

令和 2 年 5 月 27 日現在

機関番号：12601

研究種目：基盤研究(C)（一般）

研究期間：2017～2019

課題番号：17K09454

研究課題名（和文）患者由来膵癌ライブラリーを用いた治療抵抗性膵癌に対する新規治療法の開発

研究課題名（英文）Development of novel strategies for the chemoresistant pancreatic tumors using the patient-derived library

研究代表者

高原 楠昊（TAKAHARA, NAMINATSU）

東京大学・医学部附属病院・助教

研究者番号：10750622

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,500,000円

研究成果の概要（和文）：患者由来ヒト膵癌異種移植腫瘍（patient-derived tumor xenograft; PDX）ライブラリーと3次元培養法（Patient-derived organoid; PDO）を用いて膵癌薬剤感受性についてのin vitro解析および大規模なスクリーニングを行った。治療抵抗性膵癌PDOを用いて、化学療法への耐性を改善する低分子化合物の探索とその機序の解明を試みた。薬剤スクリーニングから有効なエピゲノム化合物としてBET阻害薬を見出し報告した。さらに別の候補の標的遺伝子と作用機序を解明するとともに、遺伝子改変動物を用いた効果のバリデーションを行っている。

研究成果の学術的意義や社会的意義

申請者らはこれまでに標準治療に抵抗性となった膵癌に対する腹腔内化学療法や新規化学療法regimenの開発に携わるとともに、遺伝子多型SNPや腫瘍マーカーを用いた治療効果予測の有用性を報告してきた。本研究では、患者由来ヒト膵癌異種移植腫瘍を用いることで、化学療法への耐性を改善する低分子化合物の探索とその機序の解明を試みた。ヒト膵癌細胞とマウスでの分子機序における相違点の有無についても解析を行い、新たな膵癌増殖抑制効果を持つエピゲノム分子としての意義を確立した。

研究成果の概要（英文）：In this project, we established the library of patient-derived tumor xenografts (PDX) and Patient-derived organoids (PDO). Using the system, we performed the drug screening in epigenetic field for the pancreatic cancer cells. Especially, we tried to analyze the mechanism of drug resistance in pancreatic cancer cells. We found the effectiveness of BET inhibitor against the growth of pancreatic cancer PDOs and published the report. We are conducting in vivo validation of in vitro data. Additionally, we analyze the function of target genes in pancreatic cancer.

研究分野：消化器病学

キーワード：膵癌

## 様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19、CK - 19 (共通)

### 1. 研究開始当初の背景

膵癌は難治癌である。標準治療に抵抗性を示す症例も多く、治療抵抗性の改善を目指した治療の開発や、治療抵抗性予測因子の同定が急務である。そのためには、実際の臨床検体を用いて薬剤感受性の評価・機序解明・新規治療薬のスクリーニングなどを行う枠組みが必要であり、実際の患者における治療効果を忠実に再現するような実験系の開発が不可欠である。申請者らはこれまでに40人以上の膵癌患者から腫瘍組織を採取・免疫不全マウスに移植し、Patient-derived xenograft (PDX) ライブラリーを作成した。このPDX 腫瘍は由来する患者腫瘍の形質・遺伝子変異プロファイルを保持し、豊富な間質と膠原線維増生を含めた患者膵癌組織の病理像を再現するため、前臨床モデルとして患者腫瘍の性質を忠実に反映することが期待されている。さらに、増殖したPDX 腫瘍は凍結保存・免疫不全マウスへの再移植が可能であり、随時実験を行えるという利点も有する。実際、このPDX を用いてエピジェネティック因子の一つBET タンパクに対する阻害剤が、膵癌間質のreprogramming を介して線維化の消失と抗腫瘍効果を発揮することを明らかにした。

### 2. 研究の目的

少数例での検討では、各PDX 間で抗癌剤に対する感受性が大きく異なっていた。しかし、これが実際の患者における抗癌剤への感受性を反映するかどうかは明らかではない。そこで、まずは抗癌剤への感受性が、実際の患者 (PDX の由来する患者) における治療反応性とよく相関するかどうかを検証する。続いて、感受性の異なるPDX を用いて、治療抵抗性と関連する患者因子の同定・バイオマーカー探索を図る、化合物ライブラリーを用いて治療抵抗性を改善する低分子化合物を探索し、その作用機序の解明を試みる。

