

令和 6 年 6 月 17 日現在

機関番号：15301

研究種目：研究活動スタート支援

研究期間：2022～2023

課題番号：22K20825

研究課題名（和文）FAP陽性がん関連線維芽細胞の遺伝子プロファイリングと個別化治療に向けた探索的研究

研究課題名（英文）Genetic profiling of FAP-positive cancer-associated fibroblasts and exploratory studies for personalized therapy

研究代表者

賀島 肇（Kashima, Hajime）

岡山大学・大学病院・医員

研究者番号：80965187

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 2,200,000円

研究成果の概要（和文）：食道扁平上皮癌および正常食道粘膜の臨床検体を採取し、オルガノイドライブラリの作成を行った。また周囲のがん関連線維芽細胞の培養樹立も行った。症例数は研究開始から1年半で約50検体におよび、樹立成功率はそれぞれ、癌オルガノイド：41%、正常食道上皮オルガノイド：78%、がん関連線維芽細胞：74%であり、既報と遜色ない結果であった。オルガノイドの表現型は生検組織ごとに異なる形態となっており、発現タンパクもそれぞれのオルガノイドで異なり、生検組織の性状を反映している傾向を見出した。薬剤に対するオルガノイドの反応は生検を行った患者自身の薬剤耐性を予想できる可能性が示唆された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

生検組織、つまり患者ごとに異なるオルガノイドおよび線維芽細胞を用いて、その特徴・各種薬剤に対する反応を解析することで食道癌をプロファイリングすることが可能となる。これにより同じ食道癌でも患者ごとに異なる最適な治療を行うための個別化治療の実現化につながる。早期再発症例や各種治療抵抗性症例に対しても既存の治療方法以外の選択肢を見出すことができるなら難治性食道がん患者に与える恩恵は計り知れない。

研究成果の概要（英文）：Clinical specimens of esophageal squamous cell carcinoma and normal esophageal epithelium were collected to generate an organoid library. Cultured cancer-associated fibroblasts were also established from esophageal cancer area. The success rates were 41% for cancer organoids, 78% for normal esophageal epithelial organoids, and 74% for cancer-associated fibroblasts, which were comparable to previous reports. Phenotypes of organoids were different in each biopsy tissue, and expressed proteins were also different in each organoid, which reflects the characteristics of the biopsied tissue. The response of organoids to drugs may be predictive of drug resistance in biopsied patients.

研究分野：消化器癌

キーワード：オルガノイド 食道癌 癌関連線維芽細胞

様式 C - 19、F - 19 - 1 (共通)

1. 研究開始当初の背景

(1) がん周囲の微小環境において活性化された線維芽細胞が様々なメカニズムで腫瘍の悪性化に寄与することが知られてきた。しかし近年、このがん関連線維芽細胞(Cancer-associated fibroblasts: CAFs)にも不均一性があり異なる性質を有する CAFs の存在が報告がされている。CAFs の特異的マーカーは複数あり、その中でも α -smooth muscle actin (SMA) がよく知られているが、我々は以前からより特異的なマーカーの FAP に着目し研究してきた。CAFs の細胞表面に発現している膜貫通タンパクである FAP の機能を追求しゲノムレベルで解析することは、FAP 陽性 CAFs に対する新規治療法の発展にとって重要である。

(2) がん微小環境は様々な細胞が複雑にネットワークを形成しており、そのメカニズムを解析するためにはより生体を模した条件での実験系が理想的である。個々の患者がん組織検体を採取し立体的な条件下で培養を行うオルガノイド技術はがん微小環境研究に相応しい実験手技の一つである。腺がん細胞でのオルガノイド技術は広く普及してきたが、食道がんを含む扁平上皮癌でのオルガノイド技術は発展途上であり、さらなる研究の余地がある分野である。

2. 研究の目的

(1) 食道がん患者からがん組織を採取し線維芽細胞の単離培養を行う。プロテオミク解析だけでなく、核酸を抽出し遺伝子発現レベルやエピジェネティックな変化も解析する。これにより、患者プロファイルごとに CAFs がゲノムレベルでの不均一性・多様性をもつことが明らかにする。

(2) 患者がん組織を採取し、オルガノイド培養樹立を行う。オルガノイド組織は患者の予後、化学療法の効果、術後病理組織検体などの臨床情報とあわせてデータの集積を行い、ライブラリの構築を行う。

