

令和元年6月6日現在

機関番号：32612

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2016～2018

課題番号：16K07148

研究課題名(和文) 難治性胆膵悪性腫瘍に対するがんオルガノイド培養を用いた薬剤感受性検査の確立

研究課題名(英文) Establishment of cancer organoid drug screening test for pancreatic ductal adenocarcinoma

研究代表者

岩崎 栄典 (Iwasaki, Eisuke)

慶應義塾大学・医学部(信濃町)・講師

研究者番号：10366172

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,800,000円

研究成果の概要(和文)：膵臓癌は早期発見困難であり手術ではなく化学療法で治療されることが多いがその効果は限定的である。その理由として薬剤の効果はどれくらいが投与しないと分からないことが挙げられる。今回膵腫瘍生検検体から個々の患者から膵臓癌細胞株をオルガノイド培養法という培養方法で高率に樹立、体外培養することに成功し、実際に臨床で投与する薬剤の感受性と臨床の腫瘍縮小率を比較した。膵臓癌化学療法の第一選択レジメンの治療法Aに含まれる薬剤Bが腫瘍縮小率とよく相関していることが分かり、効果予測することができると示唆された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

これまで患者組織検体を用いた膵臓癌体外培養の成功率は数%程度であったが、オルガノイド培養法により80%以上にまで効率が上がった。この技術を応用して薬剤感受性試験を効率的かつ正確に行う手法を確立することに成功した。更に実際に化学療法が施行され且つCT評価がなされた症例を集積・解析したところ、膵臓癌化学療法の第一選択の一つである治療法Aで用いられている薬剤Bのin vitro感受性と臨床腫瘍縮小率との間に強い相関性が認められ、薬剤Bの薬剤感受性試験は実際の化学療法の効果予測となることが示唆された。

研究成果の概要(英文)：Pancreatic ductal adenocarcinoma(PDAC) is hard to detect in early stage and one of the worst prognostic carcinoma in Japan. Although patients with advanced stage PDAC receive standardization chemotherapy, the efficiency of medication is unknown until drugs are administered to patients. Organoid culture method made us establish and culture each patient's PDAC cell line. We carried out PDAC organoid drug screening and compared the in vitro drug response and clinical tumor reduction rate. Drug B which is one of the PDAC 1st line chemotherapy regimen A was correlated well between drug susceptibility and clinical data. Organoid drug response test was indicated to estimate the clinical chemotherapy effect.

研究分野：消化器内科

キーワード：がんオルガノイド 薬物感受性試験 膵がん

## 1. 研究開始当初の背景

### 【研究の学術的背景】

#### 胆膵悪性腫瘍の増加と臨床的問題点

胆膵悪性腫瘍 (pancreaticobiliary neoplasm) 患者は年々増加し、部位別死亡数では膵臓 4 位、胆道 6 位であり合計で胃癌とほぼ同数にまで増加している (平成 26 年人口動態統計)。また胆膵悪性腫瘍は 5 年生存率が 10% 未満かつ抗癌剤感受性も低く、最も難治性の悪性腫瘍に分類されており、革新的な診断技術や治療方法の開発が求められている。進行した状態で発見されることが多く、多くの患者は化学療法となる (Vincent A, Lancet 378, 607, 2011)。化学療法は多数の患者による臨床試験結果に基づき「画的に」行われるため、患者ごとに治療効果は異なる。同じ癌腫であっても変異の違いなどから抗癌剤の応答性が異なることが原因と考えられる。「画的な」進行膵癌に対する抗癌剤での臨床成績向上は限界があり、患者ごとの「オーダーメイド」治療の実現が望まれている。最近、化学療法を行う前に胆膵悪性腫瘍の組織を確実に採取することが可能となる医療技術革新、つまり超音波内視鏡下穿刺吸引法 (Endoscopic Ultrasound-guided Fine Needle Aspiration; EUS-FNA) が開発され、胆膵悪性腫瘍組織の採取が比較的容易に可能となった。これを応用してがん組織を用いた様々な研究が現在盛んに行われている。

