

令和 2 年 9 月 8 日現在

機関番号：82504

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2017～2019

課題番号：17K08755

研究課題名(和文) 膵液由来オルガノイドを用いた膵管内粘液性腫瘍(IPMN)診断の統合的研究

研究課題名(英文) Integrative research on IPMN using organoids obtained from patients' pancreatic juice.

研究代表者

山口 武人(Taketo, Yamaguchi)

千葉県がんセンター(研究所)・消化器内科・病院長

研究者番号：00241969

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,600,000円

研究成果の概要(和文)：膵臓の前がん病変である膵管内乳頭粘液性腫瘍(IPMN)に対し、革新的IPMN診断法の開発を目指した。粘性の高い膵液検体から上皮細胞を効率的に回収する手法を開発し、15例についてオルガノイド培養に成功した。Mucin免疫染色では細胞診での染色パターンと一致するケースが多かったが、一部で異なるサブタイプへの転換が認められた。ヌードマウス皮下への移植では一部の症例が生着し、がん化したIPMNであると結論した。ゲノム解析ではIPMNにおいて頻度の高いKRASやGNASの変異陽性率が培養中に低下する現象を見出し、IPMN細胞が排除される可能性が示唆されたため、培養条件の最適化を継続している。

研究成果の学術的意義や社会的意義

膵管内乳頭粘液性腫瘍(IPMN)はその病態や悪性化機構などにおいて不明な点が多く、また細胞診や画像による診断の質にも改善が必要な状態である。しかし、これまで培養成功の報告はなく、詳細な解析の障害となっていた。本研究では経口膵管鏡の開発に関与した代表研究者と、正常オルガノイドの*in vitro*発がん系を開発した分担研究者の両者が、それぞれ高い優位性を有する技術を組み合わせることで、膵液のオルガノイド培養に取り組み成功したものである。培養条件の最適化が必要ではあるものの、IPMNとして矛盾しない細胞が培養されており、新規の診断法や治療法の開発に向けた貴重な第一歩となったものと考えられる。

研究成果の概要(英文)：We aimed to develop an innovative method to diagnose intraductal papillary mucous tumor (IPMN), a precancerous lesion of the pancreas. We developed an efficient method for recovering epithelial cells from highly viscous pancreatic fluid specimens and successfully cultured 15 organoids. Mucin immunostaining often matched the staining pattern on cytology, but conversion to different subtypes was observed in some cases. Subcutaneous transplantation of organoids into nude mice resulted in formation of xenograft tumors in some cases, suggestive of malignant transformation. Genome analysis showed that the mutation rate of KRAS and GNAS, which are frequent in IPMNs, decreased during culture, suggesting that IPMN cells may be eliminated in the current standard culture condition, and we thereby continue to optimize the culture conditions to enrich IPMN cells in organoids.

研究分野：消化器内科学

キーワード：膵臓 粘液性腫瘍 オルガノイド

1. 研究開始当初の背景

IPMN (intraductal papillary mucinous neoplasm)は、本邦で最初に報告された粘液産生膵癌を契機として注目を集めた疾患概念である。膵癌の前癌病変として知られ、粘液の貯留による著明な膵管拡張が特徴的な乳頭状の増殖病変である。様々な程度の異型を示すがその病態には不明な点が多い。最近ゲノム解析の進展により、既知だった KRAS 活性化変異に加えて GNAS 活性化変異も高頻度に見られることが報告され注目を集めている。さらに、膵臓特異的に KRAS と GNAS の二重変異を導入したマウスにおいて IPMN 類似の病変が再現されたことから、IPMN の発症への両遺伝子変異の協調的作用は確定的と考えられている。

一方、IPMN は胃型 (約 80%) では悪性化率は 20%程度で通常の膵管がんの併存率が数%程度であるのに対し、腸型 (約 20%) では悪性化率が 80%程度に上るなど、サブタイプにより大きく性質が異なる。しかし、その背景にある遺伝子異常や発がんに至る分子機構も不明だった。画像診断上 IPMN 腫瘍の増大傾向から悪性化を疑い外科手術に踏みきった場合でも、半数の症例では病理学的には悪性の所見が見られないなど、病気の進展を適切に診断することは容易ではない。逆に、胃型に関しては悪性化率が低いことから、医療経済学的観点から定期検診を推奨しないとする考え方もある。このように、現状では治療介入の時期の決定や経過観察期間の設定の根拠となる知見に乏しく、IPMN からがんへの進展に関する正確な病勢把握を可能にする手法が求められていた。