### 3. 研究の方法

今回、申請者らはより大規模な薬剤ライブラリーでのスクリーニングや併用療法の探索を実現するために、PDX 腫瘍を用いた新しい3次元培養法 (Patient-derived organoid; PDO) を用いた。具体的には、近年報告された消化器癌のOrganoid 培養法を改変することで (1) 培養条件をヒト膵癌に最適化し、(2) 凍結保存検体からの培養を可能にし、(3) 細胞外基質への包埋を不要にすることで手順を簡便化し、multi-well plate でのhigh throughput screening (HTS) を可能にした。

PDOを酵素処理により単細胞化し抗癌剤を8段階濃度で添加、生細胞検出試薬を添加し、生存細胞数を評価する。得られた容量・反応曲線から50%阻害濃度 (IC50 値) を算出し、由来する症例でのBOR, TTP との相関を調べる。

またPDXを用いて、in vivo での効果も確認する。具体的には、腫瘍細胞をNOD/SCID マウスに皮下注射することで移植、薬剤投与とともに腫瘍サイズを経時的に観察する。薬剤投与終了時に皮下腫瘍を摘出し、その重量を比較するとともに、細胞増殖指数・細胞死・主要なシグナル伝達系について、immunoblotting、免疫染色などで評価する。

### 4. 研究成果

#### 1) 膵癌PDO を用いた抗がん剤感受性の評価と患者情報の比較

患者における抗癌剤への感受性を反映するかどうか明らかにすべく、まずは当院で化学療法を受けた膵癌症例から樹立したPDOを用いて、膵癌の標準治療に用いられている抗癌剤 (gemcitabine) への感受性を評価した。得られたIC50 値と、由来患者で実際に投与された薬剤に対する臨床応答 (無増悪生存期間TTP、最良総合効果BOR; best overall response) との関連を検討した。

#### 2) 治療抵抗性予測因子・バイオマーカーの探索と同定

抗癌剤に対する感受性・抵抗性に関わる因子・バイオマーカー候補を探索するために、1) で評価したIC50 値にもとづき、PDO を感受性と抵抗性に分類し、両群間での遺伝子変異プロファイルの違いを評価するとともに、遺伝子発現プロファイルについても網羅的に比較した。さらに、ここで同定された治療抵抗性と関連する因子については、siRNA による遺伝子発現抑制によって抗癌剤への感受性改善効果が得られるかどうか、すなわち抵抗性に機能的に寄与するかどうかも検討中である。

#### 3) 低分子化合物スクリーニング

低分子化合物ライブラリーを用い、治療抵抗性PDO の抗癌剤感受性を改善する薬剤を探索した。とくに研究者らはエピゲノム化合物を用いたスクリーニングを行い、膵癌PDXの増殖を抑制する化合物を見出して、BET阻害薬については報告したが、さらに別のエピゲノム化合物についても膵癌PDX、PDOの生存・増殖を抑制する候補を見出した。その候補薬物についての標的遺伝子と作用機序を解明するとともに、遺伝子改変動物を用いた効果のバリデーションを行っている。標的遺伝子を欠損した遺伝子改変マウスで、KRAS遺伝子変異によって誘導される膵癌および前

癌病変の進行を抑制しえたとの知見を得ている。よってヒト膵癌細胞とマウスでの分子機序における相違点の有無についても解析を行い、新たな膵癌増殖抑制効果を持つエピゲノム分子としての意義を確立する。具体的には、細胞周期解析・apoptosis 誘導の有無解析や、シグナル伝達系の評価を行う。さらに、候補化合物の併用による遺伝子発現の変化も網羅的に解析し、2) で検討した抵抗性関連因子の変動も評価する。また、PDXを用いて、in vivo での効果も確認する。

