

令和 6 年 5 月 29 日現在

機関番号：13301

研究種目：基盤研究(C)（一般）

研究期間：2021～2023

課題番号：21K08201

研究課題名（和文）肺腺がんオルガノイドによる薬物耐性克服の研究

研究課題名（英文）Lung adenocarcinoma organoids to overcome drug resistance

研究代表者

北 賢二（Kita, Kenji）

金沢大学・がん進展制御研究所・特任助手

研究者番号：80625252

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）：PDXモデルからオルガノイドを2例樹立した。さらに手術検体から、肺腺がん2例、粘液性腺がん1例オルガノイド樹立に成功した。PDXモデルから樹立したオシメルチニブ耐性オルガノイドにおいて薬剤感受性試験を行ったところ、アファチニブ、HDAC阻害薬のQuisinostatが著効した。オシメルチニブ耐性オルガノイドDNAからホールゲノムシーケンスを行った。その結果70-80%がマウス由来であった。PDXモデルからオルガノイドを樹立する際は、マウス細胞混入には相当な注意が必要である事が分かった。

研究成果の学術的意義や社会的意義

オルガノイドは3次元であるため、2次元培養の細胞株に対して、より組織を反映しているという特色がある。しかし、肺がんに至ってはオルガノイド培養に関する報告が少なく、まだ開発段階である。以上の背景により、肺がんオルガノイドを樹立し、培養法を確立することは、薬剤耐性メカニズムの評価に有用と考えられ、肺がんオルガノイドを樹立することによる有効な新規治療法の開発は学術的意義、社会的意義があると思われる。

研究成果の概要（英文）：Two organoids were established from the PDX model, and two lung adenocarcinomas and one mucinous adenocarcinoma were successfully established from surgical specimens. Drug sensitivity testing of osimertinib resistant organoids established from the PDX model showed that afatinib and the HDAC inhibitor, quisinostat, were highly effective. Whole genome sequencing was performed on osimertinib resistant organoid DNA. The results showed that 70-80% of the DNA was derived from mice, indicating that considerable caution should be exercised when establishing organoids from PDX models due to the presence of mouse cells.

研究分野：呼吸器内科

キーワード：肺がん オルガノイド オシメルチニブ 薬剤耐性

## 1. 研究開始当初の背景

日本人におけるがんによる死亡者数は肺がんが最も多くなっており、8万人に達しようとしている。肺がんの5年生存率は、ステージⅠでは75.4%であるが、ステージⅣに至っては6.7%となっている(2014-2015年5年生存率 がん診療連携拠点病院等院内がん登録生存率集計)。ステージⅣで見つかることも少なくなく、様々な治療薬が開発されてきているものの依然予後が悪く、有効な治療法開発が急務となっている。

EGFR (Epidermal Growth Factor Receptor) 変異は、肺がんでも最も頻度の高い遺伝子異常である。日本人肺がんの25~30%程度に検出され、exon 19の欠失、exon 21 L858R等が知られている。これらの変異があると、EGFRが恒常的に活性化され、がん化に至る。EGFR変異の約90%でこれら2つのEGFR変異が検出されるが、これらの変異があると、EGFR阻害薬(EGFR-Tyrosine Kinase Inhibitor)が著効する。現在EGFR-TKIは、第1世代のGefitinib、Erlotinib、第2世代のAfinib、第3世代のOsimertinib、Dacomitinibが国内で承認販売されている。また、第1、2世代のEGFR-TKIで耐性となった症例では、EGFR T790M変異が、50~60%で検出され、このT790M変異が耐性の原因となっている。一方、第3世代のEGFR-TKIではT790M変異肺がんに対しても奏功する。しかし、これら第3世代EGFR-TKIに対しても一旦は奏効しても、約1年で耐性を来し、新規の薬剤、または治療法が囑望されている。

オルガノイドとは、ヒトあるいはマウスの臓器から得た細胞が3次元構造を取りながら成長する臓器を模した細胞塊のことである。腸管上皮細胞では、LGR5 (leucine-rich repeat-containing G-protein-coupled receptor 5) というWntシグナルターゲット遺伝子発現細胞が幹細胞であるということの証明がなされている(Barker N, et al, Nature, Identification of stem cells in small intestine and colon by marker gene Lgr5, 2007)。オルガノイドは、LGR5発現細胞の幹細胞性維持に必須の成長因子を添加することで永続的に培養可能となる。また、3次元であるため、2次元培養の細胞株に対して、より組織を反映しているという特色がある。腸上皮幹細胞をはじめ、現在まで様々な臓器、腫瘍でオルガノイド培養法が確立されている(Sato T, et al, Nature, Long-term expansion of epithelial organoids from human colon, adenoma, adenocarcinoma, and Barrett's epithelium, 2011)。しかし、肺がんに至ってはオルガノイド培養に関する報告が少なく、まだ開発段階である。

以上の背景により、**肺がんオルガノイドを樹立し、培養法を確立することは、薬剤耐性メカニズムの評価に有用と考えられ、肺がんオルガノイドを樹立することによる有効な新規治療法の開発に向け、本研究を立案した。**

