

令和 6 年 6 月 2 日現在

機関番号：11301

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2021～2023

課題番号：21K08679

研究課題名(和文)オルガノイド培養を応用した大腸癌に対する次世代個別化医療の実現に向けて

研究課題名(英文) Organoid Culture for Next Generation Personalized Medicine against Colorectal Cancer

研究代表者

唐澤 秀明 (Karasawa, Hideaki)

東北大学・大学病院・助教

研究者番号：30547401

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)：大腸癌においてMAPK経路は重要である。MAPK経路の下流にあるERKを阻害するERK阻害薬(SCH772984)は、BRAFやKRAS変異のある癌細胞株に有効であるが、ヒトにおける有効性は証明されていない。そこでMAPK経路の遺伝子変異がオルガノイドによるSCH772984の感受性を規定するかを検証した。13検体より培養したオルガノイドに対して感受性試験を行ったところ、BRAFまたはKRAS変異症例の6/7例が感受性を示し、BRAF・KRAS野生型の5/6例は耐性であった。オルガノイドによる感受性試験は遺伝子変異に基づく治療戦略の限界を補填し、個別化医療へ貢献できる可能性を秘めている。

研究成果の学術的意義や社会的意義

NGSによって包括的に遺伝子変異を把握する個別化医療は、近年急速に発達してきているが、遺伝子変異のみによるアプローチは予測にとどまり、NGSを用いた薬剤選択とオルガノイドにおける薬剤反応は必ずしも一致しないことが分かった。オルガノイド培養を用いた感受性試験はNGSの弱点を補い、より精度の高い個別化医療を実現するために有用な手法となる可能性があると考えられた。

研究成果の概要(英文)：MAPK pathway plays an important role in the colorectal cancer (CRC), being supposed to be activated by the gene mutations. Although the inhibitors of ERK have demonstrated efficacy in the cells with the BRAF or KRAS mutations, a clinical response is not always associated with the molecular signature. The patient-derived organoids (PDO) have emerged as a powerful tool to study cancer. The present study aims to analyze the association between the molecular characteristics and sensitivity to the ERK inhibitor (SCH772984) in PDO. In the drug sensitivity test for PDO, 6 out of 7 cases with either BRAF or KRAS mutations showed sensitivity to the SCH772984, while 5 out of 6 cases of both BRAF and KRAS wild-types were resistant. The results of this study suggested that the molecular status of the clinical specimens are likely to represent the sensitivity in the PDOs. PDO might be able to complement the limitations of the gene panel and have the potential to provide a novel precision medicine.

研究分野：大腸癌

キーワード：オルガノイド 大腸癌 MAPK ERK阻害薬

1. 研究開始当初の背景

従来、癌化学療法は細胞障害性薬剤がその中心であり、多くの臨床試験を経て発展してきた。2000年代に入り、分子標的薬の開発、遺伝子変異に基づくコンパニオン診断の確立、次世代シーケンサー (Next Generation Sequencing : NGS) の登場により、現在は遺伝子パネル検査が標準治療無効例に保険診療として承認されるに至った。遺伝子パネル検査は癌に関わる遺伝子変異を一括して把握することができ、個々の患者に適した化学療法を抽出できる可能性がある。また、ホルマリン固定標本・血液検体から実施可能であるため、検体へのアクセスが簡便であるという利点も備えている。固形がんに対する NGS を利用した個別化医療の効果を評価した報告では、NGS で抽出された治療を受けた患者では奏効率が 33%、病勢コントロール率が 78%であったのに対し、標準治療を受けた患者では奏効率が 6%、病勢コントロール率が 56%に留まっていた。しかし、NGS による遺伝子パネル検査は時間やコストがかかることが欠点であることに加え、臨床的意義が不明な遺伝子変異のみが同定されることが多く、効果が期待される薬剤が見つかり、さらに実際に投与に至る症例は 11%ほどしかないとも報告されている。またコンパニオン診断はバイオマーカーとされる限られた遺伝子変異の有無により行われるが、他の遺伝子変異により薬剤感受性が左右される可能性を加味していない。抗 EGFR 抗体を例にとると、当初は KRAS 遺伝子変異の有無のみで投与可否が判断され、現在では無効と考えられる BRAF 遺伝子変異症例にも投与が行われていた事実があり、最近では新たな感受性規定遺伝子変異も報告されている事からも、適正症例の抽出にも改善の余地があると言える。このように、遺伝子変異による感受性予測のみでは限界があり、更なる進歩が望まれる。