#### 「がんオルガノイド」培養

胆膵悪性腫瘍の感受性を見るためにはより効率のよい癌細胞の培養方法を確立する必要がある。化学療法に対して抵抗性を示す癌幹細胞が腫瘍組織に腫瘍細胞を供給し拡大・浸潤をしていくという癌幹細胞仮説が支持されており、癌幹細胞を培養する必要があったが、多くの試みは失敗に終わってきた。2007 年に sphere 培養法により大腸癌幹細胞の培養できることが報告 (Ricci-Vitiani L et al Nature 2007) されたものの、成功率が 20-30% と低く実用的ではなかった。今回の研究では、研究分担者である佐藤俊朗特任准教授が世界で初めて開発した、マウス消化管上皮幹細胞の画的な培養システムを用いる (Sato T et al. Nature 2009, Barker N et al. Cell Stem Cell, 2010)。本培養により、腸管上皮幹細胞の幹細胞機能 (長期間の幹細胞自己複製と多分化能) が維持され、生体内に近似した「オルガノイド」を形成する。研究分担者は本培養システムを利用して、腸管上皮幹細胞ニッセを同定し (Sato T et al. Nature 2011)、さらに、上記培養システムの改変によるヒト腸管上皮幹細胞培養にも成功している (Jung P, Sato T et al. Nature Medicine 2011, Sato T et al. Gastroenterology 2011)。この培養法はたった一つの内視鏡生検検体から 100% の成功率で培養が確立でき (Sato T et al. Gastroenterology 2011)、単一の癌幹細胞から形成されたオルガノイドは永続的な増殖とともに粘液産生細胞や Cytokeratin20 を発現する分化細胞に分化することがわかった。つまり、癌幹細胞研究に最適な培養システムを確立してきた。この方法を用いて胆膵悪性腫瘍に対する癌幹細胞を用いた「がんオルガノイド」培養の樹立を進めることを目標とする。

## 2. 研究の目的

難治かつ生命予後不良な胆膵悪性腫瘍における診断治療の革新のため、オーダーメイド治療の導入が望まれている。研究分担者である佐藤らが世界で初めて確立した三次元組織構造体 (オルガノイド) 培養と High-throughput screening (HTS) を応用することで、比較的短時間かつ高い精度で効率の良い薬剤感受性試験が実現可能である。超音波内視鏡下生検より得たごく微量の腫瘍組織よりのオルガノイド培養方法の確立、全エキソン同定、HTS による薬剤感受性試験の確立、in vivo でゼノグラフトを用いた評価を行う。世界初のオルガノイド培養を用いたオーダーメイド治療選択の実現に向けた基礎的な研究・技術開発を目的とする。

## 3. 研究の方法

### 「がんオルガノイド」培養を用いた抗がん剤感受性試験の確率

- (1) 胆膵悪性腫瘍に対する EUS-FNA 検体のオルガノイド培養を確立
- (2) 遺伝子プロファイルをシステム医学的に解析
- (3) 増殖させた培養膵腫瘍細胞の high throughput screening 薬剤感受性を評価
- (4) 悪性腫瘍オルガノイドをもちいたゼノグラフトモデルを作成

上記にて本感受性検査方法を確定させた。これらの技術的革新、検討を行うことで胆膵悪性腫瘍に対する EUS-FNA という微量検体を用いた信頼性の高い感受性試験方法を開発した。

### 「薬剤感受性試験と遺伝子変異・膵がんサブタイプとの相関」

がんオルガノイドライブラリーを用いることで遺伝子変異と薬剤感受性についての相関解析を行った。また膵がんサブタイプごとの薬剤感受性をもちいて治療効果の高い薬剤を探索した。