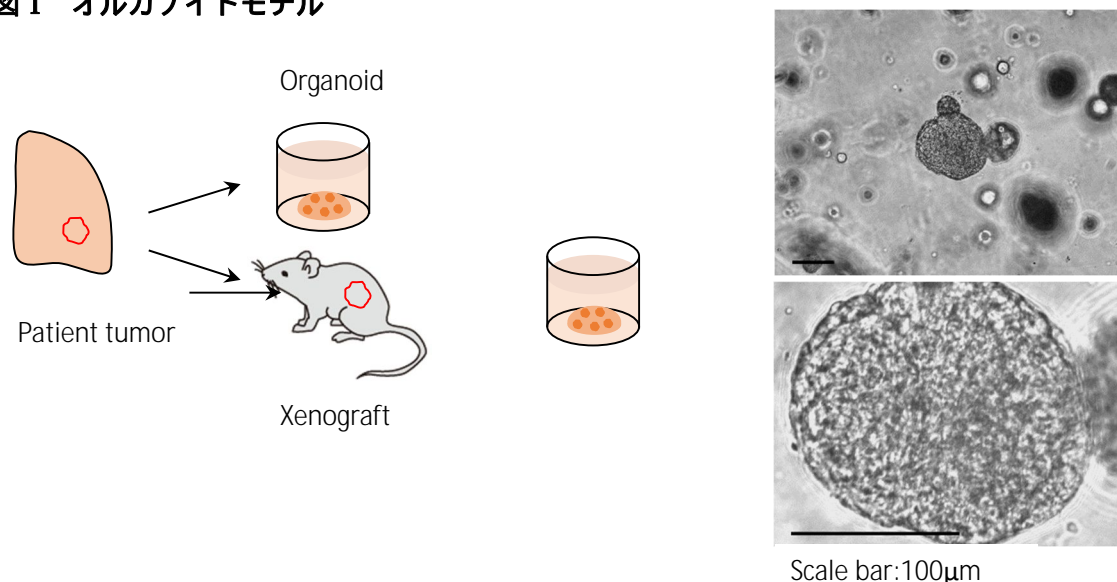
## 2. 研究の目的

細胞株における研究では細胞均一性により、実臨床を必ずしも反映しているとはいえない。しかし、本研究では**肺がんオルガノイドモデル**を使用することにより、腫瘍不均一性を忠実に再現できることに特色がある。従って、**肺がんオルガノイドモデル**は、肺がん患者では倫理上実施することができない治療実験を施行できることに特色がある。本研究では**肺がんオルガノイドを樹立し、薬剤感受性、薬剤耐性メカニズムを解明することより、新規治療法の確立を目的としている。**

実臨床に近い研究としてはPDXモデルがあり、非常に有用であるが、研究継続するには時間、労力、資金が必要となり、研究可能な施設は限られてくる。しかし、オルガノイドを利用することで、これらの問題を解決でき、実臨床に近い状態で、迅速に薬剤スクリーニング

グ等の研究を推進可能となってくる。また、細胞培養であるため、特別な動物施設等の必要もなく、培養液、添加剤、インキュベーター等の比較的軽微な機器のみで維持可能である。さらに、細胞を凍結保存できるため、必要な時に必要なだけ使用できるという利点がある。

図1 オルガノイドモデル



### 3. 研究の方法

#### (1) オルガノイド樹立

PDX モデル、および新たに肺がん症例でオルガノイド樹立を試みた。PDX モデルからはオルガノイドを 2 例樹立した。また、PDX モデルを経ず手術検体からオルガノイド樹立を試みた症例では、肺腺がんと診断された 2 例及び、粘液性腺がん 1 例においてオルガノイド樹立に成功した。樹立できたオルガノイドは 3 か月以上継続し継代可能であり、また凍結保存再融解も行い、細胞増殖に問題ないことを確認した。PDX モデルから樹立したオルガノイドは 2 例成功し、それぞれ EGFR exon 19 deletion、EGFR L858R 変異を持つ症例であった。この内 L858R 変異症例は、PDX モデルにおけるオシメルチニブ治療で耐性を獲得したのから得られた。また PDX モデルを経ずに樹立したオルガノイドでは、肺腺がん症例の内一例は EGFR L858R+T790M 変異を持つ症例で、もう一例は EGFR exon 19 deletion 変異を持つ症例であった。粘液性腺がんの症例は EGFR、ALK、KRAS、BRAF すべて陰性であった。

#### (2) オシメルチニブ耐性オルガノイド

樹立した EGFR exon 19 deletion 変異を持つオルガノイドに、オシメルチニブを漸増することで耐性化を試みた。0.01 µM の濃度から始め、かなり時間を要するが、少しずつ濃度を上げることができた。しかし、オシメルチニブ低濃度では増殖したが、0.3 µM では定常状態となり、全く増えなくなった。この間約半年を要したが、このオルガノイドでは耐性化できなかった。また、PDX モデルから得られたオルガノイドでも耐性化を試みたが、やはり 0.3 µM 程度で増えなくなった。PDX モデルを経る経ないに関わらず、オシメルチニブが著効するため、オシメルチニブ耐性オルガノイド樹立には至らなかった。

