癌患者の薬剤選択に有用である可能性を示した(Tiriach, Miyabayashi, et al., Cancer Discov, 2018)。また、同一患者から化学療法前後に樹立されたオルガノイドの薬剤スクリーニングの比較をすると、化学療法耐性前後でオルガノイドの薬剤感受性が変化することがわかり、継時的な薬剤スクリーニングの重要性が示され、オルガノイドを用いたプレジジョン医療が期待できる結果であった。膵癌では分子標的薬の効果のバイオマーカーがないことが問題であるため、分子標的薬に対する薬剤感受性シグナチャーが効果予測につながれば臨床的なインパクトが大きい。

オルガノイド培養を用いることで、膵癌患者から得られた微量な膵癌検体から各種解析に十分な量の検体を得ることができ、移植マウスモデルを作成することも可能である。研究分担者宮林弘至は、ヒト膵癌像、分子サブタイプをよく近似する膵癌患者由来オルガノイドの膵管内移植マウスモデルを新規に開発し、これを用いて、変異型 **KRAS** のコピー数が膵癌の悪性度に重要であり、予後不良である **basal-like** 型サブタイプが誘導されることを示した (Miyabayashi et al., Cancer Discov, 2020)。また、**KRAS** 増幅により上皮間葉系移行シグナチャーが誘導され、間質の変化もきたすことを示した。**KRAS** の変異は膵癌では最も多い遺伝子変異であるが、**KRAS** 変異に対する治療は未だに困難である。そのため **KRAS** の下流のシグナルなどの発現状態に基づいた治療戦略が期待されるが、下流シグナルの **MEK** 阻害剤とゲムシタピンの併用は臨床試験で有効でなく、治療効果のメカニズムに迫るさらなる病態の解明が急務である。これまでの研究で、**KRAS** 増幅のあるヒト膵癌オルガノイドの膵管内移植マウスモデルに **MEK** 阻害剤を投与すると、下流の **ERK** リン酸化が抑制されたが、治療抵抗性で、**basal-like** 型サブタイプも抑制されなかった。**MEK** 阻害剤の感受性の予測として、野生型 **KRAS** アレルに対する変異型 **KRAS** アレルの増加や **KRAS** 依存性の性質などが他癌種で報告されているが、膵癌においては不明な点が多く、**KRAS** コピー数と **basal-like** 型や薬剤感受性、**KRAS** 依存性の性質との関連について再考し、統合的に理解することが必要である。また、癌の膵管内進展部と間質内浸潤部の化学療法感受性が異なり、膵管内進展部がより化学療法抵抗性である報告があることから、膵管内からの浸潤を解析するのに適した膵管内移植マウスモデルを利用して、**KRAS** 依存性や **MEK** 阻害剤の感受性が癌の局在と関連があるのかを検討することは癌の進展や局在の変化に伴う薬剤感受性の変化、薬剤耐性メカニズムを理解する上で重要である。さらに、マウスモデルでの環境とオルガノイド培養環境との遺伝子発現状態、薬剤感受性などのシグナチャーの違いについての理解も今後のオルガノイドによるプレジジョン医療の発展のために必要である。

2. 研究の目的

本研究の目的は、難治癌である膵癌において膵癌患者由来オルガノイドを用いた薬剤スクリーニングのプラットフォームを確立し、膵癌患者とその患者由来オルガノイドの薬剤感受性を比較し、遺伝子発現状態から分子標的薬感受性シグナチャーを検討しプレジジョン医療を提唱することである。また、化学療法中に出現した薬剤耐性癌に対する継時的な薬剤スクリーニングを可能にするため、挑戦的ではあるが **circulating tumor cell** からオルガノイドを樹立することに取り組む。さらに、分子標的薬の中で特に **MEK** 阻害剤耐性のメカニズム解析のため、移植モデルでありながら膵癌の微小環境をより模倣する膵管内移植マウスモデルを用いて、近年報告された膵癌分子サブタイプと薬剤感受性、間質相互作用の関連を解析することで、遺伝子発現状態、分子サブタイプに基づいた新たな治療戦略確立、最難治癌である膵癌の病態解明につなげることが目的である。

3. 研究の方法

膵癌患者由来オルガノイドを用いた薬剤スクリーニングのプラットフォームを確立するため、25 症例以上のオルガノイドを樹立し、薬剤スクリーニングまでを 8 週間以内に終了することを目指す。使用薬剤は抗癌剤や、将来的な分子標的薬治療につながるように、他癌腫ですでに使用されている分子標的薬や癌遺伝子パネル検査にある遺伝子異常に対応する購入可能な分子標的薬を使用し、用量反応曲線の AUC(area under the curve)から薬剤感受性を判定する。circulating tumor cell からのオルガノイド樹立については、濃度勾配を用いた方法と抗体による白血球・赤血球除去法を用い、樹立率の比較検討を行う。RNA シークエンスを用いてオルガノイドの遺伝子発現解析を行い、薬剤感受性に関わるシグナチャーを検討し、プレシジョン医療への応用を検討する。また同一患者から得られた超音波内視鏡下針生検由来、化学療法前後 circulating tumor cell 由来オルガノイドの RNA シークエンスでは、薬剤耐性に関わるシグナルや分子の検討を行う。また circulating tumor cell を安定して培養できない場合でも、オルガノイドの培養環境は上皮細胞を特異的に増幅する条件であるため、回収時に混入した癌細胞以外の細胞が除外できるため、liquid biopsy として遺伝子検査に使用できる可能性もある。一旦オルガノイド培養条件を経て癌細胞が比較的濃縮された検体から癌遺伝子パネル検査などに量、質ともに十分な DNA が得られるかについても PCR で癌由来の KRAS 変異が検出できるかなどの検討をする。

