

令和 6 年 5 月 20 日現在

機関番号：17301

研究種目：研究活動スタート支援

研究期間：2022～2023

課題番号：22K20827

研究課題名（和文）膵癌EUS-FNA検体を用いたex vivo培養システム構築と新規薬剤感受性試験の確立

研究課題名（英文）Establishment of ex vivo culture system and novel drug sensitivity test using EUS-FNA specimens from pancreatic cancer

研究代表者

高橋 孝輔 (Kosuke, Takahashi)

長崎大学・病院（医学系）・助手

研究者番号：60957439

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）：膵癌に対してEUS-FNAを施行した20症例の採取検体組織の面積測定およびtumor cellularityを解析した。組織切片面積中央値は全体で4.79 mm<sup>2</sup>で、穿刺針別では19G 9.06 mm<sup>2</sup>、22G 4.85 mm<sup>2</sup>、25G 1.51 mm<sup>2</sup>であった。また、tumor cellularityは28.3% (11-74%)であった。EUS-FNB検体、特に穿刺針径が太いほどより多くの組織を採取できることが判明した。また、今回は新規薬剤感受性試験のために切除検体およびEUS-FNA検体でのヒト由来オルガノイドの作成を試みた。最終的に3次元培養法の長期維持、培養に成功した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

今回の研究成果により現在使用されている穿刺針による採取組織量が明確となり、得られたEUS-FNA検体を用いてオルガノイド培養を安定して行えることが明らかとなった。今後の研究継続により新しいDSTシステムを確立していくことができれば、膵癌の実臨床における分子病理学的なデータと統合することによって、膵癌の個別化医療の確立に一役を担える事だけでなく、他のがんにも有益な結果をもたらす可能性がある。

研究成果の概要（英文）：Tissue samples from 20 cases of pancreatic cancer that underwent EUS-FNA were analyzed for sample area measurement and tumor cellularity. The median tissue section area was 4.79 mm<sup>2</sup> overall, with the breakdown by needle size being 9.06 mm<sup>2</sup> for 19G, 4.85 mm<sup>2</sup> for 22G, and 1.51 mm<sup>2</sup> for 25G. Additionally, tumor cellularity was 28.3% (range 11-74%). It was found that EUS-FNB samples, particularly with larger needle diameters, allowed for the collection of more tissue. Furthermore, an attempt was made to create human-derived organoids using resected specimens and EUS-FNA samples for a novel drug sensitivity test. Ultimately, long-term maintenance and culture with three-dimensional cultivation methods were successfully achieved.

研究分野：消化器内科

キーワード：オルガノイド

## 1. 研究開始当初の背景

昨今の統合的がん治療の発展にもかかわらず、膵癌の5年生存率は9.8%と未だ予後不良な疾患である。特に切除不能膵癌に対して modified FOLFIRINOX 療法や Gem+nab-PTX 療法が推奨されるが、生存期間中央値はそれぞれ 11.2 ヶ月、13.5 ヶ月と報告され、未だ病勢制御は容易でない。また、膵癌患者に対して遺伝子パネル検査を実施したとしても、治療介入に至る症例は10%程度である。原因の一つとして、個別化医療が確立されておらず、個々の症例に至適な化学療法や分子標的薬の選択を可能とする評価システムの未確立と癌の薬剤耐性機構が未だ十分に解明されていない点が挙げられる。従って、この課題点を解決するために、適切な治療選択と薬剤耐性機構解明を可能とする迅速な新規薬剤感受性試験(Drug sensitivity test: DST)開発は急務である。

近年、注目されている DST としてヒト由来オルガノイド(Patient-derived organoid: PDO)が挙げられる。しかし、膵癌に対する PDO を用いた DST の研究では、DST 自体は高い精度をもって実施可能であったものの、結果判明に平均 49 日を要しており(Seppälä, T.T. et al. Ann. Surg. 2020.), 進行の早い膵癌ではその前に致命的になりうる。従って、この問題点を克服する短時間かつ高精度の薬剤感受性評価ができる新規培養システムを構築する必要がある。

さらに最近では、膵癌に対して診断目的に施行する超音波内視鏡下生検(EUS-TA)を用いて、多くの腫瘍組織を得ることができるようになっている。したがって、EUS-TA により採取した組織検体を用いて PDO を用いた DST、さらには PDO を応用した新規 DST を実現できる可能性がある。以上の背景の中、本研究では、膵癌 EUS-TA 検体を用いた ex vivo 培養システム構築と新規 DST の確立を目的とした。

