

令和 3 年 5 月 18 日現在

機関番号：11301

研究種目：基盤研究(B) (一般)

研究期間：2016～2020

課題番号：16H05165

研究課題名(和文) 分子ネットワーク解析による膵臓癌新規分子診断治療標的の同定

研究課題名(英文) Identification of molecular targets by analysis of signaling networks in pancreatic cancer

研究代表者

古川 徹 (Furukawa, Toru)

東北大学・医学系研究科・教授

研究者番号：30282122

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 13,500,000円

研究成果の概要(和文)：本研究は膵臓・膵頭領域癌のオルガノイド培養と網羅的遺伝子解析により、分子標的治療の個別化医療検証システムの構築、新規分子標的の同定を目的とした。膵頭領域癌54例中30例(55.6%)でオルガノイド培養細胞を得た。腫瘍のエクソーム解析から分子標的候補を抽出した。ILK (integrin-linked kinase)変異腫瘍由来オルガノイドでILK阻害剤による増殖抑制とシグナル不活化を確認し、分子標的となりうることを示された。オルガノイド培養と網羅的遺伝子解析の組合せで実際に患者由来検体で分子標的治療の効果を確認できるシステムを構築し、膵臓・膵頭領域癌新規分子治療標的としてILKを同定した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

癌の診療では腫瘍のゲノム解析から個々の癌に適した分子標的を見出し治療することが行われるが、見出した分子標的が実際に患者由来の癌に対し効果を示すか検証できるシステムがなかった。本研究では難治性である膵臓・膵頭領域癌について、癌オルガノイド培養と網羅的遺伝子解析を組み合わせることにより、実際に患者由来検体で分子標的治療の効果を確認できる個別化医療システムを構築した。また、膵臓・膵頭領域癌に対する新規分子治療標的としてILKを同定した。

研究成果の概要(英文)：We aimed to establish a system for identifying and testing genotype-oriented targeted drugs for pancreatobiliary cancers by combining exome sequencing and organoid culture of primary tumors. Tumor cells isolated from resected tumors were subjected to organoid cultures. Exome sequencing was performed on the primary tumors. Genotype-oriented candidate targeted drugs were identified from the exome sequencing and their efficacies were tested in the organoids. Organoid cultures were succeeded in 30 of 54 (55.6%) cases. Exome sequencing revealed a variety of somatic mutations. Some of the aberrations were candidates for targeted therapies. Integrin-linked kinase (ILK) was a novel candidate target, and an ILK inhibitor was confirmed to suppress proliferation of patient-derived organoids. By combining exome sequencing and organoid culture, our model enabled to identify genotype-oriented targets for personalized medicine and to test efficacies of candidate targeted drugs in the organoids.