膵管内注入マウスモデルを用いた KRAS 増幅膵癌の MEK 阻害剤耐性のメカニズムの解明のため、KRAS 増幅のあるヒト膵癌オルガノイドの膵管内移植マウスモデルに MEK 阻害剤投与した組織を用いた検討を行う。これまでの研究で、KRAS 増幅による MAPK シグナル活性化にて basal-like 型が誘導され、オルガノイド培養下では発現が低い basal-like 型マーカーの TP63 と S100A2 が、マウス移植後に、特に間質浸潤部で発現が増加し、KRAS 誘導性(S100A2 陽性、TP63 陰性)と TP63 誘導性(S100A2 陽性、TP63 陽性) basal-like 型腫瘍が混在することがわかっていたが、本研究では、MEK 阻害剤耐性のメカニズムとして KRAS 誘導性と TP63 誘導性の basal-like 型腫瘍の MEK 阻害剤への感受性の違いを検討する。RNA シークエンスでは、移植マウスではヒト、マウス由来の遺伝子発現がそれぞれ癌由来、間質由来であるため、腫瘍と間質を別々に解析することが可能である。MEK 阻害剤投与による遺伝子発現の変化を解析し、治療抵抗性に関わる分子、シグナル経路を検討する。見出した薬剤耐性に関わる分子は免疫染色で評価し、同分子のノックアウトした KRAS 増幅ヒト膵癌オルガノイドを作成し、MEK 阻害剤感受性、分子サブタイプへの影響を検討する。また新規分子の阻害剤や中和抗体と MEK 阻害剤の併用における効果、分子サブタイプへの影響も検討する。本研究室で作成された恒常活性型 KrasG12D 発現と TGF-beta II 型受容体 (*Tgfbr2*) KO モデルはヒト膵癌像を模倣するモデルであり、本モデルにおける新規分子の発現を免疫染色で検討し、中和抗体と MEK 阻害剤の併用投与における効果の検討を行う。

4. 研究成果

膵癌患者由来オルガノイドを用いた薬剤スクリーニングのプラットフォームを確立するため、25 症例以上のオルガノイドを樹立を目指したが、30 株のオルガノイドの樹立に成功した。そのうちの 20 株に対して薬剤試験を行った。膵癌で用いられるゲムシタビン、5-FU、イリノテカン、オキサリプラチン、パクリタキセルの 5 薬剤について用量反応曲線の AUC(area under the curve)から薬剤感受性を判定したところ、オルガノイドの種類によって感受性の違いがあることがわかった。また 3 株のオルガノイドについては分子標的薬のスクリーニングを施行してみたところ、分子標的薬についても感受性の違いが認められた。実臨床での膵癌患者との薬剤感受性は必ずしも一致せず、間質や薬剤到達の影響などが考えられた。今後、プレシジョン医療への応用が期待される結果となった。

膵管内注入マウスモデルを用いた KRAS 増幅膵癌の MEK 阻害剤耐性のメカニズムの解明のため、ヒト膵癌オルガノイドの膵管内移植マウスモデルに MEK 阻害剤投与した組織を用いた RNA シークエンスでは、治療抵抗性に関わる分子、シグナル経路を検討しており、見出した薬剤耐性に関わる分子は免疫染色で評価中であり、同分子のノックアウトした KRAS 増幅ヒト膵癌オルガノイドを作成し、MEK 阻害剤感受性、分子サブタイプへの影響を検討している。また、KRASG12D 変異を有するマウス膵癌細胞にさらに KRASG12D 強制発現した株を同所移植すると、膵癌患者由来オルガノイドでの検討と同様に、コントロールと比較して腫瘍が増大し、KRAS 負荷が腫瘍増殖に影響があることを見出した。KRAS 強制発現により、KRAS 依存性が失われることを見出しており、MEK 阻害剤の耐性メカニズムとなる可能性が示唆された。これらの結果は、難治癌である膵癌に対する、新規治療戦略を構築するために役立つ研究と考えられる。今後、臨床応用にむけてさらなる研究が望まれる。

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 1件/うちオープンアクセス 1件）

1. 著者名 Hye-Been Yoo, Jin Woo Moon, Hwa-Ryeon Kim, Hee Seung Lee, Koji Miyabayashi, Chan Hee Park, Sabrina Ge, Amy Zhang, Yoo Keung Tae, Yujin Sub, Hyun-Woo Park, Heon Yung Gee, Faiyaz Notta, David A Tuveson, Seungmin Bang, Mi-Young Kim, Jae-Seok Roe	4. 巻 165
2. 論文標題 A TEAD2-Driven Endothelial-Like Program Shapes Basal-Like Differentiation and Metastasis of Pancreatic Cancer	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 Gastroenterology	6. 最初と最後の頁 133-148
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1053/j.gastro.2023.02.049.	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 該当する

〔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	宮林 弘至 (Miyabayashi Koji) (50634961)	東京大学・医学部附属病院・助教 (12601)	
研究分担者	伊地知 秀明 (Ijichi Hideaki) (70463841)	東京大学・医学部附属病院・講師 (12601)	

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