

令和 6 年 6 月 18 日現在

機関番号：15301

研究種目：基盤研究(C)（一般）

研究期間：2021～2023

課題番号：21K07962

研究課題名（和文）正常・腫瘍オルガノイドモデルを活用した胆道癌の高精度早期診断法の開発

研究課題名（英文）Development of high-precision early diagnosis methods for cholangiocarcinoma using normal and tumor organoid models.

研究代表者

加藤 博也（Kato, Hironari）

岡山大学・大学病院・准教授

研究者番号：60619039

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）：新規のマウス由来胆嚢オルガノイドモデルを用いた解析によって、正常胆嚢のオルガノイドに比べて胆嚢癌オルガノイドで低発現であるマイクロRNA（microRNA）として、miR-34a-5pを同定し、ヒト胆嚢癌組織においても同様に低発現であることを確認した。ヒト胆嚢癌細胞株および胆嚢癌ゼノグラフトモデルを用いた実験により、miR-34a-5pの過剰発現は細胞周期停止による抗腫瘍効果を示すことを明らかとなった。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究では、胆嚢オルガノイドを用いた新規胆嚢癌モデルを活用し、胆嚢癌の増殖に強く関与することが示唆されるmiR-34a-5pを新たな治療標的として同定した。さらに、miR-34a-5pの局所投与による腫瘍制御の獲得から、局所治療としての臨床応用への展開も期待される。予後不良な胆嚢癌に対する核酸医薬治療は、標準的な化学療法や免疫療法に加わる可能性を有しており、本研究は胆嚢癌治療の進歩に貢献するものと考えられる。またオルガノイドモデルによる新規診断バイオマーカー探索への応用も期待される。

研究成果の概要（英文）：Advanced gallbladder cancer is a disease with a poor prognosis, and the lack of effective treatments remains a significant challenge. Through analysis using a novel mouse-derived gallbladder organoid model, we identified miR-34a-5p as a microRNA that is low-expressed in gallbladder cancer organoids compared to normal gallbladder organoids, and confirmed its low expression in human gallbladder cancer tissues as well. Experiments using human gallbladder cancer cell lines and gallbladder cancer xenograft models demonstrated that the overexpression of miR-34a-5p exhibits antitumor effects through cell cycle arrest.

研究分野：消化器病学

キーワード：胆道癌 オルガノイド microRNA 治療標的 miR-34a-5p 診断マーカー

科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属します。

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

肝門部領域胆管癌・遠位胆管癌・胆嚢癌などの胆道癌は、日本人の罹患率が高く、本邦の癌死亡数6位(2016年)の予後不良な疾患である。切除困難で化学療法を行った場合の1年生存率は50%程度であり、また根治術である外科的切除を施行できた場合でも5年生存率50%に過ぎないため(2008-1013年:全国胆道癌登録調査報告)早期診断法や新規治療法の開発といった、胆道癌領域における診療の革新的な進歩が急務である。

そこで、生体内に近い環境を再現でき、正常細胞の長期培養が可能な特長を有するマトリゲルベースのオルガノイド培養(Sato T, et al. Nature 2009)に注目し、正常オルガノイドとそれに遺伝子導入して作成した腫瘍オルガノイドのプロファイルを明らかにすることで、臨床応用に直結する高精度な腫瘍マーカーが同定されると仮説を立て、本申請研究を計画した。

2. 研究の目的

胆道(胆管・胆嚢)由来の正常および腫瘍オルガノイド、およびそれらが分泌する細胞外小胞(EVs)に含まれるmicroRNAやタンパク質のプロファイルを網羅的解析により明らかにし、両者の発現比較により腫瘍マーカー候補を抽出し、さらに臨床検体(血液や胆汁)で検証することにより、高精度な胆道癌診断マーカーや治療標的を同定し検証することである。

3. 研究の方法

(1) 正常、腫瘍オルガノイド培養とEVsの抽出

マウス由来の胆管・胆嚢正常(N)上皮から作成したオルガノイドと、これにKras変異/TP53欠失またはKras変異/PTEN欠失の遺伝子導入後に、ヌードマウスでの皮下腫瘍形成(=腫瘍原性あり)を確認したのから作成した2種の腫瘍(T)オルガノイドを使用。

1) 培養上清を回収し、サイズ排除クロマトグラフィー法(SEC)によりEVsを抽出。

2) 抽出したEVsの質的、量的評価を行い、正常由来EVs(N-EVs)と腫瘍由来EVs(T-EVs)の十分な回収を確認する。

(2) microRNA解析による胆道癌診断マーカーや治療標的候補の同定

A: 正常、腫瘍オルガノイド由来EVsを用いた胆道癌診断マーカー同定

高感度マイクロアレイによるmicroRNAの網羅的発現解析-3D-Gene(東レ)-を行い、N-EVsとT-EVsの比較により、T-EVsで有意に上昇または下降するmicroRNAを癌診断候補マーカーとして抽出。RT-qPCRによる候補マーカーの検証と絞り込みを行う。さらに、臨床検体を用いた胆道癌診断マーカーとしての検証のために、病理組織学的に証明された胆道疾患症例の保存胆汁と血清を使用し、RT-qPCRによる胆道癌候補マーカーの定量的検証を行う。

