

令和 6 年 5 月 28 日現在

機関番号：14501

研究種目：研究活動スタート支援

研究期間：2022～2023

課題番号：22K20920

研究課題名（和文）患者由来オルガノイドを用いた早期膵癌のバイオマーカー探索

研究課題名（英文）Biomarker Search for Early Stage Pancreatic Cancer Using Patient-Derived Organoids

研究代表者

辻前 正弘（Tsujimae, Masahiro）

神戸大学・医学部附属病院・医員

研究者番号：70961712

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）：早期膵癌と呼ばれる膵癌の超早期の病変を含む膵癌患者より複数のヒト由来の3次元培養細胞株（オルガノイド）を樹立した。樹立されたオルガノイドは早期膵がんをよく模倣し、膵癌の超早期診断における生物学的な特徴を全ゲノム解析、トランスクリプトーム解析により推察することが可能であった。さらに早期膵癌由来オルガノイドを用いて、癌より分泌される細胞外小胞を回収し、細胞外小胞に含まれているタンパク質やmicroRNAから、早期膵がんのバイオマーカーとして利用可能な候補を抽出することに成功した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

膵癌は正常膵管上皮から軽度異型膵上皮内腫瘍性病変、高度異型膵上皮内腫瘍性病変（早期膵癌）を経て、浸潤性膵管癌に段階的に癌化すると考えられている。膵癌の予後改善には早期診断・早期治療が必須であるが、その早期診断率は極めて低く、早期膵癌検体の希少性自体が病態解明の大きな制約となってきた。我々が樹立成功した早期膵癌オルガノイドはヒトの膵癌の超早期病変のアバターとして使用することが可能であり、膵癌発生の病態解明における障壁であったサンプルの希少性を克服するものであった。今後、早期膵がんオルガノイドを用いた研究を展開することで、早期発見のバイオマーカーや膵癌発生の病態解明が進むことが期待される。

研究成果の概要（英文）：We established multiple human-derived 3D cultured cell lines (organoids) from very early-stage lesions of pancreatic cancer, known as early-stage pancreatic cancer. The established organoids mimic early-stage pancreatic cancer well, and the biological characteristics of the very early-stage lesions of pancreatic cancer were inferred through whole-genome and transcriptome analyses. Furthermore, using organoids derived from early-stage pancreatic cancer, we were able to collect extracellular vesicles secreted from the cancer cells and extract potential candidates as biomarkers for early-stage pancreatic cancer from the proteins and microRNAs contained within the extracellular vesicles.

研究分野：消化器内科学

キーワード：早期膵癌 オルガノイド 細胞外小胞 膵癌 PanIN

1. 研究開始当初の背景

膵癌はすべての癌種の中で最も予後が悪く、早期発見が困難である。そのような膵癌であっても、膵管上皮内に留まる膵上皮内癌(早期膵癌)の内に発見することができれば予後の改善が見込まれる。しかし、早期膵癌の病態解明は不十分であり、血液のみならず腫瘍の蛋白発現レベルにおいても前癌病変、早期膵癌、浸潤癌を区別する有用なバイオマーカーは同定されていない。早期膵癌のバイオマーカー検索において、膵癌を早期に診断できる症例が限られており、早期膵癌の臨床検体は非常に希少で入手が困難である事自体が研究の主な障壁であった。本研究においては、申請者が臨床検体から樹立に成功した早期膵癌の患者由来オルガノイドを含む、膵癌の各段階の患者由来オルガノイドを用いて、ヒト早期膵癌の病態解明とバイオマーカー探索を行う。