2. 研究の目的

研究代表者(山口)は経口膵管鏡の開発に携わり膵臓疾患の精密な内視鏡検査に道を開いた実績を有する。IPMN の診断における膵管鏡下細胞診の有用性を報告してきたが、細胞診では得られる細胞数が少数のために診断が不正確になる場合があることや、一見異型性が低くてもその後短期間で悪性化する症例などに対して、形態学的な指標以外の観点から病気の進展の正確な把握や予測が技術的に困難なことなどが、従来課題としてあげられていた。IPMN 細胞の培養成功例はこれまで報告がなかったが、研究分担者(筆宝)がオルガノイドを用いた発がんモデルの確立に実績を有し、研究分担者(喜多)が IPMN や膵癌患者に対する膵管鏡施行時に得られた膵液からのオルガノイド培養が可能であることを予備検討で見出していた。通常の細胞診に加えてオルガノイドを用いた診断を行うことで IPMN のより正確な病態把握が可能となるか検討することを本研究の目的とした。

3. 研究の方法

(1)患者

千葉県がんセンター病院において、経過観察中に悪性化が疑われ外科的切除を予定している IPMN 患者のうち、内視鏡(側視鏡あるいは経口膵管鏡)下に膵液採取を行う症例で同意の得られた症例を対象として、膵液余剰検体または手術検体に対して培養を行った。機関内倫理審査委員会の承認を得て本研究を実施した。また、全例で膵液細胞診を施行していたため、オルガノイド培養の結果と比較した。

(2) 3次元オルガノイド培養

IPMN 症例では膵液中に大量の粘液が存在し、そのままでは培養が困難である。そこで、プロナーゼ短時間処理および大量の PBS による激しいピペッティング処理を行い、ある程度分散させたのちに固化させたマトリゲル上に播種して接着させ翌日から 3次元培養を行った。培養および継代にはマウス腸管細胞に用いた条件に準拠した。手術病変に対しては嚢胞性病変の組織片および穿刺内腔液から同様に培養を行った。

(3)ゲノム DNA 解析

次世代ターゲット解析 (Ion Torrent)と頻度の高い KRAS 変異を multiplex で検出する digital droplet PCR(Bio-rad)を用いて変異解析を行った。また、GNAS 変異については通常の Sanger sequencing で解析を行った。検体としては膵液、培養後の膵液由来オルガノイド、一部は手術検体を用いた。

(4)膵液由来オルガノイドの評価

膵液由来オルガノイドに対して、ホルマリン固定したのちにパラフィンブロックを作成した上で薄切し、通常の H&E 染色や各種免疫染色等を行った。また、 5×10^5 個程度の細胞を 50%マトリ

ゲルに懸濁してヌードマウス皮下に接種し、6-8週間後に解剖して腫瘍形成能を検討した。

4. 研究成果

(1) 膵液検体のオルガノイド培養

IPMN 症例において、膵管鏡で採取した粘液の含有率の高い膵液検体はそのままでは培養が困難である。そこで、物理的裁断および酵素処理により細胞障害を最小にとどめながら粘液を除去する手法を開発した。同時に術者が一連の検体処理過程に習熟することで安定的な3次元培養が実施可能となった。具体的には、マトリゲルをあらかじめ固化した上に細かく裁断した粘液と細胞の混合物を播種することで、一晩静置するあいだにマトリゲルに生着する増殖能を有する細胞の絶対数の確保がある程度見込め、翌日にマトリゲルを重層してオルガノイド3次元培養を開始した。一旦増殖が可能になったオルガノイドに関しては長期培養、凍結、解凍など、通常の細胞株と同様の処理が可能となった。これらの技術的な進歩により、累積で合計15例についてオルガノイド培養に成功した。この結果は外科手術により切除されたIPMNおよび嚢胞の内腔液から培養を試みた際には全例で翌日に生存細胞が皆無で培養が不成功だったことと極めて対照的であり、膵管鏡で膵液を採取することの優位性を示すものと考えられる。実際、膵管鏡の施行中には強く吸引しながら乳頭状増殖を示す病変を物理的に剪断しながら採取することが可能であり、単に膵管内に脱落した上皮を回収した場合と比較して、増殖能の高い生細胞を得ることができた可能性が高いと考えられた。