(3) 個々の特性をもったオルガノイドに対して、薬剤に対する反応や線維芽細胞と共培養した際の相互作用を解析する。食道がん個別化治療につながる *in vitro* での実験系の基盤を形作る。

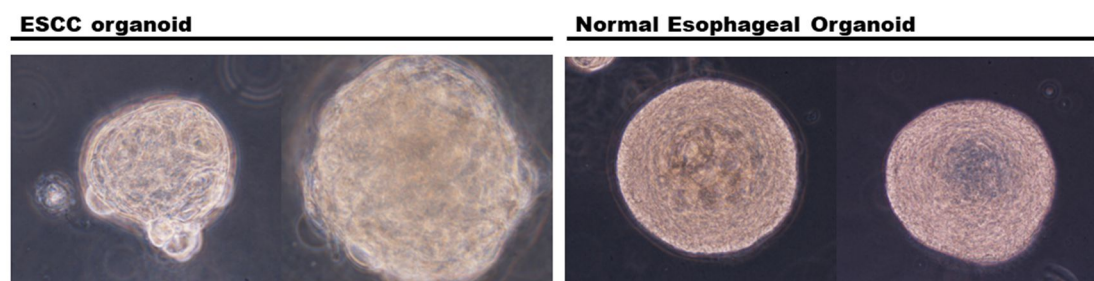
3. 研究の方法

(1) 食道がん患者から採取した CAFs において特異的マーカーの発現レベルを western blotting で評価する。SMA, FAP, Podoplanin などの発現と食道がんそのものの形態や遺伝子発現パターンとの関連を解明する。

(2) 樹立したオルガノイドは第二継代もしくは第三継代で一部は実験に使用し、残りは引き続き継代するか凍結保存する。オルガノイドからはタンパク抽出を行い p53, p63, Ki-67 などの発現を western blotting で評価する。また、オルガノイドはディッシュ上でゲル固定しパラフィン包埋・薄切の後免疫組織化学染色を行う。オルガノイド上での各種タンパクの発現の局在を評価する。

(3) 進行食道がん患者に対する化学療法として行われている DCF 療法 (Docetaxel, Cisplatin, Fluorouracil) を想定した薬剤投与実験を行う。樹立されたオルガノイドにそれぞれの抗がん剤を添加し細胞生存率および IC50 を算出する。また臨床検体との比較のために食道扁平上皮がんのセルラインである TE series に対する薬剤反応を評価する。通常の平面培養に加えて立体培養 (Spheroid) も行い、それぞれのパターンについて解析を行う。

図1 生検組織から樹立したオルガノイド



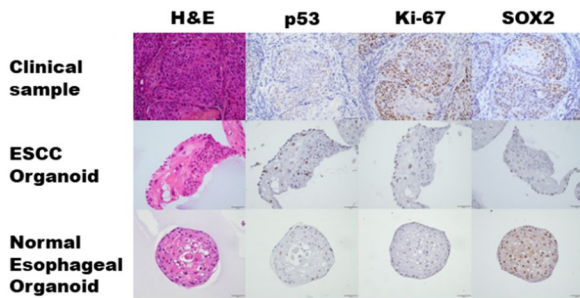
4. 研究成果

(1) 採取した組織のうち培養樹立に成功したものは74%であった。各患者の CAFs ごとにマーカーの発現量が異なることが示された。CAFs のタンパク発現のみを解析しているため、その特性がもともと存在していた線維芽細胞によるものなのか発生したがんに影響を受けたことによるものなのかまで評価することはできなかった。さらなる症例の蓄積と CAFs のより詳細な解析により新たな知見が得られるものと期待している。

(2) 2023年2月に1例目のオルガノイド用の食道扁平上皮がん検体採取を開始し、2024年4月時点で50症例の検体採取を行った。検体採取を行ったものの、樹立に至らなかった症例もある。食道扁平上皮がんオルガノイドの樹立成功率は41%であり、正常食道上皮オルガノイド78%の樹立成功率であった。既報と比較しても遜色ない成績であった。(図1)

(3) 正常食道オルガノイドはどの個体から採取されたものでも概ね同様の形態を示す。癌オルガノイドはいびつな形態のものもあり、個体による差がみられる。分化度や深達度によってオルガノイドの性状が異なる可能性があるがさらなる症例の蓄積により全容解明が進むと考えられた。また、癌オルガノイドは原発組織の生検検体と同じようなタンパク発現パターンを示すことがわかった。(図2)