2. 研究の目的

本研究の目的は、早期膵癌患者由来オルガノイドを用いて早期膵癌の病態解明を行い、膵癌早期発見のためのバイオマーカー検索を行う事である。

3. 研究の方法

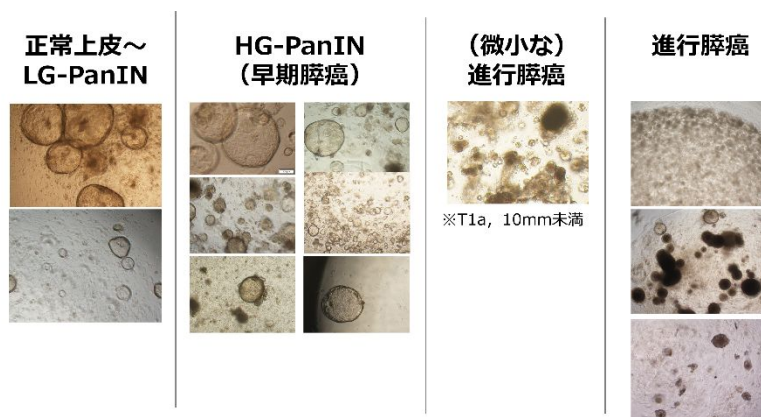
早期膵癌から進行癌に至る様々な段階の癌よりオルガノイド樹立を行った。特に臨床的に早期膵癌が疑われる病変に対し、内視鏡的逆行性膵管造影下に膵管内腔へブラシを挿入し、擦過細胞診によって得られた微量検体を用いてオルガノイド樹立を試みた。樹立成功したオルガノイドについては、全ゲノム解析、トランスクリプトーム解析、Niche dependency 評価を行った。さらに、それぞれのオルガノイドは免疫不全マウスに皮下移植することで造腫瘍能を検討した。膵癌の早期診断マーカー検索のために、細胞外小胞に着目し、早期膵癌をふくむそれぞれのオルガノイドより放出される細胞外小胞を回収し、網羅的な miRNA 解析とプロテオーム解析を行った。

4. 研究成果

膵癌患者由来オルガノイドの樹立

2021 年 10 月から 2023 年 9 月の間に早期膵癌が疑われる計 27 名の患者に対して計 30 セッションの膵管擦過細胞診を行った。このうちオルガノイド作成可能であったのは 80.0%(24/30)であり、43.3%(13/30)%で 4 継代以上の長期培養が可能であった。長期培養可能であったオルガノイドのうち、手術標本の病理学診断によりオルガノイドの由来組織が早期膵癌 (HG-PanIN) であると確定した症例は 6 例であった (図 1)。

図 1. 膵癌の各段階から得られた患者由来オルガノイド



早期膵癌オルガノイドの分子生物学的特徴の解析

樹立された早期膵癌由来オルガノイドの一部は Whole genome sequence で KRASG12D 変異及び CDKN2A del を有しており、早期膵癌に矛盾しない結果であった。これらの早期膵癌由来オルガノイドではいわゆる Moffit ら遺伝子発現シグネチャーうち Classical type のものが upregulate していた (図 2)。さらに、進行膵癌オルガノイドと比較して、Wnt/R-pondin に対する Niche dependency が高い。早期膵癌患者由来オルガノイドはゼノグラフトモデルで

の腫瘍形成能を認めなかった。

図 2 . 膵癌オルガノイドのトランスクリプトーム解析

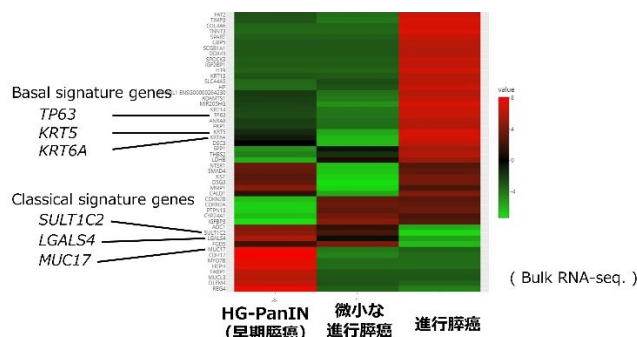
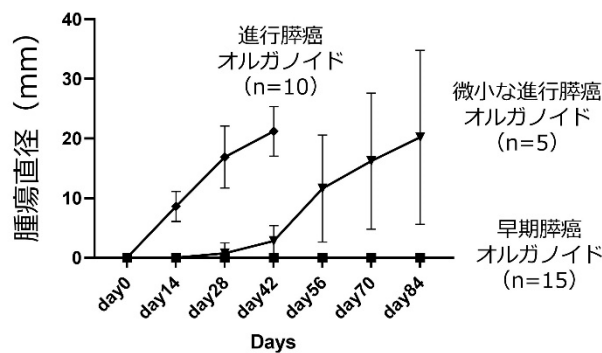