研究分野：人体病理学、実験病理学、腫瘍学、遺伝学、分子生物学

キーワード：膵臓癌 膵頭領域癌 オルガノイド 全エクソン解析 分子標的 ドライバー分子 インテグリン結合キナーゼ

科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属します。

1. 研究開始当初の背景

膵臓癌(膵癌)は我が国では臓器別癌死亡数で全臓器中第4位であり、年間3万3千人程が罹患し3万人程が死亡している。罹患数と死亡数の対比で明らかなようにその予後は極めて悪く、5年生存率は10%未満である。膵癌の罹患者はここ25年で3倍になっており、今後も罹患者は増え続けるものと予測されていて、効果的な予防法や早期発見を可能にする鋭敏なバイオマーカー、また、早期の外科切除以外に根治を可能にする有効な治療法の確立が喫緊の課題としてあげられている。癌の診断、治療においては癌発生進展の分子機構をふまえた分子標的を指標とした分子診療戦略が有効であることが示されており、膵癌においても早期の発見・診断、効果的な治療を実現する上で有効な分子標的を同定することが必要と考えられる。近年の次世代型シーケンサーを使用した大規模なオミックス解析の結果、多岐にわたる分子に異常が認められ、その全体像が明らかになるにつれ、そのプロファイルは一見複雑で、かつ、腫瘍間、腫瘍内での多様性/ヘテロジェニティーに富んでいる事が示されている。一方で、これらの大規模オミックス解析の結果、膵癌では *KRAS*, *CDKN2A*, *SMAD4*, *TP53* の異常が主体を占め、特に、*KRAS* の機能亢進型変異に加えて下流の mitogen-activated protein kinase (MAPK) 信号伝達経路に属する *RAF*, *MEK* の異常を加えると、ほぼ全ての膵癌に *RAS*-MAPK 経路の活性化が関与している事が改めて明らかにされた。事実、ほとんどの膵癌では活性化型であるリン酸化 ERK の強発現が認められ、*RAS*-*RAF*-*MEK*-*ERK* により構成される *RAS*-MAPK 信号伝達経路が恒常的に活性化しているとみなされる。リン酸化 ERK は核内に移行して転写因子を修飾し、遺伝子発現を促すが、代表者はこれまでの研究で膵癌においては変異 *KRAS* を含む上流からの活性化信号に ERK 特異的脱リン酸化酵素である *DUSP6* の不活性化が相まることで ERK のリン酸化が維持されている事を示し、また、リン酸化 ERK により誘導される遺伝子群を、ERK のリン酸化を on, off した時の発現プロファイルと比較することで網羅的に同定した(Oncogene 25:4831-9, 2006)。さらに、ERK 下流遺伝子群は膵癌の悪性形質を直接的に担う分子群と考えられるのでこれらを対象に RNA 干渉によるノックダウンスクリーニングを行い、治療標的として有用な分子を明らかにした(Mol Cancer 11:88, 2012)。SON は治療標的として同定された分子の一つであり、それを標的とした核酸薬を膵臓がん治療様の組成物として特許取得し、開発を進めている(特許第5574258号、US 20150072877)。悪性形質の発現を直接担う ERK 誘導遺伝子群を標的とする事は悪性形質発現を特異的に直接抑制し、かつ、リダンダントな分子が少ない事から耐性が生じにくく、確実な効果を得る事が可能となる。

オミックス解析の結果が示す、膵癌における複数の信号伝達経路の活性化は、*RAS*-MAPK が主体となりながら複数の信号伝達経路とクロストークしながら複雑な分子ネットワークを形成している事を示唆し、エフェクター分子が MAPK 下流のみに限定されない可能性を示している。また、分子ネットワークの形成は分子標的治療薬がしばしば不応性、耐性となる場合に見られる、信号伝達経路のリダンダントな活性化の機序となっており、分子ネットワークの解明がより確実な分子標的治療法開発に必須かつ重要な情報を与える。さらには、腫瘍の分子異常プロファイルが多様でヘテロジェニティーに富んでいる事は分子ネットワークが多くのリダンダントな経路を生じながらエフェクターを機能させていることを示唆し、悪性形質発現の実行にあたる分子を抑制する事が多様なプロファイルを持つ腫瘍についても有効と考えられる。

2. 研究の目的

膵臓・膵頭領域癌に有効な新規分子診断治療標的を同定するため、切除組織より生体内に近い in vivo での3次元培養細胞モデルであるオルガノイド培養細胞を樹立し、同時に腫瘍における網羅的分子プロファイリングとしてのエクソーム解析を行い、ドライバー遺伝子変異を同定して分子診療標的候補を見出す。患者由来オルガノイド培養細胞にてドライバー遺伝子変異を確認後、見出した分子診療標的候補に対する特異的阻害剤をオルガノイド培養細胞に作用させ、その効果を分子シグナルネットワーク解析を含む分子病理学的及び細胞生物学的解析から明らかにする。これらから実際の患者由来オルガノイド培養細胞を使用した個別化診療分子標的として有効な膵臓・膵頭領域癌新規エフェクター分子を明らかにする。

3. 研究の方法

対象

2016-2020年に東京女子医科大学病院、東北大学病院において外科的に切除された膵臓・膵頭領域癌54例を対象とした。本研究は東京女子医科大学、東北大学倫理委員会にて審査され承認されて行った。全ての対象患者からインフォームドコンセントを得た。