B: 正常、腫瘍オルガノイドを用いた胆道癌診断マーカーや治療標的の同定

上記同様に、高感度マイクロアレイによるmicroRNAの網羅的発現解析を行い、NとTの両プロファイルの比較により、Tで有意に上昇または下降するmicroRNAを癌診断マーカーや治療標的の候補として抽出。RT-qPCRによる候補マーカーの検証と絞り込みを行う。さらに、臨床検体を用いた胆道癌診断マーカーとしての検証のために、病理組織学的に証明された胆道疾患症例の保存胆汁と血清を使用し、RT-qPCRによる胆道癌候補マーカーの定量的検証を行う。また治療標的としての検証のために、胆道癌細胞株を用いて特定のmicroRNAの機能的な影響を評価する。

(3) プロテオーム解析による胆道癌診断マーカーや治療標的候補の同定

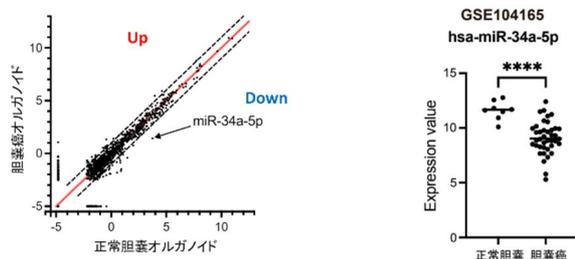
上記と同様のストラテジーにて候補の抽出、検証を行う。さらに免疫組織染色による外科切除組織中での発現量評価や、臨床データ(Stageや予後など)との関連を明らかにする。

4. 研究成果

主に正常、腫瘍オルガノイドのmicroRNA発現解析の比較と、それに基づく治療標的としての検討結果について示す(Oda T, Tsustumi K, Kato H, et al. Mol Ther Oncol 32: 2024)。

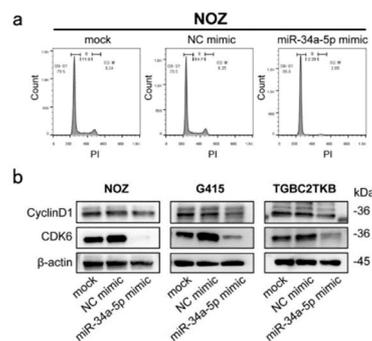
1) まずマウス由来の正常胆嚢(N)および胆嚢腫瘍オルガノイド(T: Kras変異/TP53欠失)のmiRNAマイクロアレイ解析を行い、プロファイリングを比較した。胆嚢癌オルガノイドでは正常胆嚢オルガノイドに比べて、144種類のmiRNAの発現レベルが高く($\log_2\text{FoldChange}[\text{FC}] > 1$)、91種類のmiRNAの発現レベルが低かった($\log_2\text{FC} < -1$)。シグナル強度25以上のmiRNAに絞り込むと、TオルガノイドではNオルガノイドと比べて、既知の癌促進性miRNAであるmiR-21a-5pを始めとする18種類のmiRNA発現レベルが高かった一方、19種類のmiRNA発現レベルが低下していた。これら19種類のmiRNAのうち、癌抑制性miRNAとして報告されているmiR-34a-5p、miR-181a-5p、miR-378a-3p、miR-205-5pを胆嚢癌に対する治療標的候補として抽出した。

さらに、これら 4 つの miRNA に関して NCBI GEO データセットの GSE104165 を用いて、ヒトでの胆嚢癌組織での発現を評価したところ、特に miR-34a-5p が著明に発現低下していることが分かった ($p < 0.0001$)。

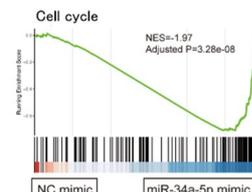


2) miR-34a-5p はさまざまな癌種において、アポトーシス阻害、EMT、がん幹細胞などに関連する多数の標的遺伝子の発現を抑制することが報告されている。

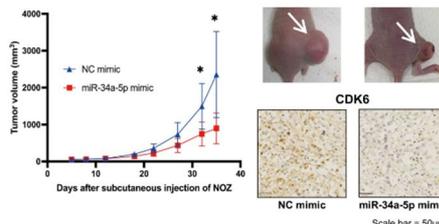
まず MTT アッセイを用いて、ヒト胆嚢癌細胞株に対する miR-34a-5p の細胞増殖への影響を検討した。その結果、3 種類の胆嚢癌細胞株 NOZ、G415、TGBC2TKB において、miR-34a-5p の強制発現により、細胞増殖が有意に抑制されていた。細胞周期アッセイでは、miR-34a-5p mimic の投与によって G0-G1 期の細胞が増えており、G1 期の細胞周期停止が細胞増殖抑制を生じた一因であることが示唆された。また胆嚢癌細胞株に miR-34a-5p mimic を導入すると、miR-34a-5p の標的である CyclinD1 や CDK6 などの細胞周期を担う遺伝子のタンパク発現が低下していた。またレポーターアッセイでは miR-34a-5p による CDK6 の直接的な制御が確認された。



