

令和 6 年 6 月 6 日現在

機関番号：17701

研究種目：研究活動スタート支援

研究期間：2021～2023

課題番号：21K20842

研究課題名（和文）オルガノイドによる食道癌発生予防を目指した新規治療薬開発

研究課題名（英文）Esophageal cancer organoid culture leads to the development of new drug to prevent the occurrence of cancer

研究代表者

下之菌 将貴（Shimonosono, Masataka）

鹿児島大学・鹿児島大学病院・医員

研究者番号：40814322

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 2,400,000円

研究成果の概要（和文）：頭頸部食道の正常上皮、異型上皮および扁平上皮癌オルガノイドを樹立し、遺伝子学的な解析を行った。これらの結果、オルガノイドが正常上皮、異型上皮、癌の遺伝子的背景を再現することを示したと共に、異型上皮がすでに癌関連の遺伝子変異を抱えているという興味深い事実を示した。また、薬剤試験の前臨床モデルとして有用であるオルガノイド培養技術を用いて、9,000種類以上の薬剤ライブラリーに対して高スループット薬剤スクリーニングを行うプラットフォームを樹立した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

食道癌オルガノイドおよび異型上皮由来のオルガノイドの樹立は報告がなく、遺伝子プロファイリングによりこれらの遺伝背景を明らかにし、それぞれのオルガノイドの定義づけを行ったことは非常に意義がある。今後これらのオルガノイド培養技術が薬剤開発をはじめとする研究媒体として活用されることが期待される。その中で、今回、9,000種類以上の薬剤ライブラリーに対して高スループット薬剤スクリーニングを行うプラットフォームを樹立した。このスクリーニング技術によって効率的に新規薬剤候補の抽出が可能となり、さらには将来的に個別化治療への臨床応用も期待される。

研究成果の概要（英文）：We established normal, dysplastic and cancer organoids using human head, neck and esophageal tissues. These organoids were subjected to the genome profiling analysis. The results revealed that organoids represent the genomic background of original tissues and showed that dysplastic organoids already have cancer-related genome mutations. We established the new platform of high-through put drug screening using organoid culture to develop new anti-cancer drug. More than 9,000 drugs approved by FDA were used for drug screening and putative drugs, that are commonly effective to multiple organoid samples, were extracted. Further collection of cases will lead to the development of new drug and the realization of precision medicine.

研究分野：消化器外科

キーワード：食道癌 オルガノイド 遺伝子解析 薬剤感受性試験

### 1. 研究開始当初の背景

近年の手術や放射線化学療法を併用した集学的治療の進歩にも関わらず、食道癌の5年生存率は35%程度であり、予後不良な消化器癌の一つである。患者の予後を向上するためには早期癌および前癌病変での治療介入が重要である。近年多くの癌関連遺伝子異常が報告されてきた一方で、発癌早期における病態は未だ十分に解明されておらず大きな課題である。

これまで多数の臓器において患者由来の癌オルガノイドが作成され、薬剤感受性モデルやゲノム解析研究のターゲットとして注目を集めている (Broutier L, Nat Med. 2017) (Driehuis E, Nat Protoc. 2020) (Ganesh K, Nat Med. 2019)。一方で、前癌病変、異型病変の細胞培養モデルの報告は他臓器を含めても少なく、頭頸部食道領域での過去の報告はない。また発癌に関わる機序を解明する目的で、癌病変を含めた前癌病変のゲノム解析は過去にも報告があるが (Haegglblom L, Cancer Med. 2019) (Manterola L, Sci Rep. 2018)。いずれの報告も腫瘍組織を用いた解析であり、3Dオルガノイド培養細胞を用いた前癌病変の遺伝子解析は報告がない。