オルガノイド培養

切除組織からオルガノイド培養を行った。切除後直ちに腫瘍部を採取し基礎培地に入れて洗浄後細切、酵素処理し、洗浄後に Basement Membrane Extract (BME) と混合して培養皿に滴下し固化後、B27、acetylcysteine、N2、Gastrin、Noggin、EGF、FGF10、Wnt3a 培養上清、RSP0 培養上清、Y-27632、PGE-2、dexamethasone を添加した DMEM/F12 培地で培養した。継代は TryPLE で処理後ピペットチップで細分し行った。

エクソーム解析

切除腫瘍の凍結組織から腫瘍部と正常部を確認して各々採取し、DNA を抽出してエクソーム解析を行った。Sureselect V6 によりエクソン部分を濃縮後、Novaseq 6000 にてシーケンスを行った。データ解析は BWA-MEM0.1.17、GATK4.1.1、SnpEFF4.3t-GENCODE29 を使用した。エクソーム解析データからドライバー遺伝子変異を同定し、分子標的候補とした。検出されたドライバー変異についてはサンガーシーケンス法により腫瘍、オルガノイドで確認した。

病理組織学的解析

オルガノイド培養細胞は iPGelI に封入して 4%paraformaldehyde で固定後パラフィン包埋して組織切片とした。腫瘍組織はホルマリン固定パラフィン包埋し組織切片を作成した。各種抗体を用い免疫組織化学法によりタンパク質発現を検索した。

免疫プロット

オルガノイド培養細胞からタンパク質を抽出し、ウェスタンブロット法によりタンパク質、リン酸化タンパク質の発現を検索した。

分子標的実験

エクソーム解析により同定・確認された分子標的候補阻害剤をオルガノイド培養細胞に作用させ、分子シグナル発現動体、増殖抑制効果を解析する。

4. 研究成果

オルガノイド培養細胞の樹立

膵臓・膵頭領域癌切除組織からオルガノイド培養を行った。オルガノイド培養細胞の樹立には報告されていた方法を種々改変することが必要で、また、初期培養ではオルガノイドには単層の嚢胞状構造を示す balloon like organoid と塊状の solid organoid があり、前者は遺伝子変異を持たない正常細胞由来であり、後者は遺伝子変異を有する癌由来オルガノイドであることを見出し、後者を選択継代することで癌由来オルガノイドを効率よく得られた。結果として、対象とした膵臓・膵頭部領域癌 54 例中 30 例 (56%) からオルガノイド培養細胞を樹立することができた。この樹立率は膵臓・膵頭領域癌由来オルガノイドとしては高いが、樹立率 70%以上を示す大腸、乳腺、肺、肝臓癌と比較しては低率であった。その要因としては膵臓・膵頭領域癌は線維化が強く、癌細胞が比較的疎であることが考えられた。