(2) 粘液形質に基づくオルガノイドの分類

オルガノイドに対してHE染色を行ったところ、単層の正常上皮も一部含まれたが、多くは乳頭状増殖や軽度の異型を示し、また一部では悪性の所見である篩状の構造も認められたことから、IPMNとして矛盾しないものと判断した。次いでPAS染色を行ったところ全例で強陽性となり、粘液の分泌が確認された。そこで、より詳細にMucinの免疫染色を行った。MUC5ACは正常膵管では発現陰性で、典型的にはIPMNで陽性となることからIPMNの簡便なマーカーとして利用可能である。予想通り、オルガノイドでは全例においてMUC5ACは陽性の細胞を認めたがその含有率は20-80%(平均40%)だった。切除標本でも同様に15例全例でMUC5AC陽性だったが、陽性細胞の含有率はほぼ80%程度で一定しており、培養環境中ではIPMNとしての特徴であるマーカーの発現が減弱していると考えられた。またMUC5ACは胃型形質のマーカーでもあるが、腸型形質のマーカーとしてはMCU2が汎用される。MCU2に関しては、手術検体では6例陽性でその含有率は10-80%(平均40%)だったのに対し、オルガノイドでは10例で陽性だったがその含有率は5-50%(平均25%)だった。ただし、両者で共に陽性だったのは4症例にとどまり、大多数ではin vivoとin vitroで乖離する結果となった。このように、培養環境においては一部で異なるサブタイプに転換している場合も認められたが、腫瘍内のheterogeneityを反映して増殖しやすいクローンが選択されたのか、あるいは培養環境下で誘導される分化の両面の可能性があると考えているが、その解明は今後の課題である。

(3) 遺伝子異常に基づくオルガノイドの評価

培養したオルガノイドについてIPMNにおいて頻度の高い変異であるKRASやGNASについてデジタルPCRや次世代シーケンサーによるパネル検査で解析を進めた。想定されるよりも変異陽性率が低かったため、培養開始前の膵液検体が入手可能な症例については、これらについても併せて変異検索を行った。その結果、オルガノイド培養中にこれらの変異陽性細胞の率が低下する場合が少なくないことを見出した。こうした現象はこれまでもヒト肺がんオルガノイドやマウス膵癌オルガノイドにおいて報告されており、生体内では増殖優位性を有するはずの変異が培養環境下では逆に不利になる現象として、実験系特有の特性である可能性がある。培養液中の因子の組成を組み替えることでKRASおよびGNAS変異細胞の濃縮が可能か現在検討を進めている。また、すべてのオルガノイドについてヌードマウス皮下へ移植したところ2例については主に嚢胞性で一部充実性の病変として生着し、組織学的にも異型を認められたことからこれらについてはがん化したIPMN(IPMC)であると結論した。Mucin染色パターンはオルガノイドと一致していたことから、オルガノイドの性質を保持したままゼノグラフトを形成したのと考えられた。

(4) 考察

これまでにIPMNの培養に成功したとする報告は皆無である。本研究では膵液のオルガノイド培養を行うことでIPMN患者由来のオルガノイドの培養に成功した。粘液形質や組織学的所見からはIPMNとして矛盾しないが、その性質も手術検体とは乖離がある場合もあり、またIPMNに高頻

度で認められる変異もオルガノイド培養中に排除される傾向があるなど、予期せぬ所見も見出し
ている。今後、培養条件の最適化を行う必要があるが、本研究を契機として IPMN 研究が次のス
テージに進むことが期待されると考えている。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計5件（うち査読付論文 5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 Tsujimoto Akiko, Sudo Kentaro, Nakamura Kazuyoshi, Kita Emiri, Hara Ryusuke, Takayama Wataru, Ishii Hiroshi, Yamaguchi Taketo	4. 巻 9
2. 論文標題 Gencitabine plus nab-paclitaxel for locally advanced or borderline resectable pancreatic cancer	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Scientific Reports	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） doi: 10.1038/s41598-019-52486-x	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 Naruse Mie, Masui Ryoichi, Ochiai Masako, Maru Yoshiaki, Hippo Yoshitaka, Imai Toshio	4. 巻 -
2. 論文標題 An organoid-based carcinogenesis model induced by in vitro chemical treatment	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Carcinogenesis	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） doi: 10.1093/carcin/bgaa011	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 Matsuura Tetsuya, Maru Yoshiaki, Izumiya Masashi, Hoshi Daisuke, Kato Shingo, Ochiai Masako, Hori Mika, Yamamoto Shogo, Tatsuno Kenji, Imai Toshio, Aburatani Hiroyuki, Nakajima Atsushi, Hippo Yoshitaka	4. 巻 4
2. 論文標題 Organoid-based ex vivo reconstitution of Kras-driven pancreatic ductal carcinogenesis	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Carcinogenesis	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） doi: 10.1093/carcin/bgz122	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 Maru Yoshiaki, Onuma Kunishige, Ochiai Masako, Imai Toshio, Hippo Yoshitaka	4. 巻 110
2. 論文標題 Shortcuts to intestinal carcinogenesis by genetic engineering in organoids	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Cancer Science	6. 最初と最後の頁 858 ~ 866
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1111/cas.13938	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 Ochiai Masako, Yoshihara Yasunori, Maru Yoshiaki, Matsuura Tetsuya, Izumiya Masashi, Imai Toshio, Hippo Yoshitaka	4. 巻 印刷中
2. 論文標題 Kras-driven heterotopic tumor development from hepatobiliary organoids	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Carcinogenesis	6. 最初と最後の頁 印刷中
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1093/carcin/bgz024	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11件 (うち招待講演 0件 / うち国際学会 2件)

