

令和 5 年 6 月 8 日現在

機関番号：11301

研究種目：研究活動スタート支援

研究期間：2021～2022

課題番号：21K20850

研究課題名（和文）オルガノイドとゲノム解析を用いたリンパ節転移胆管癌診断治療法の開発

研究課題名（英文）Development of diagnostic system and treatment for biliary cancer with lymph node metastasis using organoids and genome analysis

研究代表者

椎原 正尋 (Shiihara, Masahiro)

東北大学・医学系研究科・大学院非常勤講師

研究者番号：00907701

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）：患者由来オルガノイド培養に必要な試薬、保存液、核酸抽出キット等を購入し数種類の胆道癌オルガノイド培養に成功、library作成を行った。オルガノイドは免疫染色とexome解析の結果を原発腫瘍と比較し、特異的遺伝子変異、発現を継承している事を確認した。培養成功したオルガノイドは、共焦点顕微鏡によるタイムラプス観察にて、増殖/進展形態を観察した。胆道癌の他に、膵管内乳頭粘液性腫瘍の患者由来オルガノイドの培養にも成功し、特異的な増殖形態を観察することが出来た。さらに、Exome解析、transcriptome解析の結果から抽出したドライバー遺伝子変異の特異的治療薬の効果をオルガノイドで確認した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

胆道癌の患者由来オルガノイド(三次元培養細胞)の培養に成功し、癌モデルとしての活用、研究を行っている。予後不良で治療法の少ない胆道癌の増殖/進展形態を生体内に近い形で観察し、薬剤感受性試験などを行う事ができている。

過去の保存切除検体のゲノム解析結果と臨床的特徴や予後をひもづけて、オルガノイドをin vitroモデルとして検証することで、新規抗腫瘍薬や悪性度予測ツールなどの開発につなげることができる。

研究成果の概要（英文）：I purchased specific reagents, preservation solutions, nucleic acid extraction kits, etc. necessary for patient-derived organoid culture, succeeded in culturing several types of biliary cancer organoids, and created cell library. I compared the results of immunostaining and exome sequence of organoids with that of primary tumors, and confirmed that the organoid inherited specific mutations and expressions from primary tumors. Organoids that were able to be observed their growth/development morphology by time-lapse observation with a confocal microscope. In addition to biliary cancer, I also succeeded in culturing organoids derived from intraductal papillary mucinous neoplasm of pancreas, and were able to be observed the specific growth morphologies. Furthermore, we could confirm the efficacy of specific therapeutic agents for driver gene mutations extracted from the results of exome and transcriptome sequences in organoids.

研究分野：肝胆膵外科

キーワード：胆道癌 オルガノイド ゲノム解析 exome transcriptome 個別化医療

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

胆管癌は他癌と比較して明らかに化学療法の選択肢が少なく、根治切除以外に長期生存を期待できる治療法はない。しかし、根治切除には、膵切除や大量肝切除など高難度手術を要し、重度の合併症を伴うことがある。また再発もしばしばである。胆管癌切除後予後を病理学的リンパ節転移の有無で比較するとリンパ節転移陽性例(以下 N+)は陰性例(以下 N-)より明らかに悪い。しかし、画像診断能の向上した現在でもリンパ節転移の術前診断的中率は高くない。近年、次世代型シーケンサー(NGS)の普及により胆管癌の遺伝子解析研究も散見されるが、胆管癌の「リンパ節転移のドライバー遺伝子変異」など詳細な研究解析結果はごくわずかである。

オルガノイド細胞とは、組織特異的な機能を保ちながら増殖する三次元構造体である。患者の癌細胞から作成、培養されたオルガノイドは従来の二次元培養細胞と比較して、より生体の組織環境を模倣しているため、癌モデルとしての利用が期待されている。胆道癌のオルガノイド培養の報告は極めて少ないが、我々は種々の組織型を示す胆道癌からのシステミックな培養に成功した。

2. 研究の目的

- ・患者由来胆道癌オルガノイドのサンプル数を増やしライブラリーの作成を行う
- ・胆管癌のリンパ節転移ドライバー遺伝子変異の同定する
- ・ドライバー遺伝子変異を術前体液内で同定し術前診断ツールの開発を目指す
- ・リンパ節転移ドライバー遺伝子異常に対する特異的新規分子標的治療法の開発を目指す