図2 生検組織とオルガノイドのタンパク発現の比較



(4) 食道扁平上皮がん細胞であっても、セルラインにより薬剤の感受性が異なることを spheroid モデルで示した。TE1, TE4 および TE8 の spheroid では Docetaxel に対する感受性が良好であり有効に細胞死を誘導した。しかし Cisplatin, Fluorouracil に関して TE8 は比較的良好な感受性を示したものの TE1, TE4 とともに薬剤耐性を示した。(図3) これらの要因についてはがん微小環境が影響を及ぼしているのみならず、エピジェネティックなメカニズムの関与も示唆されたが、全容解明には至っていない。また少数例での検討ではあるが、オルガノイドに対する薬剤感受性が良好であった症例において術前化学療法が奏功したという結果が得られており、さらなる症例の蓄積により個別化治療へむけての橋渡し研究となる可能性が示された。(図4)

図3 Cell line spheroidの薬剤反応性結果

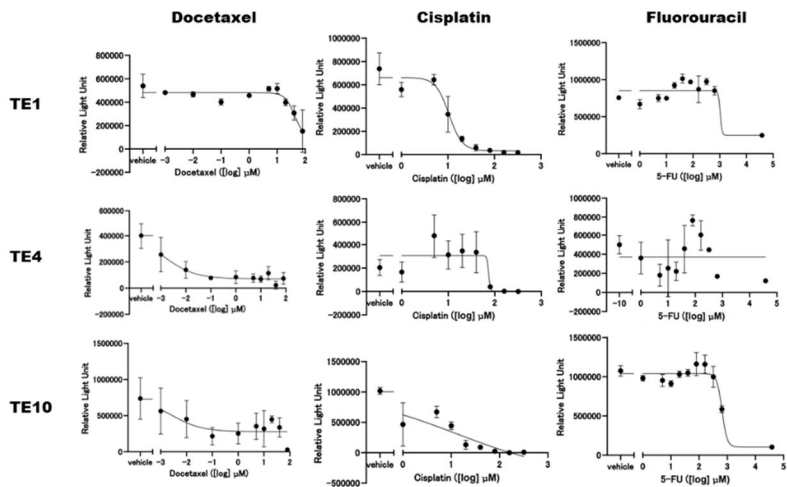
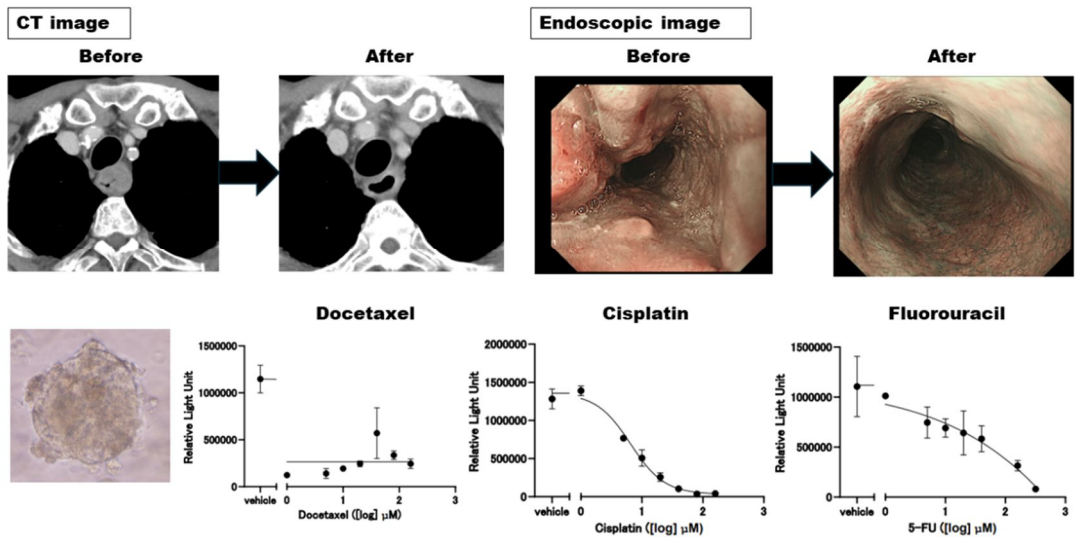


図4 オルガノイドに対するDCFの効果と臨床経過との比較



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			
米国	Columbia University			