3) 続いて、miR-34a-5p の強制発現による胆嚢癌細胞への影響を RNA-seq を用いて検討した。miR-34a-5p mimic をトランスフェクションした胆嚢癌細胞株とコントロールでのエンリッチメント解析にて、細胞周期に関わる遺伝子群が有意に制御されていた。



4) マウスの皮下腫瘍モデルを用いて抗腫瘍効果を検証した。胆嚢癌細胞株 NOZ をヌードマウスの皮下に局注し、腫瘍形成を確認した後、miR-34a-5p の局所投与を行った。その結果、miR-34a-5p mimic 投与によって、腫瘍増殖が有意に抑制された ($p < 0.05$)。また摘出した皮下腫瘍の CDK6 免疫染色では、CDK6 の発現が有意に低下していた。



以上、正常胆嚢と Kras 活性化と Trp53 変異を有する胆嚢癌オルガノイドモデルの microRNA プロファイルの比較から、胆嚢癌で低発現であった miR-34a-5p を抽出し、in vitro、in vivo の実験にて、その強制発現により細胞周期停止による抗腫瘍効果を示すことが確認された。

既報では、進行固形がん患者を対象として liposomal miR-34a mimic である MRX34 を静脈内投与した第 1 相試験の結果が 2020 年に報告されている (Br J Cancer 122 : 1630-37, 2020)。29% の患者に部分奏効が得られた一方で、重篤なサイトカイン放出症候群を生じたため、試験は早期に終了となっている。今回の結果から、胆嚢癌に対する miR-34a-5p の局所投与による抗腫瘍効果と副作用軽減が得られる可能性があり、今後さらに安全で効率よく腫瘍に届けられるデリバリーシステムの構築が必要であると考えている。

また我々は以前、胆嚢癌患者の血液中の EVs を用いた網羅的解析から治療標的として miR-451a を同定した (Ueta E, Tsutsumi K, Kato H, et al. Sci Rep 2021)。胆道癌細胞株だけでなく、Gemcitabine 抵抗性の細胞株への miR-451a の強制発現によって、細胞増殖抑制に加えアポトーシス誘導や EMT 抑制を認めた。さらに miR-451a がマクロファージ遊走阻害因子 (MIF) を阻害し、PI3K/Akt シグナル制御することが関与していることを明らかにした。3D スフェロイドや上記で使用した胆嚢癌オルガノイドモデルでも抗腫瘍効果が確認され、miR-451a 補充療法が GEM 抵抗性胆道癌への新たな治療戦略になることが示唆された (Obata T, Tsutsumi K, Kato H, et al. Mol Ther Nucleic Acids. 2023;34:102054.)。

以上から、胆道オルガノイドモデルは新しい診断や治療標的の同定やその検証に利用可能であることが示唆され、さらに診断マーカーについても検討を行っているところである。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計2件（うち査読付論文 2件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 2件）

1. 著者名 Oda Takashi, Tsutsumi Koichiro, Obata Taisuke, Ueta Eijiro, Kikuchi Tatsuya, Ako Soichiro, Fujii Yuki, Yamazaki Tatsuhiro, Uchida Daisuke, Matsumoto Kazuyuki, Horiguchi Shigeru, Kato Hironari, Okada Hiroyuki, Chijimatsu Ryota, Otsuka Motoyuki	4. 巻 32
2. 論文標題 MicroRNA-34a-5p: A pivotal therapeutic target in gallbladder cancer	5. 発行年 2024年
3. 雑誌名 Molecular Therapy: Oncology	6. 最初と最後の頁 200765 ~ 200765
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.omton.2024.200765	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 -

1. 著者名 Obata Taisuke, Tsutsumi Koichiro, Ueta Eijiro, Oda Takashi, Kikuchi Tatsuya, Ako Soichiro, Fujii Yuki, Yamazaki Tatsuhiro, Uchida Daisuke, Matsumoto Kazuyuki, Horiguchi Shigeru, Kato Hironari, Okada Hiroyuki, Otsuka Motoyuki	4. 巻 34
2. 論文標題 MicroRNA-451a inhibits gemcitabine-refractory biliary tract cancer progression by suppressing the MIF-mediated PI3K/AKT pathway	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 Molecular Therapy - Nucleic Acids	6. 最初と最後の頁 102054 ~ 102054
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.omtn.2023.102054	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1件（うち招待講演 0件/うち国際学会 0件）

1. 発表者名 織田崇志、堤康一郎、加藤博也
2. 発表標題 胆嚢オルガノイドを用いた発癌モデルより同定したmiR-34a-5p補充による胆嚢癌治療の開発
3. 学会等名 第109回日本消化器病学会総会
4. 発表年 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 分 担 者	堤 康一郎 (Tsutsumi Koichiro) (40610910)	岡山大学・大学病院・助教 (15301)	

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