1. 発表者名 星大輔、喜多絵美里、丸喜明、筆宝義隆
2. 発表標題 膵腺房細胞癌のオルガノイド培養
3. 学会等名 第78回日本癌学会学術総会
4. 発表年 2019年～2020年

1. 発表者名 Emiri Kita, Yoshitaka Hippo, Taketo Yamaguchi
2. 発表標題 Development of new organoid model in patients with advanced biliary cancer
3. 学会等名 第27回日本消化器関連学会週間
4. 発表年 2019年～2020年

1. 発表者名 喜多絵美里、筆宝義隆、山口武人
2. 発表標題 膵・胆道癌における胆汁検体を用いたオルガノイド培養法の樹立
3. 学会等名 第105回日本消化器病学会総会
4. 発表年 2019年～2020年

1. 発表者名 喜多給美里、山口武人
2. 発表標題 切除不能胆膵癌における胆汁検体を用いた新規オルガノイド培養法の樹立
3. 学会等名 第97日本消化内視鏡学会総会
4. 発表年 2019年～2020年

1. 発表者名 喜多給美里、筆宝義隆、辻本彰子、須藤研太郎、中村和貴、石井浩、山口武人、高山亘
2. 発表標題 3次元オルガノイド培養法を用いた膵液検体由来IPMNモデルの樹立
3. 学会等名 第50回日本膵臓学会大会
4. 発表年 2019年～2020年

1. 発表者名 Emiri Kita, Kentaro Sudo, Taro Hara, Yoshiaki Maru, Taketo Yamaguchi, Yoshitaka Hippo
2. 発表標題 Per-oral pancreatoscopy provides novel technology -New methods for 3D culture of human-derived IPMN cells-
3. 学会等名 Digestive Disease Week (国際学会)
4. 発表年 2018年～2019年

1. 発表者名 Emiri Kita, Yoshitaka Hippo, Yoshiaki Maru, Taketo Yamaguchi, Kazuyoshi Nakamura
2. 発表標題 New approach for organoid culture in patients with advanced biliary tumor
3. 学会等名 Digestive Disease Week (国際学会)
4. 発表年 2018年～2019年

1. 発表者名 喜多 絵美里
2. 発表標題 組織亜型からみたIPMN術後再発に関する検討
3. 学会等名 JDDW2017 (第25回日本消化器関連学会週間)
4. 発表年 2017年～2018年

1. 発表者名 喜多 絵美里
2. 発表標題 IPMNにおける経口膵管鏡 : SpyGlassDSの有用性に関する検討
3. 学会等名 JDDW2017 (第25回日本消化器関連学会週間)
4. 発表年 2017年～2018年

1. 発表者名 喜多 絵美里
2. 発表標題 IPMN国際診療ガイドラインにおける課題と正診率向上への取り組み - "Worrisome features" の手術適応における組織亜型の有用性 -
3. 学会等名 第103回日本消化器病学会総会
4. 発表年 2017年～2018年

1. 発表者名 喜多 絵美里
2. 発表標題 組織亜型からみたIPMN術後再発の検討
3. 学会等名 第48回日本膵臓学会大会
4. 発表年 2017年～2018年

〔図書〕 計3件

1. 著者名 佐々木 博己編（筆宝義隆 分担執筆）	4. 発行年 2019年
2. 出版社 羊土社	5. 総ページ数 294
3. 書名 患者由来がんモデルを用いたがん研究実践ガイド	

1. 著者名 清宮 啓之編（筆宝義隆 分担執筆）	4. 発行年 2019年
2. 出版社 化学同人	5. 総ページ数 344
3. 書名 進化するがん創薬	

1. 著者名 喜多 絵美里	4. 発行年 2017年
2. 出版社 東京医学社	5. 総ページ数 120
3. 書名 消化器内視鏡29(5)	

〔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	喜多 絵美里 (Kita Emiri) (20773980)	千葉県がんセンター(研究所)・消化器内科・医長 (82504)	

6. 研究組織（つづき）

	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	筆宝 義隆 (Hippo Yoshitaka) (30359632)	千葉県がんセンター（研究所）・発がん制御研究部・部長 (82504)	
研究分担者	丸 喜明 (Maru Yoshiaki) (30742754)	千葉県がんセンター（研究所）・発がん研究グループ 発がん制御研究部・研究員 (82504)	