3. 研究の方法

(1) 患者由来オルガノイドのライブラリー作成

我々の既存のプロトコールに改良を加えながら培養成功率の上昇と長期培養成功をめざす。

(2) 胆管癌のリンパ節転移に關与するドライバー遺伝子変異の同定

胆管癌切除症例の凍結サンプルより核酸抽出(DNA)を行いNGSによる全ゲノム/エクソン/標的遺伝子解析を行う。シーケンスデータ解析の結果と臨床データより、コホートを調節してリンパ節転移ドライバー変異遺伝子を同定する。さらにN+由来/N-由来オルガノイドを用いてリアルタイムな増殖進展形態の比較観察を行う。

(3) 術前体液中 cfDNA の評価

同定された遺伝子変異を術前体液内でターゲットシーケンスにより確認し、術前リンパ節転移診断ツールとしての有用性を評価する。

(4) リンパ節転移ドライバー変異遺伝子の特異的標的療法の開発

申請者が開発した個別化医療モデルでは、変異遺伝子の中から治療標的候補遺伝子を抽出し、標的薬の効果を胆道癌オルガノイドで検証する。

4. 研究成果

(1) 患者由来膵胆道腫瘍オルガノイドのライブラリー作成

腫瘍の薬剤感受性などの機能解析を行うために、膵胆道腫瘍の患者由来オルガノイドのサンプル数を増やすべく新規培養を試みた。計54例の膵胆道腫瘍の培養に成功し、長期培養が可能だったオルガノイドに関しては、免疫染色とexome解析の結果を原発腫瘍と比較し、特異的遺伝子変異、発現を継承している事を確認した。

(2) 胆道腫瘍の遺伝子解析

東京女子医科大学消化器外科で保存していた手術症例の切除サンプルのうち2011年から2020年までの計53例(胆管癌38例、胆嚢癌13例、胆管内乳頭粘液性腫瘍(IPNB)2例)を対象とし、核酸抽出から遺伝子解析(whole exome sequence, transcriptome sequence)にまわした。

(3) 膵管内乳頭粘液性腫瘍(IPMN)オルガノイド培養法の確立と遺伝子解析、増殖形態の解明
過去に報告のほとんどない患者由来IPMNのオルガノイド培養法の確立と増殖形態の解明を試みた。胆道癌オルガノイド培養法に改変を加えた結果、Subtypeの異なる数種類のIPMNオルガノイド培養に成功した。共焦点顕微鏡によるタイムラプス観察では、IPMNオルガノイドが粘液を分泌する形態や分裂増殖する形態の観察に成功した。全エクソーム解析の結果から抽出したドライバー遺伝子変異の特異的阻害剤によってIPMNオルガノイドの増殖と粘液分泌が抑制された。

さらに同一症例から培養した IPMC オルガノイドと膵管癌オルガノイドの transcriptome 解析の結果の比較から IPMC に高発現している geneX を同定した。geneX の特異液阻害薬を IPMN オルガノイドに負荷することでオルガノイドの粘液産生が抑制された。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計4件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 1件）

1. 発表者名 Masahiro Shiihara, Toru Furukawa
2. 発表標題 Comprehensive genotyping and organoid cultures for identifying and testing genotype-oriented personalized medicine for pancreatobiliary cancers
3. 学会等名 The Asian-Pacific Hepato-Pancreato-Biliary Association 2021 (国際学会)
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 Masahiro Shiihara, Toru Furukawa
2. 発表標題 Organoids of pancreatobiliary cancers applied for personalized medicine
3. 学会等名 第80回 日本癌学会学術総会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 椎原正尋、古川徹
2. 発表標題 患者由来IPMNオルガノイドとゲノム解析を用いた増殖形態の解明
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 椎原正尋、古川徹
2. 発表標題 患者由来IPMNオルガノイドの樹立とゲノム解析
3. 学会等名 第108回日本消化器病学会総会
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
---------	---------