

科学研究費助成事業 研究成果報告書

令和 2 年 9 月 14 日現在

機関番号：22701

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2017～2019

課題番号：17K09465

研究課題名(和文)胆膵癌個別化医療実現のための3次元腫瘍バンクの構築

研究課題名(英文) Construction of a 3D tumor bank of pancreaticobiliary cancer for personalized medicine

研究代表者

杉森 一哉 (Sugimori, Kazuya)

横浜市立大学・附属市民総合医療センター・講師

研究者番号：20448666

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)：切除不能進行胆道癌・膵癌に対する化学療法は未だ十分な有用性とは言い難く、新規治療標的分子の同定と、既存の化学療法レジメンの有効活用は、実臨床上で早急に求められる責務である。本研究は診断時の生検検体より、3次元オルガノイド培養パネルを構築し、薬剤投与実験のためのアッセイ系を確立することを主たる目的とした。

細菌のコンタミネーションにより培養操作は難渋したが、最終的に超音波内視鏡下生検組織を用いて進行膵癌20症例中16症例において培養に成功した。オルガノイド株由来のDNAを用いることで、詳細なNGS解析が可能であった。また、既存の抗癌剤や阻害薬の単剤ないし併用による増殖抑制効果の検討に有効であった。

研究成果の学術的意義や社会的意義

従来の研究手法では樹立された培養細胞株を用いた解析が行われてきたが、細胞株の樹立には主に手術検体が利用され、また長時間を要することから、いわゆるbench-to-bedsideへの応用は不可能であった。さらに、多くの化学療法の対象となる患者において手術は行われず、十分な量の組織を得ることは困難であった。一方、EUS-FNAは低侵襲的な手技として確立されており、その採取検体からの細胞培養系の確立は、これまで困難であった手術不能進行癌患者における薬剤感受性解析や、新規治療標的分子の同定、更には個別化医療を試みる上で、極めて有用であると考えられる。

研究成果の概要(英文)：Chemotherapy for advanced unresectable biliary tract cancer and pancreatic cancer is not yet sufficiently useful. And, the identification of new therapeutic target molecules and the effective use of existing chemotherapy regimens are urgently needed in clinical practice. The main purpose of this study was to establish three-dimensional cancer organoid culture panel from biopsy samples, and an assay system for drug screening experiments. Although bacterial contamination made it difficult, we finally succeeded in culturing 16 of the 20 cases of advanced pancreatic cancer, using endoscopic ultrasound guided-fine needle aspiration biopsy tissue. Using DNA extracted from organoid culture lines, detailed NGS analysis could be performed. It was also useful in proliferation assays with existing anticancer drugs and inhibitors, either alone or in combination.

研究分野：消化器内科学

キーワード：膵癌 オルガノイド 超音波内視鏡

様式 C-19、F-19-1、Z-19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

胆膵領域の悪性腫瘍は、解剖学的な複雑さも相まって、診断時には手術適応のない進行例であるケースが数多く見受けられる。これまでに進行胆道癌に対する GEM + cisplatin, 進行膵癌に対する FOLFIRINOX (オキサリプラチン, イリノテカン塩酸塩水和物, フルオロウラシル, レボホリナートカルシウム併用療法), GEM + nab-PTX (ゲムシタビン, ナブパクリタキセル併用療法) 等の化学療法レジメンが開発されてきたが, 生存期間中央値は進行胆道癌で 8-12 か月, 進行膵癌で 7-11 か月程度と未だ極めて予後不良の難治癌である。これまでに大規模ゲノム解析によって胆道癌及び膵癌の原因変異遺伝子が同定されてきたが, 未だ治療標的分子の同定は困難を極めている。こうした現状を踏まえると, 中・長期的に新規治療標的分子の探索を行いつつ, 既存の化学療法レジメンの有効活用を図ることが, 実臨床上で早急に求められる責務であると考えられる。

これまで申請者らは一貫して進行胆道癌・膵癌に対する化学療法に携わるとともに, 超音波内視鏡を用いたアプローチによって胆膵領域の腫瘍性疾患に対する診断法の確立に従事してきた (Abdom Imaging 2014;39:988-99)。最近では膵癌における超音波内視鏡下生検 (Endoscopic ultrasound-guided fine-needle aspiration, 以後 EUS-FNA) 検体を用いた次世代型シーケンサー解析により, 遺伝子診断法の確立を図るとともに, 変異遺伝子情報と化学療法の奏効を含めた臨床経過の関連を検討してきた (Oncology letters 2016;12:3875-81)。また一方で, これまでの後ろ向き症例解析において薬剤感受性は症例ごとで異なり, 個別化医療の必要性を強く痛感してきた。