エクソーム解析

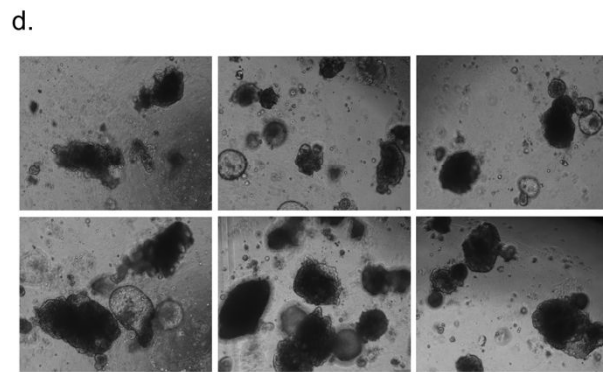
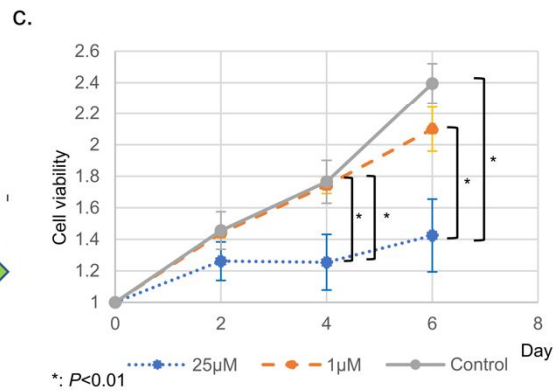
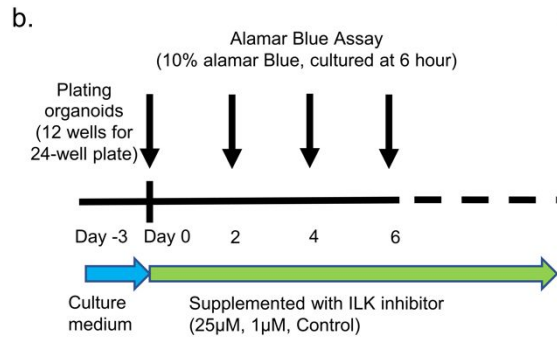
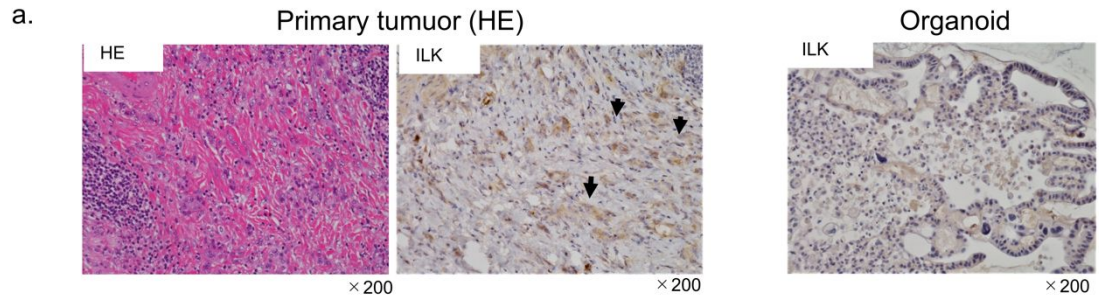
エクソーム解析を 6 例について行った。エクソーム解析では平均して 65.5 個の体細胞性変異が認められ、変異シグネチャー 1、2、3、5、9 を含む複合変異シグネチャーを呈していた。変異遺伝子は各種分子シグナルネットワーク、すなわち、RAS、TGF- β 、FGF、Wnt、integrin、p53 associated、apoptotic pathway、PDGF、Toll receptor、DNA replication 他に關与するものが検出された。

オルガノイド培養細胞の分子病理学的性質

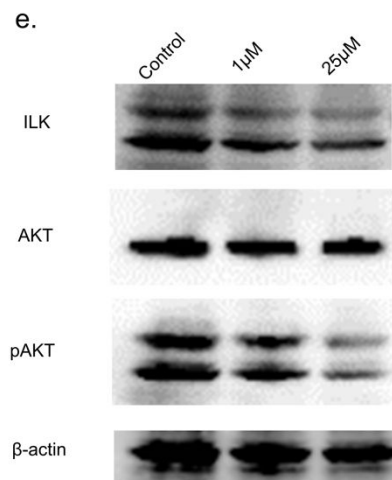
オルガノイド培養細胞と腫瘍組織の遺伝子変異、分子発現を比較した。オルガノイドは複雑な癒合した管腔構造よりなり、粘液を分泌していた。腫瘍組織に見られる遺伝子変異は保存され、シグナル分子の発現は類似していて、腫瘍組織細胞の性質をよく反映していた。