癌細胞株を用いた薬剤感受性試験は、その簡便性・再現性の高さから広く利用されてきた。しかし、2次元培養は生体内とは異なり、細胞内のシグナル伝達経路が変化してしまっているため、薬剤への反応が不正確であると言われている。近年、生体内の組織を再現する新しい *in vitro* 培養技術としてオルガノイド培養が確立されてきている。オルガノイドは正常組織に加えて癌からも培養可能であり、正常組織や腫瘍の特性を再現することができると言われている。さらに、抗癌剤感受性試験も実施可能であり、2018年には、オルガノイドによる薬剤感受性試験は 100%の感度、93%の特異度で臨床経過と相関すると報告された。

マイトジェン活性化プロテインキナーゼ (mitogen-activated protein kinase : MAPK) 経路は、細胞の増殖、分化、遊走などに関与する重要なシグナル伝達経路である。大腸癌では、RAS や BRAF 変異がそれぞれ 36%、10%の症例で認められ、癌の発生、進行に関与している。MAPK 経路に関連した薬剤としては、抗 EGFR 抗体が RAS、BRAF 野生型大腸癌に有効性を示しており、広く使用されている。BRAF 変異のある悪性黒色腫に対しては BRAF 阻害薬と MEK 阻害薬の併用療法が承認されており、近年 BRAF 変異大腸癌においても、BRAF 阻害薬、MEK 阻害薬、抗 EGFR 抗体の併用療法の有効性が報告された。しかし、BRAF や MEK 阻害薬は MAPK 経路の再活性化により薬剤耐性を獲得することがあることが知られている。細胞外シグナル制御キナーゼ (Extracellular signal-Regulated Kinase : ERK) は、MAPK 経路の最も下流に位置し、ERK 阻害薬は MAPK 阻害薬への耐性を克服する上でも期待されており、現在様々な臨床試験が進行中である。ERK 阻害薬 (SCH772984) は BRAF 変異のある癌細胞株の 88%に有効であり、KRAS 変異のある癌細胞株に対しては 49%に有効であると報告されるが、オルガノイドやヒトでの ERK 阻害薬の感受性規定因子は明確でなく、遺伝子変異のみに基づく予測と、ERK 阻害薬の臨床効果と間に矛盾が生じている可能性がある。これはどの癌化経路に対する阻害薬に対しても同様であり、遺伝子変異のみに基づいて感受性を推定する遺伝子パネル検査の限界とも言える。そのため、今回は MAPK 経路と ERK 阻害薬に着目し、遺伝子変異と薬剤感受性の関連性を探ることとした。

2. 研究の目的

本研究の目的は、オルガノイド感受性試験の臨床応用に向け、現状の個別化医療の克服すべき課題を補完できるかを示す事とし、大腸癌における ERK 阻害薬感受性と MAPK 経路遺伝子変異の関連性を検証した。

3. 研究の方法

1) 大腸癌細胞株の培養

BRAF 変異 3 種 (RK0, HT29, Cx1) KRAS 変異 8 種 (SW620, Lovo, SW948, HCT116, DLD1, MIP101, HCT15, HCT8) BRAF・KRAS 野生型 3 種 (KM12C, Caco2, Colo320) の計 14 種類のヒト大腸癌細胞株を使用した。各細胞株における遺伝子変異やマイクロサテライト不安定性の有無は、文献を参照した。細胞株は、10cm ディッシュに播種し、5%二酸化炭素下、37℃で培養し、培地は週に 3 回交換した。0.25% Trypsin- ethylenediaminetetraacetic acid (Invitrogen) を用いてディッシュから細胞を剥離し、1 週間ごとに継代培養した。