## 2. 研究の目的

本研究では、EUS-TA で得られる膵癌の組織検体の評価および膵癌 EUS-TA 検体を用いた ex vivo 培養システム構築と新規 DST の樹立を目的とした。新規 ex vivo 培養システム樹立の前段階として、切除検体と EUS-TA 検体に対する PDO システムを確立することとした。

## 3. 研究の方法

下記の3つの検討を行なった。

- (1) 2020年9月から2021年12月までに膵癌に対して当院で EUS-TA を施行した 20 症例を対象とし、得られた検体に関して BZ-X700 (Keyence) を用いての採取組織の面積測定を行なった。また、tumor cellularity も解析した。
- (2) EUS-TA 検体での DST の前段階として、手術検体を用いた PDO の作成を試みた。
- (3) EUS-TA 検体における PDO 確立および DST を施行した。

## 4. 研究成果

(1) 全 20 症例のうち、男性 8 例 (40%)、年齢中央値は 72 歳 (36-83 歳) であった。穿刺針は 19G が 3 例、22G が 13 例、25G が 4 例で、穿刺回数中央値は 3 回であった。採取した組織切片表面の面積中央値は全体で 4.79 mm<sup>2</sup> (0.73-13.83 mm<sup>2</sup>) であり、穿刺針別では 19G 9.06 mm<sup>2</sup>、22G 4.85 mm<sup>2</sup>、25G 1.51 mm<sup>2</sup> であった。また、tumor cellularity は 28.3% (11-74%) であった。EUS-FNB 検体、特に穿刺針径が太いほどより多くの組織を採取できることが判明した (図 1)。

組織切片面積中央値（全体）：4.79 mm<sup>2</sup>  
 tumor cellularity. : 28.3%

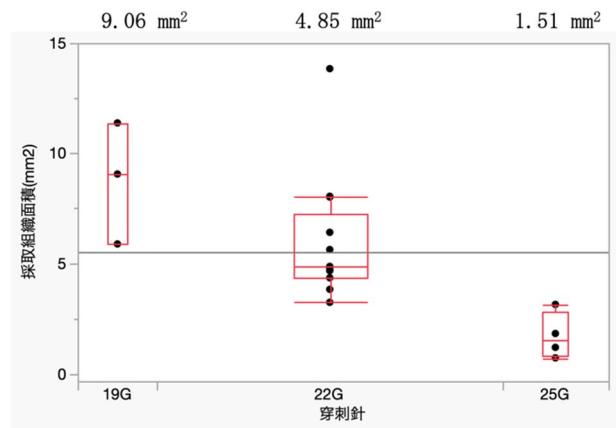


図1 .EUS-TA の採取組織面積と tumor cellularity および穿刺針毎の比較

(2) 手術検体から得られた 5mm 角の腫瘍検体を処理し、ペレットをマトリゲル(MatriMix(511))に懸濁した。さらに、オルガノイド培地(PancreaCult™ O1M)を使用して 37 °C で培養した。以後は 2~3 日ごとに 0.8ml/well のオルガノイド培地(PancreaCult OGM)で培地交換および継代培養を行なった。このマトリゲルを用いた 3 次元培養法の長期維持、培養に成功した。免疫組織化学染色で cytokeratin7(CK7)陽性、CK20 陽性、TP53 陽性を確認し、膵癌細胞由来であることを確認した。