## 5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計11件（うち査読付論文 10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<br>Takahara Naminatsu, Nakai Yousuke, Isayama Hiroyuki, Sasaki Takashi, Saito Kei, Oyama Hiroki, Kanai Sachiko, Suzuki Tatsunori, Sato Tatsuya, Hakuta Ryunosuke, Ishigaki Kazunaga, Takeda Tsuyoshi, Saito Tomotaka, Mizuno Suguru, Kogure Hirofumi, Tada Minoru, Koike Kazuhiko | 4. 巻<br>36                |
| 2. 論文標題<br>Second-line chemotherapy in patients with advanced or recurrent biliary tract cancer: a single center, retrospective analysis of 294 cases  | 5. 発行年<br>2018年           |
| 3. 雑誌名<br>Investigational New Drugs  | 6. 最初と最後の頁<br>1093 ~ 1102 |
| 掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子)<br>10.1007/s10637-018-0670-1  | 査読の有無<br>有                |
| オープンアクセス<br>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<br>-                 |

|  |                   |
|--|-------------------|
| 1. 著者名<br>Saito Kei, Isayama Hiroyuki, Sakamoto Yoshihiro, Nakai Yousuke, Ishigaki Kazunaga, Tanaka Mariko, Watadani Takeyuki, Arita Junichi, Takahara Naminatsu, Mizuno Suguru, Kogure Hirofumi, Ijichi Hideaki, Tateishi Keisuke, Tada Minoru, Hasegawa Kiyoshi, Fukayama Masashi, Kokudo Norihiro, Koike Kazuhiko | 4. 巻<br>35        |
| 2. 論文標題<br>A phase II trial of gemcitabine, S-1 and LV combination (GSL) neoadjuvant chemotherapy for patients with borderline resectable and locally advanced pancreatic cancer   | 5. 発行年<br>2018年   |
| 3. 雑誌名<br>Medical Oncology   | 6. 最初と最後の頁<br>100 |
| 掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子)<br>10.1007/s12032-018-1158-8  | 査読の有無<br>無        |
| オープンアクセス<br>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<br>-         |

|   |                       |
|---|-----------------------|
| 1. 著者名<br>Takahara N, Isayama H, Nakai Y, Sasaki T, Ishigaki K, Saito K, Akiyama D, Uchino R, Mizuno S, Yagioka H, Kogure H, Togawa O, Matsubara S, Ito Y, Toda N, Tada M, Koike K. | 4. 巻<br>35(3)         |
| 2. 論文標題<br>Gemcitabine and S-1 versus gemcitabine and cisplatin treatment in patients with advanced biliary tract cancer: a multicenter retrospective study.                        | 5. 発行年<br>2017年       |
| 3. 雑誌名<br>Invest New Drugs  | 6. 最初と最後の頁<br>269-276 |
| 掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子)<br>doi: 10.1007/s10637-017-0430-7  | 査読の有無<br>有            |
| オープンアクセス<br>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<br>-             |

|   |                       |
|---|-----------------------|
| 1. 著者名<br>Takahara N, Isayama H, Nakai Y, Yoshida S, Saito T, Mizuno S, Yagioka H, Kogure H, Togawa O, Matsubara S, Ito Y, Yamamoto N, Tada M, Koike K. | 4. 巻<br>11(4)         |
| 2. 論文標題<br>A Novel Partially Covered Self-Expandable Metallic Stent with Proximal Flare in Patients with Malignant Gastric Outlet Obstruction.          | 5. 発行年<br>2017年       |
| 3. 雑誌名<br>Gut Liver.  | 6. 最初と最後の頁<br>481-488 |
| 掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子)<br>doi: 10.5009/gn116259.  | 査読の有無<br>有            |
| オープンアクセス<br>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<br>-             |