2) 臨床検体

東北大学病院で外科的に切除された大腸癌の臨床検体計 13 例を用いた。いずれの患者も、術前に化学療法や放射線療法を受けていなかった。切除した標本から癌組織と隣接する正常組織を採取し、オルガノイドの培養を行った。同時に、正常・癌組織を凍結組織包埋剤に入れ、保管した。本研究は東北大学倫理委員会の承認を受け、研究に先立ち患者から書面によるインフォームドコンセントを得た。

3) オルガノイド培養

オルガノイドの培養は、先行論文や当研究室の手法をもとに行った。外科的に切除された大腸癌組織を細かく切り分け、PBS で洗浄した後、Liberase (TH grade; Roche Life Science, Indianapolis, IN, USA) を用いて 37 °C で 30 分間、120rpm で回転させながら反応させた。さらに、残った断片を TrypLE Express (Invitrogen) を用いて 37 °C で 20 分間、120rpm で回転させながら処理した。上澄み液を回収し、200g、3 分間、4 °C で遠心分離した。細胞ペレットを Matrigel (growth factor reduced; BD Biosciences, San Jose, CA, USA) に包埋し、24 ウェルプレートに分注した (50 μ l Matrigel/well)。培地は Advanced DMEM/F12 (Invitrogen) に、ペニシリン/ストレプトマイシン (Invitrogen) 10mM HEPES (Invitrogen) 2mM GlutaMAX (Invitrogen) 1 \times B27 (Life Technologies, Grand Island, NY, USA) 10nM Gastrin I (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA) 1mM N-アセチルシステイン (Fujifilm Wako) を添加した。Growth factor は以下を使用した。50 ng/ml mouse-recombinant EGF (Life Technologies, Cergy Pontoise, France) 100 ng/ml mouse-recombinant Noggin (Peprotech, London, UK) 10% R-spondin-1 Conditioned Medium, 50% Wnt-3A Conditioned Medium, 500 nM A83-01 (Tocris Bioscience, Bristol, UK) FGF-basic (PeproTech) IGF-1 (BioLegend, San Diego, CA, USA) 10 mM Y-27632 (Fujifilm Wako)。マトリゲル重合後、2 種類の条件 (Wnt、R-spondin の有無) にわけて培地を加え、21%酸素、5%二酸化炭素条件下で培養した。培地は週 3 回換した。継代には 4 °C に冷却したセルリカバリーション (Corning, NY, USA) を加え、マトリゲルを解重合させ、200g、3 分、4 °C で遠心し、オルガノイドを回収した。TrypLE Select ($\times 10$) (Gibco, NY, USA) を D-PBS で 3 倍希釈した溶液でオルガノイドを 37 °C で 10 分間反応させ、オルガノイドを単細胞化させた。細胞をマトリゲルに包埋し、上記条件の培地で再度培養した。

4) 薬剤感受性試験

大腸癌細胞株を 96 ウェルプレートに 5000 細胞/well となるように分注した。細胞播種から 24 時間後に、SCH772984 (Selleckchem, Houston, TX, USA) を 0.00001 から 100 μ M の濃度で 4 日間培養した。MTS assay は CellTiter 96[®] Aqueous One Solution Cell Proliferation Assay (Promega, Madison, WI, USA) を用いて、細胞生存率を評価した。オルガノイドによる薬剤感受性試験では、オルガノイドを上記継代の方法で単細胞化し、BME type2 (R&D Systems, MN, USA) に包埋した。20 μ l/well となるように 96 ウェル U 字型マイクロプレートに分注した。SCH772984 を 0.001 から 100 μ M の濃度で 4 日間培養した後、CellTiter-Glo[®] 2.0 (Promega) を用いて、生存率を評価した。SCH772984 濃度範囲は、過去の文献に基づいて決定した。データ解析は、GraphPad prism ver.9 (GraphPad software, Inc., San Diego, CA, USA) を用いて、nonlinear regression (curve fit) and the equation log(inhibitor) vs. normalized response (variable slope) を適用し行った。