### 2. 研究の目的

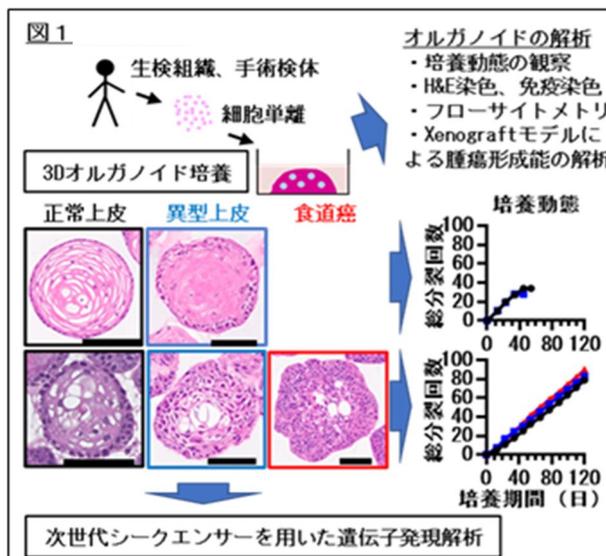
食道癌患者由来の正常上皮、異型上皮および癌生検組織からオルガノイドを作成しゲノム解析を行うことで、発癌早期における新たな分子機序を解明し、特定の発癌分子を同定し、リスクに応じた早期癌病変に対する個別化治療につなげることを本研究の目的とした。

### 3. 研究の方法

オルガノイドの作成・基礎解析およびゲノム解析 (図1)

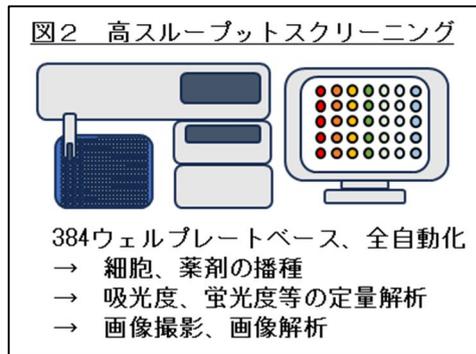
オルガノイドとは3次元的に生体外で作られた臓器であり、これらは組織の幹細胞から自己複製能力および分化能力で作成され、由来する組織の生理学的特徴を再現している事が特徴である。

本研究では、食道癌患者由来の正常上皮、異型上皮および癌生検組織からオルガノイドを作成し、培養動態や組織像の観察、免疫学的染色法やフローサイトメトリーによるタンパク発現解析、そして樹立したオルガノイド細胞株を用いて遺伝子発現解析を行った。正常上皮、異型上皮および癌細胞の比較を行うことで前癌病変における遺伝子変化やタンパク発現の変化に着目した。



### 次元食道癌オルガノイドを用いた高スループット薬剤スクリーニング (図2)

3次元オルガノイド培養は従来の平面細胞培養と比較して臨床検体を元にした細胞培養の成功率が高く、さらに構造的・機能的な生体環境の再現性も高いことから薬剤感受性試験の前臨床モデルとして注目を集めている (Van Hemelryk A et al. Cells. 2023) (Guillen KP et al. Nature Cancer. 2022)。3次元オルガノイドを用いた薬剤感受性試験は、薬剤の臨床効果を忠実に反映する一方で (Ganesh K et al. Nature Med. 2019)、技術的に多数の薬剤を同時に評価することは困難であったが、近年、高スループットスクリーニング技術が発達し、細胞、薬剤の播種や、プレートベースでの吸光度や蛍光度の定量解析、画像解析などが384ウェルなどのマルチプレートを用いて全自動で解析可能となった。本研究では、作成した3次元オルガノイドを用いて、9,000種類の薬剤ライブラリーのスクリーニングを行った。