新規分子治療標的候補の同定

エクソーム解析から分子ネットワークに關連するドライバー遺伝子を見出し、分子標的治療候補を得た。ILK は integrin-linked kinase をコードする遺伝子であり、腫瘍細胞で L382P 変異を来していた。ILK は PI3K 信号伝達経路の主要なエフェクターである mTOR、AKT を活性化する分子であり、見出された変異は活性化変異と予測された。よって、変異 ILK は治療標的となると想定され、ILK 阻害剤である QLT0267 の効果をその変異を持つ腫瘍由来オルガノイド培養細胞で検証した。ILK 阻害剤によりオルガノイドの増殖は有意に抑制され、この腫瘍にたいし、ILK 阻害剤が治療薬候補となることが明らかとなった (図)。



Control Day 0	1 μM Day 0	25 μM Day 0
Control Day 6	1 μM Day 6	25 μM Day 6



- a. 腫瘍組織とオルガノイドにおける ILK 発現。 b. 阻害薬投与方法。 c. オルガノイドの増殖は 25 μM の ILK 阻害剤 QLT0267 で有意に抑制された。 d. オルガノイドの像。 e. ILK 阻害剤によりリン酸化 AKT の発現が抑制された。 Shiihara et al. European Journal of Cancer 148:239-250, 2021 より許可引用。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計5件（うち査読付論文 2件 / うち国際共著 0件 / うちオープンアクセス 0件）

1. 著者名 Shiihara Masahiro, Ishikawa Tomohiko, Saiki Yuriko, Omori Yuko, Hirose Katsuya, Fukushige Shinichi, Ikari Naoki, Higuchi Ryota, Yamamoto Masakazu, Morikawa Takanori, Nakagawa Kei, Hayashi Hiroki, Mizuma Masamichi, Ohtsuka Hideo, Motoi Fuyuhiko, Unno Michiaki, Okamura Yasunobu, Kinoshita Kengo, Furukawa Toru	4. 巻 148
2. 論文標題 Development of a system combining comprehensive genotyping and organoid cultures for identifying and testing genotype-oriented personalised medicine for pancreatobiliary cancers.	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 European Journal of Cancer	6. 最初と最後の頁 239-250
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.ejca.2021.01.047	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 Kobayashi Toshikazu, Omori Yuko, Ono Yusuke, Karasaki Hidenori, Mizukami Yusuke, Makino Naohiko, Motoi Fuyuhiko, Unno Michiaki, Ueno Yoshiyuki, Furukawa Toru	4. 巻 -
2. 論文標題 Pathways for the development of multiple epithelial types of intraductal papillary mucinous neoplasm of the pancreas.	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Journal of Gastroenterology	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1007/s00535-021-01783-2	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 古川徹	4. 巻 79
2. 論文標題 膵癌のゲノム異常	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 肝胆膵	6. 最初と最後の頁 1117-1123
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） なし	査読の有無 無
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 古川徹	4. 巻 78
2. 論文標題 膵癌・胆道癌におけるprecision medicineの現況	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 肝胆膵	6. 最初と最後の頁 759-763
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） なし	査読の有無 無
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 古川徹	4. 巻 40
2. 論文標題 日本人の膵癌におけるゲノム解析	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 胆と膵	6. 最初と最後の頁 287-290
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) なし	査読の有無 無
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20件 (うち招待講演 11件 / うち国際学会 7件)