(3) (2)と同様の手順により、EUS-TA 検体におけるマトリゲルを用いた 3 次元培養法による膵癌細胞の長期維持、培養に成功した (図 2 )。

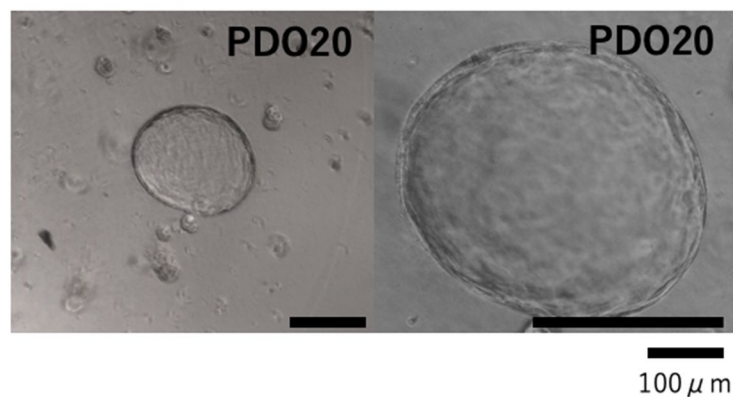


図2 .膵癌 EUS-TA 検体を用いたオルガノイド培養

現在、培養をおこなった PDO に対して臨床で用いられている抗がん剤を中心に DST を開始し、症例集積中である。現時点では膵癌 EUS-TA 検体を用いた少数の DST での評価であり、引き続き研究の継続を要する。今回の研究期間で計画していた全ての実験を終了することができなかったが、今後も実験は引き続き継続し、結果解析および研究結果発表を行なっていきたいと思っている。

本研究を通して、膵癌 EUS-TA 検体を用いた PDO による ex vivo 培養システムが構築された。今後はより短時間で判断可能な DST を開発し、現行の標準化学療法薬や治験中あるいは開発段階中の薬剤を用い、その薬剤感受性を評価していきたいと考えている。さらに次世代シーケンス解析が可能な症例を用いて得られた薬剤耐性遺伝子の候補を選択し、その遺伝子が耐性機序に参与しているかどうかについての検証に加えて、それらのデータを統合し、実臨床における分子病理学的な治療効果との相関を検証していければと考えている。

## 5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計4件（うち査読付論文 4件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 2件）

1. 著者名 Takahashi Kosuke, Ozawa Eisuke, Shimakura Akane, Mori Tomotaka, Miyaaki Hisamitsu, Nakao Kazuhiko	4. 巻 14
2. 論文標題 Recent Advances in Endoscopic Ultrasound for Gallbladder Disease Diagnosis	5. 発行年 2024年
3. 雑誌名 Diagnostics	6. 最初と最後の頁 374 ~ 374
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3390/diagnostics14040374	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 高橋 孝輔、中尾 一彦、小澤 栄介、田島 和昌、福島 真典、今村 一步、松島 肇、足立 智彦、林 洋子、江口 晋	4. 巻 121
2. 論文標題 胆道再建後の胆管炎に対して胆管ステント抜去後に空気塞栓症を発症した1例	5. 発行年 2024年
3. 雑誌名 日本消化器病学会雑誌	6. 最初と最後の頁 144 ~ 153
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.11405/nisshoshi.121.144	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 Mori Tomotaka, Ozawa Eisuke, Shimakura Akane, Takahashi Kosuke, Matsuo Satoshi, Tajima Kazuaki, Nakao Yasuhiko, Fukushima Masanori, Sasaki Ryu, Miura Satoshi, Miyaaki Hisamitsu, Okano Shinji, Nakao Kazuhiko	4. 巻 7
2. 論文標題 Comparison of the novel Franseen needle versus the fine needle aspiration needle in endoscopic ultrasound guided tissue acquisition for cancer gene panel testing: A propensity score matching analysis	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 JGH Open	6. 最初と最後の頁 652 ~ 658
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1002/jgh3.12965	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 Takahashi Kosuke, Yasuda Ichiro, Hayashi Nobuhiko, Iwashita Takuji, Okuno Mitsuru, Mukai Tsuyoshi, Mabuchi Masatoshi, Adachi Seiji, Doi Shinpei, Imura Johji, Ozawa Eisuke, Miyaaki Hisamitsu, Nakao Kazuhiko	4. 巻 97
2. 論文標題 EUS-guided fine-needle biopsy sampling of solid pancreatic tumors with 3 versus 12 to-and-fro movements: a multicenter prospective randomized controlled study	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 Gastrointestinal Endoscopy	6. 最初と最後の頁 1092 ~ 1099
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.gie.2023.01.037	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2件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 1件）

1. 発表者名 森智崇、高橋孝輔
2. 発表標題 がんゲノム医療におけるSonoTip TopGainの有用性の検討
3. 学会等名 日本消化器内視鏡学会九州支部例会
4. 発表年 2022年～2023年

1. 発表者名 Kosuke Takahashi
2. 発表標題 Endoscopic transpapillary gallbladder drainagae for acute cholecystitis: technical recommendations for difficult intubation of the cholecystic duct
3. 学会等名 UEGW2023（国際学会）
4. 発表年 2023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
研究協力者	岡野 慎士  (Okano Shinji)		

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
---------	---------