## 「現在の膵がん治療における薬剤感受性試験の後ろ向き検討」

がんオルガノイド感受性試験の臨床応用に向けて、現在膵がんに用いられている薬剤と、臨床データを推定し、治療効果予測が可能な薬剤についての探索を行った。

### 4. 研究成果

研究代表者にて採取した膵臓癌の超音波内視鏡穿刺吸引検体、手術検体を用いて 40 例の膵臓癌オルガノイドを樹立、バイオバンクを作成し、全エキソームシーケンシング、マイクロアレイ、染色体コピー数解析を行った。その過程で清野隆史らは GATA6 発現量に相関して癌オルガノイドの増殖因子要求性が少なくなってくることを見出し論文発表を行った。具体的には基本的な培養条件 Wnt, EGF, Noggin, R-spondin のうち、Wnt が必要なものを 'W+' , Wnt が不要になるものを 'W-' , Wnt に加えて R-spondin も不要になるものを 'WRi' と膵臓癌の Subtype を定義することができた (Cell stem cell.2018:454-467)。

川崎慎太郎らを中心に樹立した膵臓がんオルガノイド 40 例に関して臨床で用いられている抗がん剤を中心に薬剤感受性試験を行った。Tp53 変異存在下では Nutlin3a に対する薬剤耐性があることが一般的に知られているが、今回の薬剤感受性試験においてもその関係性が再現され ( $p < 0.001$ ) た。膵臓癌オルガノイドを用いた薬剤感受性試験の妥当性が示され、患者由来膵臓癌検体からオルガノイドの樹立、薬剤感受性試験という一連の流れを構築することに成功した (図 1)。

一方で今回感受性試験を行った各種薬剤と遺伝子変異との相関は認められなかった。しかし、膵臓癌 Subtype のうち、'W-' には MEK inhibitor である薬剤 A が奏功しやすいことが見出され、薬剤感受性試験を行わずとも、マイクロアレイデータから膵臓癌 Subtype を決定し、薬剤 A 感受性が高い癌患者に選択的に薬剤 A を投与することも可能と考えられた。

また現在膵臓癌化学療法 1st ラインの一つである治療法 A を施行し CT 評価まで行った 14 症例の腫瘍縮小率と薬剤 B の IC50 に相関性が認められた。このことから薬剤 B の薬剤感受性試験の結果が治療法 A の臨床効果予測となる可能性が示唆された (図 2)。

図 1

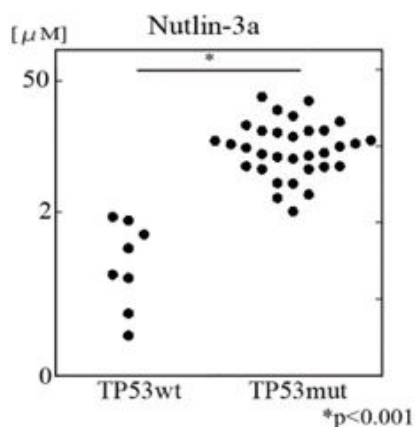
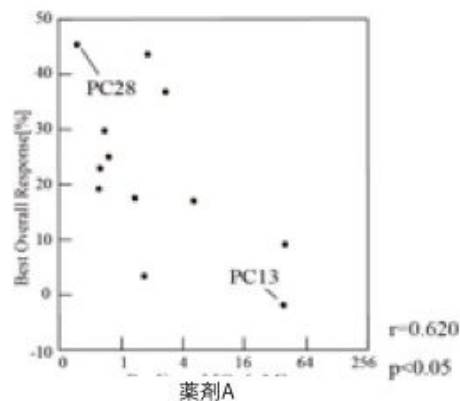


図 2



### 5. 主な発表論文等

- [雑誌論文](計 1 件)
- [学会発表](計 0 件)
- [図書](計 0 件)
- [産業財産権]
- 出願状況(計 0 件)
- 取得状況(計 0 件)
- [その他]なし

### 6. 研究組織

#### (1) 研究分担者

研究分担者氏名：佐藤 俊朗  
ローマ字氏名：SATO, Toshiro  
所属研究機関名：慶應義塾大学  
部局名：医学部  
職名：教授  
研究者番号(8桁)：70365245

(2)研究協力者

研究協力者氏名：川崎 慎太郎

ローマ字氏名：KAWASAKI, Shintaro

研究協力者氏名：清野 隆史

ローマ字氏名：SEINO, Takashi

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、研究者個人に帰属されます。