### 4. 研究成果

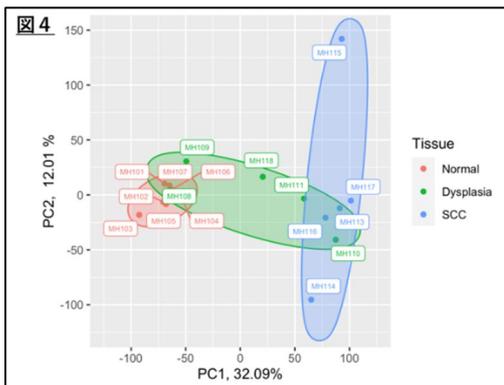
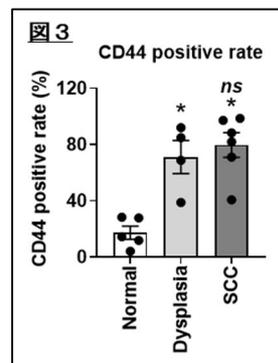
頭頸部食道の正常上皮オルガノイド、異型上皮オルガノイドおよび扁平上皮癌オルガノイドを樹立し、培養動態や組織像の観察を行った。正常細胞由来のオルガノイドは最外層に基底細胞様の細胞列を形成し、中心に向かって正常の上皮構造を模した分化勾配を示す一方で、癌細胞由来のオルガノイドは大小不同の細胞が不規則に集塊を形成し、腫瘍巣を模した構造を示した。ま

た、細胞増殖についても、正常細胞由来のオルガノイドは一定の培養期間で増殖を停止するのに対し、癌細胞由来のオルガノイドは半永久的な増殖形態を示した。異型上皮由来のオルガノイドはこの正常上皮由来の形質に似た個体と癌細胞由来の形質に似た個体とが存在した(図1)。

それぞれのオルガノイドのタンパク発現をフローサイトメトリーで解析すると、癌幹細胞マーカーであるCD44の発現は正常上皮オルガノイドに比べて、異型上皮オルガノイド、癌オルガノイドで有意に高く、異型上皮が癌に近い性質を保持していることが示された(図3)。

また、遺伝子学的な解析では、正常上皮オルガノイドはコピー数変異を示さなかったが、癌オルガノイドは多くのコピー数変異を示し、異型上皮オルガノイドはその中間の傾向を示した。食道癌で最も高頻度の遺伝子変異であるp53変異については、正常

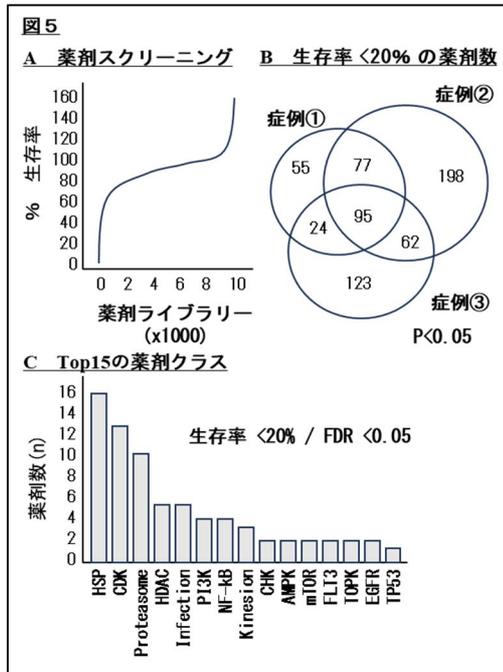
上皮オルガノイドでは変異率0%、異型上皮オルガノイドでは変異率50%、癌オルガノイドでは変異率100%であった。癌オルガノイドでは多くの遺伝子変異が検出され、遺伝子発現プロファイルでは正常上皮、癌で明らかなクラスターを形成し、異型上皮オルガノイドはその中間に位置した。これらの結果は、オルガノイドが正常上皮、異型上皮、癌の遺伝子的背景を再現することを示したと共に、異型上皮がすでに癌関連の遺伝子変異を抱えているという興味深い事実を示した(図4)。