#### (3) 薬剤感受性

樹立したオルガノイドからのオシメルチニブ耐性化は出来なかったため、PDX モデルから得られたオシメルチニブ耐性オルガノイドを用い、薬剤感受性試験を行った。オシメルチ

ニブ耐性オルガノイドにオシメルチニブ、アファチニブ、AXL 阻害剤の NPS-1034、MET 及び ALK 阻害剤のクリゾチニブそれぞれ 1  $\mu$ M を添加し MTT アッセイを行った。この結果からアファチニブが最も感受性が高く、オシメルチニブと他の薬剤の併用を上回ったことがわかった。また、HDAC 阻害剤である Quisinostat( 0.03 $\mu$ M )とオシメルチニブ(1 $\mu$ M)の MTT アッセイを行った。その結果 Quisinostat 単独で著効した。

#### (4) オルガノイドのマウスへの移植

オシメルチニブ耐性オルガノイドをヘアレス SCID (SHO) マウスに移植したところ、生着しなかった。次に  $1 \times 10^6$  個と細胞数を増やし移植したが生着しなかった。さらに NSG マウス皮下にも移植したが同様に生着しなかった。

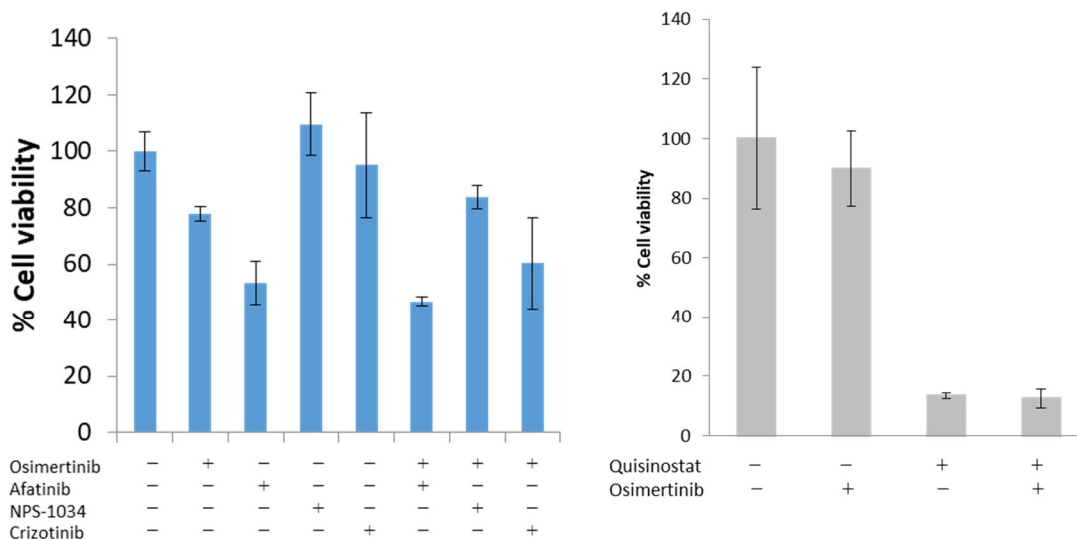
#### (5) ホールゲノムシーケンス

耐性化の原因となる遺伝子変異を検出するため、抽出したオシメルチニブ耐性オルガノイド DNA からホールゲノムシーケンスを行った。その解析から 70~80%がマウス DNA 由来であるという結果となった。このオルガノイドは手術検体ではなく PDX から樹立したものであるため、マウス細胞混入は避けられないが、腫瘍優位になると想定していた。PDX モデルの継代時には HE 染色を見る限り、ヒト肺腺がんと思われるため、オルガノイド培養時にマウス細胞優位になったと考えられる。

### 4. 研究成果

(1) PDX モデルからオルガノイドを 1 例樹立した。また、もう 1 例は樹立できたが 70~80% マウス由来であった。さらに手術検体から、肺腺がん 2 例、粘液性腺がん 1 例オルガノイド樹立に成功した。

(2) オシメルチニブ耐性オルガノイドにおいて薬剤感受性試験を行ったところアファチニブ、HDAC 阻害薬の Quisinostat が著効した。



(3) PDX モデルからオシメルチニブ耐性オルガノイドを樹立した。そのオルガノイド DNA からホールゲノムシーケンスを行った。しかし、70~80%がマウス由来であった。

以上の結果から薬剤耐性メカニズムを解明するには至らなかったが、**肺がんオルガノイドモデル**を確立でき、薬剤の治療効果判定に応用することが達成できた。今後はさらなるオルガノイドの樹立、また、薬剤耐性の原因を特定するために検討を進めていきたい。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔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
---------	---------