|  |                         |
|--|-------------------------|
| 1. 著者名<br>Takahara N, Nakai Y, Isayama H, Sasaki T, Saito K, Noguchi K, Suzuki T, Nakamura T, Sato T, Ishigaki K, Hakuta R, Takeda T, Uchino R, Mizuno S, Kogure H, Tada M, Koike K. | 4. 巻<br>80(6)           |
| 2. 論文標題<br>CA19-9 kinetics during systemic chemotherapy in patients with advanced or recurrent biliary tract cancer.   | 5. 発行年<br>2017年         |
| 3. 雑誌名<br>Cancer Chemother Pharmacol.  | 6. 最初と最後の頁<br>1105-1112 |
| 掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子)<br>doi: 10.1007/s00280-017-3456-9.  | 査読の有無<br>有              |
| オープンアクセス<br>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<br>-               |

|  |                         |
|--|-------------------------|
| 1. 著者名<br>Saito Kei, Isayama Hiroyuki, Nakai Yousuke, Takahara Naminatsu, Tateishi Keisuke, Tada Minoru, Koike Kazuhiko      | 4. 巻<br>37              |
| 2. 論文標題<br>A phase II trial of gemcitabine, S-1 and LV combination (GSL) therapy in patients with advanced pancreatic cancer | 5. 発行年<br>2018年         |
| 3. 雑誌名<br>Investigational New Drugs  | 6. 最初と最後の頁<br>338 ~ 344 |
| 掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子)<br>10.1007/s10637-018-0691-9  | 査読の有無<br>有              |
| オープンアクセス<br>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<br>-               |

|   |                         |
|---|-------------------------|
| 1. 著者名<br>Takahara Naminatsu, Isayama Hiroyuki, Nakai Yousuke, Sasaki Takashi, Saito Kei, Sato Tatsuya, Hakuta Ryunosuke, Ishigaki Kazunaga, Saito Tomotaka, Hamada Tsuyoshi, Mizuno Suguru, Kogure Hirofumi, Tada Minoru, Koike Kazuhiko | 4. 巻<br>31              |
| 2. 論文標題<br>A feasibility study of gemcitabine, S-1 and leucovorin combination therapy (GSL) for advanced biliary tract cancer   | 5. 発行年<br>2019年         |
| 3. 雑誌名<br>Journal of Chemotherapy   | 6. 最初と最後の頁<br>284 ~ 289 |
| 掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子)<br>10.1080/1120009X.2019.1626088   | 査読の有無<br>有              |
| オープンアクセス<br>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<br>-               |

|   |                         |
|---|-------------------------|
| 1. 著者名<br>Mizuno Suguru, Isayama Hiroyuki, Nakai Yousuke, ITakahara Naminatsu, Kogure Hirofumi, Tateishi Keisuke, Tada Minoru, Shikata Nahoko, Tagami Tomoyuki, Kikuchi Shinya, Yamamoto Hiroshi, Yamakado Minoru, Koike Kazuhiko | 4. 巻<br>19              |
| 2. 論文標題<br>Diagnostic yield of the plasma free amino acid index for pancreatic cancer in patients with diabetes mellitus  | 5. 発行年<br>2019年         |
| 3. 雑誌名<br>Pancreatology   | 6. 最初と最後の頁<br>695 ~ 698 |
| 掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子)<br>10.1016/j.pan.2019.07.002   | 査読の有無<br>有              |
| オープンアクセス<br>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<br>-               |

|  |                            |
|--|----------------------------|
| 1. 著者名<br>Oyama Hiroki, Tada Minoru, Takagi Kaoru, Tateishi Keisuke, Hamada Tsuyoshi, Nakai Yousuke, Takahara Naminatsu, Hasegawa Kiyoshi, Tanaka Mariko, Fukayama Masashi, Koike Kazuhiko | 4. 巻<br>158                |
| 2. 論文標題<br>Long-term Risk of Malignancy in Branch-Duct Intraductal Papillary Mucinous Neoplasms  | 5. 発行年<br>2020年            |
| 3. 雑誌名<br>Gastroenterology   | 6. 最初と最後の頁<br>226 ~ 237.e5 |
| 掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子)<br>10.1053/j.gastro.2019.08.032   | 査読の有無<br>有                 |
| オープンアクセス<br>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<br>-                  |