5) 次世代シーケンス

組織からの DNA 抽出は QIAamp DNA Mini Kit (Qiagen, Hilden, Germany) を用いた。28。オルガノイドの DNA 抽出は、GenElute[™] Mammalian Genomic DNA Miniprep Kit (Sigma-Aldrich, St Louis, Mo, USA) を用いて行った。次にエクソームキャプチャのためのライブラリー調製を行った。Covaris LE220 (Covaris, Woburn, MA, USA) を用いて、1 μ g の DNA を 150-200 bp の断片に切断した。各 DNA ライブラリーは、Bravo Automated Liquid Handling Platform (Agilent Technologies, Santa Clara, CA, USA) を用いて、SureSelectXT Reagents (Agilent Technologies) で調製した。DNA 断片を精製し、Herculase II Fusion DNA Polymerase (Agilent Technologies) を用いて PCR (polymerase chain reaction) を行い増幅した。増幅されたライブラリーは、AMPure XP reagent (Beckman Coulter, Brea, CA, USA) を用いて精製した。プレキャプチャーライブラリー DNA を、SureSelectXT Target Enrichment System (Agilent Technologies) を用いてエクソームキャプチャープローブとハイブリダイズさせた。プローブでハイブリダイズした DNA は PCR でさらに増幅した。高品質で十分な量のデータを得るために、定量 MiSeq を行った。変性したエクソームライブラリーは、HiSeq2500 (Illumina, San Diego, CA, USA) で HiSeq Rapid PE cluster kit v2 と HiSeq Rapid SBS Kit v2 (Illumina) を用いて、シーケンスを行った。

6) 統計学的解析

相関係数を算出するために、ピアソンの積率相関係数を用いた。また IC50 値の関係を見るために、Mann-Whitney テストで解析した。統計学的解析には GraphPad prism ver.9

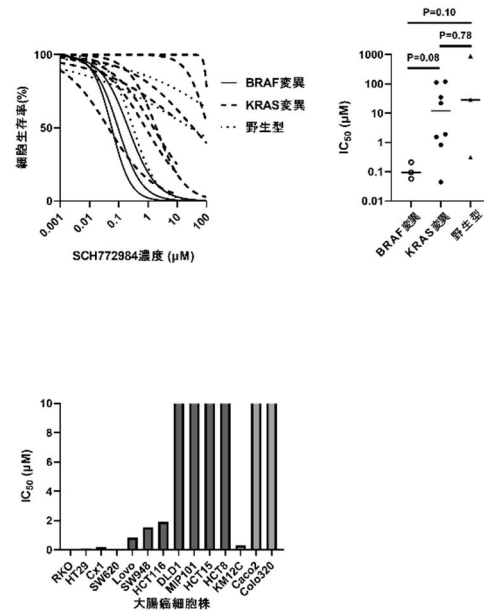
(GraphPad software, Inc.)を用いて行い、 $p < 0.05$ を統計学的に有意であるとした。