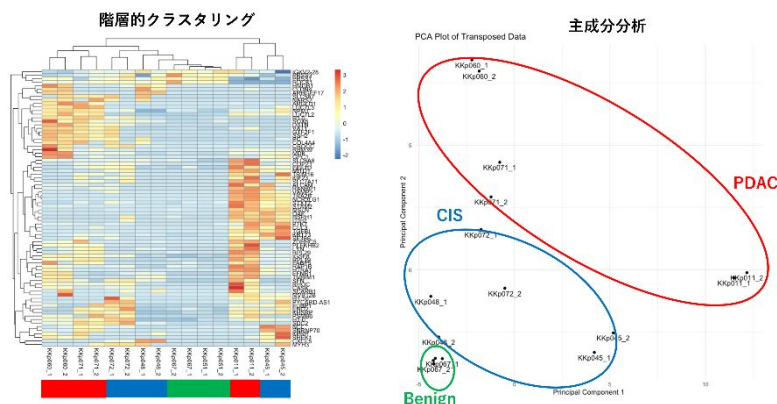
図 3 . 膵癌オルガノイドのゼノグラフト実験



早期膵がんオルガノイド由来細胞外小胞を用いた早期診断マーカーの検索

樹立された正常膵管オルガノイド(n=2)、早期膵癌オルガノイド(n=4)、進行膵癌オルガノイド(n=4)の培養上清から PS アフィニティー法で細胞外小胞を抽出した。LC-MS/MS を用いた網羅的なプロテオーム解析、マイクロアレイ法を用いた網羅的な miRNA 解析を実施した。網羅的なプロテオーム解析では膵癌の細胞外小胞中で有意に上昇する 89 種類のタンパク質候補が同定された(図 4)。特に、CXCL5、EEF1D、MITD1、FUBP1、MYH3、VAMP2、MSLN などは早期膵癌より増加がみられ有力なバイオマーカー候補になると考えられた。miRNA 解析では計 2634 種の miRNA を検出可能であったが、早期膵癌のマーカーとして有益であると考えられた候補は計 19 種類であった。特に、hsa-miR-663a、hsa-miR-1246、hsa-miR-4730、hsa-miR-6126 などが有力な候補として挙げられた。

図 4 . 膵癌オルガノイド由来細胞外小胞のプロテオーム解析



5 . 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計3件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件）

1 . 発表者名 Atsuhiko Masuda, Masahiro Tsujimae, Yuzo Kodama
2 . 発表標題 Establishment of Patient-derived Organoids from Early Pancreatic Cancer
3 . 学会等名 13th International Forum of the Japanese Society of Gastroenterology
4 . 発表年 2024年

1 . 発表者名 辻前 正弘、増田 充弘、重里 徳子、入江 洋介、三木 美香、 田中 雄志、酒井 新、小林 隆、今井 俊夫、児玉 裕三
2 . 発表標題 消化器内視鏡検体を用いた 早期膵癌オルガノイドの樹立
3 . 学会等名 第110回 日本消化器病学会総会
4 . 発表年 2024年

1 . 発表者名 三木 美香、増田 充弘、児玉 裕三
2 . 発表標題 膵癌診断精度向上を目指した早期膵癌オルガノイドの樹立とその解析
3 . 学会等名 第107回 日本消化器内視鏡学会総会
4 . 発表年 2024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
---------	---------