|  |                       |
|--|-----------------------|
| 1. 著者名<br>Takahara Naminatsu, Kogure Hirofumi, Nakai Yousuke, Yamada Atsuo, Koike Kazuhiko   | 4. 巻<br>5             |
| 2. 論文標題<br>Biliary reintervention with endoscopic inversion technique in the duodenum with the use of short-type double-balloon endoscope in a patient with an indwelling duodenal stent | 5. 発行年<br>2020年       |
| 3. 雑誌名<br>VideoGIE   | 6. 最初と最後の頁<br>16 ~ 19 |
| 掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子)<br>10.1016/j.vgie.2019.09.008   | 査読の有無<br>有            |
| オープンアクセス<br>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<br>-             |

|  |                     |
|--|---------------------|
| 1. 著者名<br>Takahara Naminatsu, Nakai Yousuke, Saito Kei, Sasaki Takashi, Suzuki Yukari, Inokuma Akiyuki, Oyama Hiroki, Kanai Sachiko, Suzuki Tatsunori, Sato Tatsuya, Hakuta Ryunosuke, Ishigaki Kazunaga, Saito Tomotaka, Hamada Tsuyoshi, Mizuno Suguru, Kogure Hirofumi, Tada Minoru, Isayama Hiroyuki, Koike Kazuhiko | 4. 巻<br>n/a         |
| 2. 論文標題<br>The impact of age and comorbidity in advanced or recurrent biliary tract cancer receiving palliative chemotherapy   | 5. 発行年<br>2020年     |
| 3. 雑誌名<br>Journal of Gastroenterology and Hepatology   | 6. 最初と最後の頁<br>15066 |
| 掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子)<br>10.1111/jgh.15066  | 査読の有無<br>有          |
| オープンアクセス<br>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<br>-           |

〔学会発表〕 計6件 (うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件)

|  |
|--|
| 1. 発表者名<br>高原 楠 昊                                    |
| 2. 発表標題<br>切除不能・術後再発胆道癌に対する化学療法施行例における炎症性マーカーについての検討 |
| 3. 学会等名<br>第15回日本臨床腫瘍学会                              |
| 4. 発表年<br>2017年                                      |

|  |
|--|
| 1. 発表者名<br>高原楠昊  |
| 2. 発表標題<br>Prognostic value of early CA19-9 response during chemotherapy in patients with advanced or recurrent biliary tract cancer |
| 3. 学会等名<br>UEGW 2017   |
| 4. 発表年<br>2017年  |

|  |
|--|
| 1. 発表者名<br>高原楠昊  |
| 2. 発表標題<br>Prognostic value of early CA19-9 response during chemotherapy in patients with advanced or recurrent biliary tract cancer |
| 3. 学会等名<br>UEGW 2017   |
| 4. 発表年<br>2017年  |

|  |
|--|
| 1. 発表者名<br>高原楠昊  |
| 2. 発表標題<br>Second-line chemotherapy in patients with advanced biliary tract cancer |
| 3. 学会等名<br>ASCO-GI 2018  |
| 4. 発表年<br>2018年  |

|  |
|--|
| 1. 発表者名<br>高原楠昊  |
| 2. 発表標題<br>Nomograms predicting survival of patients with advanced or recurrent biliary tract cancer receiving a first-line chemotherapy |
| 3. 学会等名<br>欧州臨床腫瘍学会議 (ESMO2018)  |
| 4. 発表年<br>2018年  |

|   |
|---|
| 1. 発表者名<br>高原 楠昊  |
| 2. 発表標題<br>切除不能・術後再発胆道癌におけるAge-adjusted charlson comorbidity index (aCCI) が治療成績に与える影響 |
| 3. 学会等名<br>第105回 日本消化器病学会   |
| 4. 発表年<br>2019年   |

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

|               | 氏名<br>(ローマ字氏名)<br>(研究者番号)                         | 所属研究機関・部局・職<br>(機関番号)                  | 備考 |
|---------------|---|--|----|
| 研究<br>分担<br>者 | 立石 敬介<br><br>(TATEISHI KEISUKE)<br><br>(20396948) | 東京大学・医学部附属病院・講師<br><br><br><br>(12601) |    |