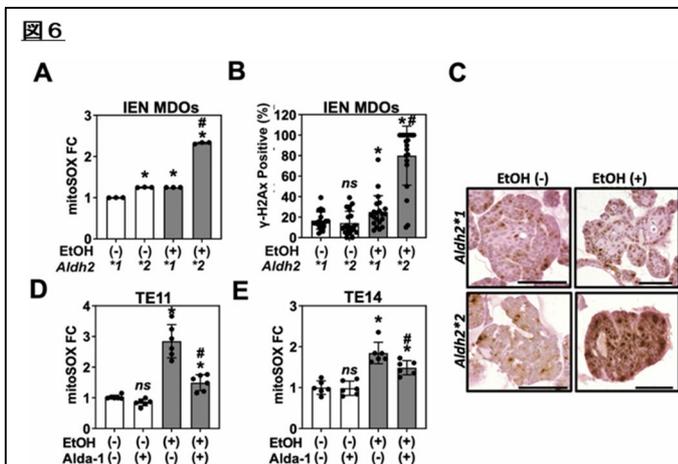
また、食道癌に対する新規治療薬を開発することを目的とし、多数の分子標的薬の薬剤感受性試験をハイスループットに実施可能なプラットフォームの樹立を試みた。薬剤試験の前臨床モデルとして有用であるオルガノイド培養技術を用いて9,000種類以上のアメリカ食品医薬品局(FDA)承認薬剤を含む薬剤ライブラリーに対して高スループット薬剤スクリーニングを行った。

パイロット研究として3症例の癌オルガノイドでスクリーニングを行い、258種類の薬剤が3症例のうち、2症例以上の癌オルガノイドにおいて80%以上の細胞を死滅させた。95種類の薬剤が3症例の癌オルガノイドに共通して、80%以上の細胞を死滅させた。さらに、3症例に共通して治療効果を認めた薬剤のうち、薬剤の属するクラス分けも明らかとなった(図5)。

今後症例の蓄積により新規治療薬の同定が可能になるとともに、確立された薬剤ライブラリーやデータバンク化された薬剤反応性と遺伝子解析情報の統合データは、今後治療選択肢の限られた食道癌患者に対して個別化治療の選択肢を提供する可能性がある。個別化治療への応用が期待される。



その他、関連研究として、アルコールを異型上皮、癌細胞由来のオルガノイドに暴露することで、アルコールによって癌幹細胞マーカーであるCD44の発現が惹起されることを示した。その中で、食道癌の発癌過程において、アルコールおよびアルコール暴露に起因する遺伝子傷害、酸化ストレスが重要な役割を担っており、アルコールの代謝酵素であるALDH2の遺伝子異常がみられる個体ではその影響が増幅される可能性を示し、論文発表した(Shimonosono M et al. Carcinogenesis. 2023)。



## 5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計8件（うち査読付論文 8件/うち国際共著 7件/うちオープンアクセス 4件）

1. 著者名 Sachdeva Uma M., Shimonosono Masataka, Flashner Samuel, Cruz-Acuna Ricardo, Gabre Joel T., Nakagawa Hiroshi	4. 巻 509
2. 論文標題 Understanding the cellular origin and progression of esophageal cancer using esophageal organoids	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Cancer Letters	6. 最初と最後の頁 39～52
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.canlet.2021.03.031	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 該当する
1. 著者名 Shimonosono Masataka, Tanaka Koji, Flashner Samuel, Takada Satoshi, Matsuura Norihiro, Tomita Yasuto, Sachdeva Uma M., Noguchi Eishi, Sangwan Veena, Ferri Lorenzo, Momen-Heravi Fatemeh, Yoon Angela J., Klein-Szanto Andres J., Diehl J. Alan, Nakagawa Hiroshi	4. 巻 11
2. 論文標題 Alcohol Metabolism Enriches Squamous Cell Carcinoma Cancer Stem Cells That Survive Oxidative Stress via Autophagy	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Biomolecules	6. 最初と最後の頁 1479～1479
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.3390/biom11101479	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
1. 著者名 Angela J Yoon, Regina M Santella, Shuang Wang, David I Kutler, Richard D Carvajal, Elizabeth Philipone, Tian Wang, Scott M Peters, Claire R Stewart, Fatemeh Momen-Heravi, Scott Troob, Matt Levin, Zohreh AkhavanAghdam, Austin J Shackelford, Carleigh R Canterbury, Masataka Shimonosono, Hiroshi Nakagawa	4. 巻 2021
2. 論文標題 MicroRNA-Based Cancer Mortality Risk Scoring System and hTERT Expression in Early-Stage Oral Squamous Cell Carcinoma	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Journal of Oncology	6. 最初と最後の頁 1～11
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1155/2021/8292453	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
1. 著者名 Okubo Keishi, Arigami Takaaki, Matsushita Daisuke, Kijima Takashi, Shimonosono Masataka, Uenosono Yoshikazu, Yanagita Shigehiro, Kurahara Hiroshi, Mori Shinichiro, Ohtsuka Takao, Natsugoe Shoji	4. 巻 21
2. 論文標題 Clinical impact of creatine phosphokinase and c-reactive protein as predictors of postgastrectomy complications in patients with gastric cancer	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 BMC Cancer	6. 最初と最後の頁 95
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1186/s12885-021-07801-z	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