4. 研究成果

1) 大腸癌細胞株における ERK 阻害薬(SCH772984)の感受性試験

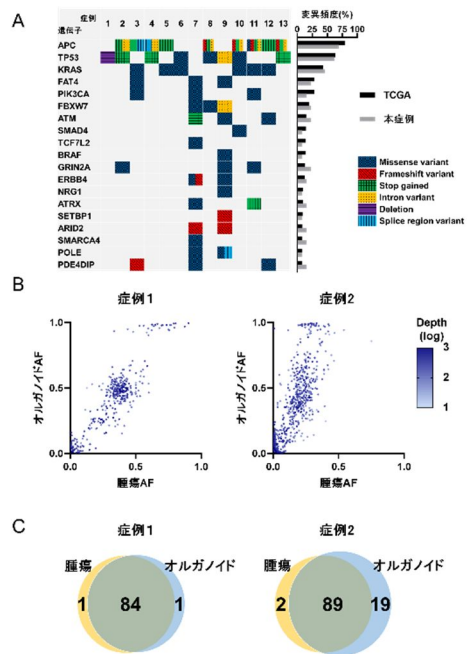
SCH772984 に対する感受性試験では細胞株毎に様々な細胞生存率曲線を示したが、特に BRAF 変異を有する細胞株で感受性が高い傾向にあった(図 1A)。次に、BRAF 変異、KRAS 変異、BRAF・KRAS 野生型細胞株の IC50 値を比較検討した。BRAF 変異と BRAF・KRAS 野生型細胞株を比較すると、BRAF 変異細胞株で IC50 値が低い傾向はあったが、統計的に有意差は認められなかった($p = 0.10$)。一方、KRAS 変異細胞株と BRAF・KRAS 野生型細胞株では、IC50 値に有意差は認められなかった($p = 0.78$)(図 1B)。IC50 値が 2 μM より低い細胞株を感受性群とすると、BRAF 変異の全て、KRAS 変異の半数、BRAF・RAS 野生型では一種の細胞株で感受性を認めた。BRAF・KRAS 野生型で SCH772984 に感受性がある細胞株(KM12C)は、マイクロサテライト不安定性(MSI)の細胞株であった(図 1C)。これらの結果により BRAF 変異を有する細胞株は感受性が高い傾向が認められたが、KRAS 変異に関しては変異の有無と感受性が必ずしも一致しなかった。

図 1



2) 次世代シーケンス(NGS)を用いた大腸癌切除検体とオルガノイドに対する遺伝子変異解析
オルガノイド培養と NGS を行った 13 症例の臨床病理学的因子を表 1 に示した。13 症例で認めた遺伝子変異の頻度は、TCGA のデータベースと概ね一致していた。(図 2A)。次に、オルガノイドが腫瘍の特性を保持しているかどうかを確かめるために、腫瘍とオルガノイドの遺伝子変異を 2 症例で比較検討した。検出されたすべての体細胞遺伝子変異の Allele Frequency を比較すると、相関係数は、症例 1 と 2 でそれぞれ 0.89 と 0.77 であり、強い相関を示していた(図 2B)。さらに、MSK-IMPACT、Oncoprime、Guardant360、NCCOncoPanel、FoundationOne で採用されている遺伝子変異に絞り、Allele Frequency の閾値を 0.1 に設定したところ、腫瘍で認められる Somatic mutation の 98%~99% がオルガノイドでも認められるという結果になった(図 2C)。

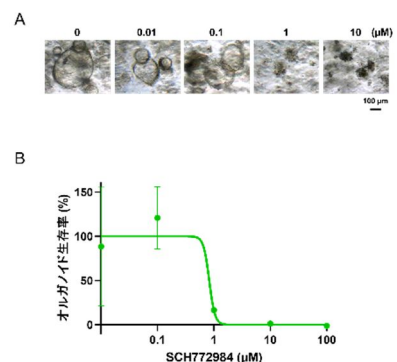
図 2



3) オルガノイドにおける SCH772984 の感受性試験

大腸癌組織からオルガノイドを培養し、SCH772984 の薬剤感受性試験(ATP assay)を行った。SCH772984 に感受性のある典型的な症例を図 3A に示すが、1 μM 以上の濃度ではオルガノイドの形状を保持できず、細胞生存率曲線を用いて IC50 値を算出すると 0.8 μM であった(図 3B)。SCH772984 に耐性のある典型的な症例を図 4A に示すが、1 μM 以上の濃度でもオルガノイドの形状を維持しており、細胞生存率曲線を用いて IC50 値を算出すると 4.7 μM であった(図 4B)。オルガノイドの形状とオルガノイドの ATP 発現量は概ね一致していた。全 13 例の SCH772984 に対する細胞生存率曲線を図 5A に示すが、BRAF または KRAS 変異がある症例で感受性が高い傾向にあった。次に、BRAF や KRAS 変異が SCH772984 の IC50 値と関連するか検討した。IC50 値は、BRAF や KRAS 変異がある症例では概