1. 発表者名 椎原正尋、石川智彦、碓直樹、樋口亮太、元井冬彦、山本雅一、海野 倫明、古川徹
2. 発表標題 Organoid培養と遺伝子解析を用いた膵胆道癌の個別化医療モデルの確立
3. 学会等名 第109回日本病理学会総会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 小林敏一、大森優子、小野裕介、水上裕輔、牧野直彦、元井冬彦、海野倫明、上野義之、古川徹
2. 発表標題 IPMN組織型における遺伝子異常についての相互関係の分子病理学的解析
3. 学会等名 第109回日本病理学会総会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 古川徹
2. 発表標題 胆膵領域における炎症と発癌
3. 学会等名 第28回日本消化器関連学会 (招待講演)
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 小林敏一、古川徹、上野義之
2. 発表標題 IPMN subtype における遺伝子異常についての相互関係の分子病理学的解析
3. 学会等名 第107回日本消化器病学会総会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 古川徹
2. 発表標題 胆膵領域における炎症と発癌
3. 学会等名 第28回日本消化器関連学会（招待講演）
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 椎原正尋、石川智彦、碓直樹、樋口亮太、元井冬彦、山本雅一、海野 倫明、古川徹
2. 発表標題 Organoid培養と遺伝子解析を用いた膵胆道癌の個別化医療モデルの確立
3. 学会等名 第109回日本病理学会総会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 小林敏一、大森優子、小野裕介、水上裕輔、牧野直彦、元井冬彦、海野倫明、上野義之、古川徹
2. 発表標題 IPMN組織亜型における遺伝子異常についての相互関係の分子病理学的解析
3. 学会等名 第109回日本病理学会総会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 Shiihara M, Ishikawa T, Ikari N, Higuchi R, Yazawa T, Uemura S, Izumo W, Yamamoto M, Motoi F, Morikawa T, Nakagawa K, Hayashi H, Mizuma M, Otsuka H, Ishida M, Masuda K, Kawaguchi K, Ariake K, Takadate T, Iseki M, Hata T, Unno M, Furukawa T.
2. 発表標題 Development of a system combining comprehensive genotyping and organoid cultures for identifying and testing genotype oriented personalized medicine for pancreaticobiliary cancers.
3. 学会等名 50th Anniversary Meeting of American Pancreatic Association and Japan Pancreas Society (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Furukawa T.
2. 発表標題 Variations in IPMN and their clinicopathological relevance.
3. 学会等名 2019 Meeting of the International Association of Pancreatology (招待講演) (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 古川徹
2. 発表標題 膵腫瘍のゲノム解析とゲノム医療
3. 学会等名 北信オンコロジーセミナー (招待講演)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 古川徹
2. 発表標題 膵臓腫瘍の発生進展機構の解明
3. 学会等名 第108回日本病理学会総会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 古川徹
2. 発表標題 膵臓腫瘍の発生進展機構の解明
3. 学会等名 第29回日本消化器癌発生学会総会 (招待講演)
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 Furukawa T.
2. 発表標題 Targeting MAPK/ERK and Its Downstream in Pancreatic Cancer.
3. 学会等名 4th ARO-Japan and TSPA/TCTC-Taiwan Workshop (招待講演) (国際学会)
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 Furukawa T.
2. 発表標題 Pathobiology of intraductal neoplasms of the pancreas.
3. 学会等名 Pancreas2018 (Baltimore) (招待講演) (国際学会)
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 Hirose K, Furukawa T
2. 発表標題 Clinicopathological relevance of SMAD4 and RUNX3 in pancreatic cancer.
3. 学会等名 Pancreas2018 (Baltimore) (国際学会)
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 古川徹
2. 発表標題 膵腫瘍のゲノム解析
3. 学会等名 第49回日本膵臓学会大会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 古川徹
2. 発表標題 早期膵癌の定義と分子基盤について
3. 学会等名 第56回日本癌治療学会学術集会（招待講演）
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 Furukawa Toru
2. 発表標題 Signaling aberrations and their implications in pancreatic cancer.
3. 学会等名 2017 Asan Pancreatic Cancer Symposium（招待講演）（国際学会）
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 古川 徹
2. 発表標題 Molecular pathology of intraductal papillary mucinous neoplasms of the pancreas.
3. 学会等名 第48回日本膵臓学会大会（招待講演）
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 Furukawa T.
2. 発表標題 Subtype classification of IPMN and its impact on patient care.
3. 学会等名 American Pancreatic Association Pre-Meeting “ IPMN: Beyond Guidelines and Treatment.” (招待講演) (国際学会)
4. 発表年 2016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	樋口 亮太 (Higuchi Ryota) (20318059)	東京女子医科大学・医学部・講師 (32653)	

	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	椎原 正尋 (Shiihara Masahiro)		
研究 協力者	小林 敏一 (Kobayashi Toshikazu)		

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