1. 著者名 Takeo Hara, Yuta Kasagi, Joshua Wang, Masaru Sasaki, Bailey Aaron, Adam Karami, Masataka Shimonosono, Rieko Shimonosono, Hisatsugu Maekawa, Lauren Dolinsky, Benjamin Wilkins, Jeremy Klein, Jane Wei, Kathryn Nunes, Kristle Lynch, Kathryn E Hamilton, Tatiana A Karakasheva, Kelly A Whelan, Hiroshi Nakagawa, Amanda B Muir	4. 巻 13
2. 論文標題 CD73+ Epithelial Progenitor Cells That Contribute to Homeostasis and Renewal Are Depleted in Eosinophilic Esophagitis	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Cellular and Molecular Gastroenterology and Hepatology	6. 最初と最後の頁 1449 ~ 1467
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.jcmgh.2022.01.018	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

1. 著者名 Flasher Samuel, Shimonosono Masataka, Tomita Yasuto, Matsuura Norihiro, Ohashi Shinya, Muto Manabu, Klein-Szanto Andres J, Alan Diehl J, Chen Che-Hong, Mochly-Rosen Daria, Weinberg Kenneth I, Nakagawa Hiroshi	4. 巻 45
2. 論文標題 ALDH2 dysfunction and alcohol cooperate in cancer stem cell enrichment	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 Carcinogenesis	6. 最初と最後の頁 95 ~ 106
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1093/carcin/bgad085	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 該当する

1. 著者名 Masuda Mia Y., Shimonosono Masataka, Flasher Samuel, Morimoto Masaki, Pai Rish K., Rank Matthew A., Nakagawa Hiroshi, Kita Hirohito, Wright Benjamin L., Doyle Alfred D.	4. 巻 153
2. 論文標題 Epithelial overexpression of IL-33 induces eosinophilic esophagitis dependent on IL-13	5. 発行年 2024年
3. 雑誌名 Journal of Allergy and Clinical Immunology	6. 最初と最後の頁 1355 ~ 1368
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.jaci.2024.01.017	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 該当する

1. 著者名 SHIMONOSONO MASATAKA, ARIGAMI TAKAAKI, MATSUSHITA DAISUKE, TSURUDA YUSUKE, SASAKI KEN, BABA KENJI, UCHIKADO YASUTO, KURAHARA HIROSHI, OHTSUKA TAKAO	4. 巻 44
2. 論文標題 Evaluation of Quality of Life and Prognosis of Gastric Cancer Patients After Laparoscopic Subtotal Gastrectomy	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 Anticancer Research	6. 最初と最後の頁 387 ~ 396
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.21873/anticancer.16823	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1件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 下之園将貴
2. 発表標題 アルコール暴露は頭頸部・食道癌腫瘍内でオートファジー活性の高い癌幹細胞分画の増加を誘導する
3. 学会等名 日本外科学会総会
4. 発表年 2022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
---------	---------------------------	-----------------------	----

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		
米国	Columbia University		