図 3



ね 0.1 μM ~ 1 μM であるのに対し、BRAF・KRAS 野生型の症例ではほとんどが 4 μM 以上であった。しかし、KRAS 変異群と BRAF・KRAS 野生型群とでは、IC50 値に統計的有意差は認められなかった ($p = 0.24$) (図 5B)。データは今回示していないが、5FU の薬剤感受性試験ではオルガノイドの薬剤感受性試験と細胞株の薬剤感受性試験では IC50 値の平均がオルガノイドで高く出る傾向にある。細胞株とオルガノイドの IC50 値は単純比較できないと思われるが、IC50 が 2 μM よりも低い症例を感受性群とすると、BRAF 変異症例、KRAS 変異症例の 6 分の 5、BRAF・RAS 野生型症例の 6 分の 1 で SCH772984 に感受性があるという結果となった。症例 12 は KRAS 変異があるにもかかわらず SCH772984 に耐性を示し、症例 7 は BRAF・KRAS 野生型であるにもかかわらず SCH772984 に感受性を示した。症例 7 は高頻度マイクロサテライト不安定性 (MSI-high) の症例であった (図 5C)。BRAF や KRAS 変異により SCH772984 の感受性を予測できる傾向を認めたが、遺伝子変異に一致しない症例も存在していた。

図4

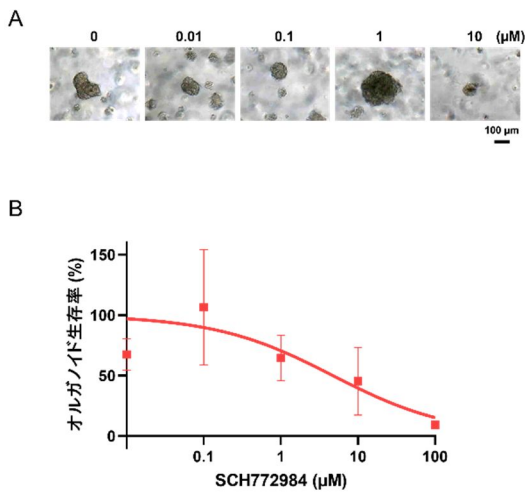
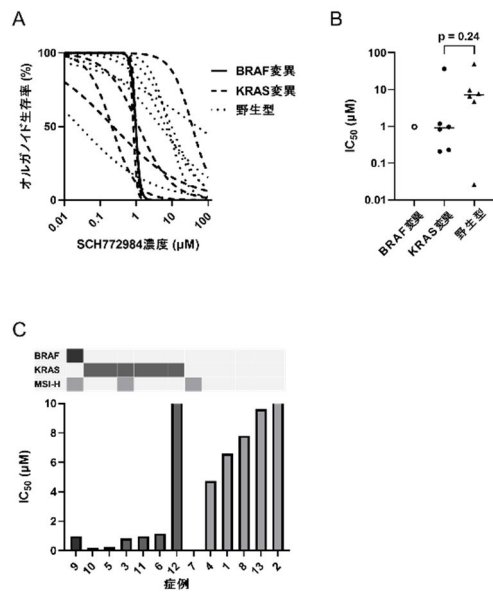


図5



5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計3件（うち査読付論文 3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 Tayama Hodaka, Karasawa Hideaki, Yamamura Akihiro, Okamura Yasunobu, Katsuoka Fumiki, Suzuki Hideyuki, Kajiwara Taiki, Kobayashi Minoru, Hatsuzawa Yuuri, Shiihara Masahiro, Bin Li, Gazi Md Yeashin, Sato Mizuki, Kumada Kazuki, Ito Shigehiro, Shimada Muneaki, Furukawa Toru, Kamei Takashi, Ohnuma Shinobu, Unno Michiaki	4. 巻 560
2. 論文標題 The association between ERK inhibitor sensitivity and molecular characteristics in colorectal cancer	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Biochemical and Biophysical Research Communications	6. 最初と最後の頁 59～65
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.bbrc.2021.04.130	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 Hirashima Tomoaki, Karasawa Hideaki, Aizawa Takashi, Suzuki Takashi, Yamamura Akihiro, Suzuki Hideyuki, Kajiwara Taiki, Mushi Hiroaki, Funayama Ryo, Shiota Matsuyuki, Ohnuma Shinobu, Nakayama Keiko, Unno Michiaki	4. 巻 568
2. 論文標題 Wnt5a in cancer-associated fibroblasts promotes colorectal cancer progression	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Biochemical and Biophysical Research Communications	6. 最初と最後の頁 37～42
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.bbrc.2021.06.062	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 -

1. 著者名 Mochizuki Yasushi, Funayama Ryo, Shiota Matsuyuki, Kikukawa Yuna, Ohira Masahiro, Karasawa Hideaki, Kobayashi Minoru, Ohnuma Shinobu, Unno Michiaki, Nakayama Keiko	4. 巻 149
2. 論文標題 Alternative microexon splicing by RBFox2 and PTBP1 is associated with metastasis in colorectal cancer	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 International Journal of Cancer	6. 最初と最後の頁 1787～1800
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1002/ijc.33758	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3件（うち招待講演 0件／うち国際学会 0件）

1. 発表者名 唐澤秀明, 村上 圭吾, 相澤 卓, 平嶋 倫亮, 三浦 康, 佐々木 宏之, 小野 智之, 小林 実, 梶原 大輝, 亀井 尚, 大沼 忍, 海野 倫明
2. 発表標題 癌関連繊維芽細胞はWntシグナル経路を介して大腸癌におけるリンパ行性転移に関与する
3. 学会等名 第60回日本癌治療学会学術集会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 唐澤秀明, 相澤卓, 平嶋倫亮, 田山穂高, 市川英孝, 小林実, 梶原大輝, 山村明寛, 神山篤史, 渡辺和宏, 森川孝則, 石田孝宣, 亀井尚, 大沼忍, 海野倫明
2. 発表標題 大腸癌切除検体を用いたトランスレーショナル研究～癌関連線維芽細胞とオルガノイド～
3. 学会等名 第122回日本外科学会定期学術集会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 田山穂高, 唐澤秀明, 山村明寛, 梶原大輝, 小林実, 椎原正尋, 島田宗昭, 古川徹, 亀井尚, 大沼忍, 海野倫明
2. 発表標題 大腸癌におけるERK阻害薬感受性とMAPK経路遺伝子変異の関連性
3. 学会等名 第80回日本癌学会学術総会
4. 発表年 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
研究分担者	大沼 忍 (Ohnuma Shinobu) (70451565)	東北大学・医学系研究科・准教授 (11301)	
研究分担者	山村 明寛 (Yamamura Akihiro) (30814678)	東北大学・大学病院・助教 (11301)	
研究分担者	黒羽 正剛 (Kuroha Masatake) (70709469)	東北大学・医学系研究科・大学院非常勤講師 (11301)	

6. 研究組織（つづき）

	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	小峰 啓吾 (Komine Keigo) (10725807)	東北大学・大学病院・助教 (11301)	
研究分担者	岡村 容伸 (Okamura Yasunobu) (00837495)	東北大学・未来型医療創成センター・助教 (11301)	

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