従来の研究手法では, 樹立された培養細胞株を用いた解析が行われてきたが, 細胞株の樹立には主に手術検体が利用され, また長時間を要することから, いわゆる bench-to bedside への応用は不可能であった。さらに, 多くの化学療法の対象となる患者において手術は行われず, 十分な量の組織を得ることは困難であった。一方, EUS-FNA は低侵襲的な手技として確立され, 採取検体を用いた細胞培養系の確立は, これまで困難であった手術不能の進行癌患者における薬剤感受性解析や分子遺伝学的解析を行う上で, 極めて有用であると考えた。また, 近年確立された 3次元オルガノイド培養法を用いることで, 少量の組織から比較的短時間で樹立が可能とされ, 寡少な EUS-FNA 検体からの培養も可能であると想定される。そこで本研究では, これまでの研究を更に飛躍させる系として, 生検検体由来の 3次元オルガノイド培養パネルを構築し, 網羅的遺伝子変異・発現解析と臨床経過の紐付けだけでなく, 薬剤スクリーニングのためのアッセイ系の確立を主たる目的とする。

2. 研究の目的

本研究では, 化学療法の対象となる切除不能進行症例に対して実施された EUS-FNA 検体等の内科的生検検体を用いて 3次元オルガノイド培養パネルを構築し, 網羅的遺伝子変異・発現解析と臨床経過の紐付けだけでなく, シグナル伝達解析, 更には阻害薬ライブラリ等を用いた薬剤スクリーニングのためのアッセイ系を確立することを主たる目的とする。

3. 研究の方法

(1)胆膵癌の 3次元オルガノイド培養パネルの構築

化学療法の対象となる切除不能進行症例に対して実施された EUS-FNA 検体等の内科的生検検体を用いて 3次元オルガノイド培養を行い, 臨床経過の紐付け可能な 3次元オルガノイド培養パネルを構築する。

(2) 3次元オルガノイド培養パネルでの遺伝子変異解析・遺伝子発現解析と臨床経過の比較・検討

次世代型シーケンサーによる網羅的遺伝子変異解析と網羅的遺伝子発現解析を行い, 臨床経過との比較から新規治療標的分子の探索を行う。

(3)オルガノイド培養パネルでの既存の抗癌剤及び新規の分子標的阻害薬ライブラリのスクリーニング実験

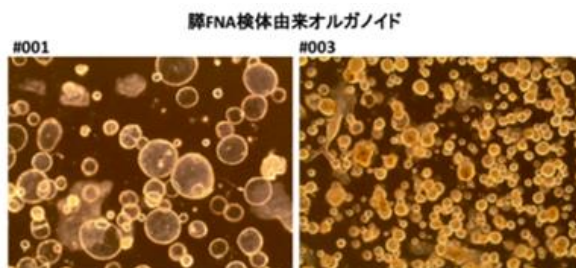
変異・発現変化を認めた遺伝子に対して存在する分子標的薬から優先的に, 増殖率や足場非依存的増殖能の有無等の腫瘍原性の評価を行う。また実際に投与された抗癌剤をオルガノイドに投与実験を行い, 薬剤代謝・耐性経路遺伝子の変異・発現解析結果, 及び臨床経過との関連性を検討し, 新規レジメン選択基準を探索する。過程において有用と考えられる新規治療標的分子や新規薬剤のスクリーニングに成功した場合には, 適宜, 細胞実験やマウスモデルでの分子生物学的基礎検討を実施する。

4. 研究成果

(1)胆膵癌の 3次元オルガノイド培養パネルの構築

まず, 既報を参考にマウス胆管および膵組織を用いて培養条件の検討を行った (Seino et al., Cell Stem Cell 2018;22:1-14)。最終的に, Advanced DMEM (#12491015, Thermo fisher scientific) +1% Penicillin-Streptomycin (#168-23191, Wako), +1% 10mM HEPES (#17557-94, nacalai tesque), +2mM GlutaMax (#35050061, Thermo fisher scientific),

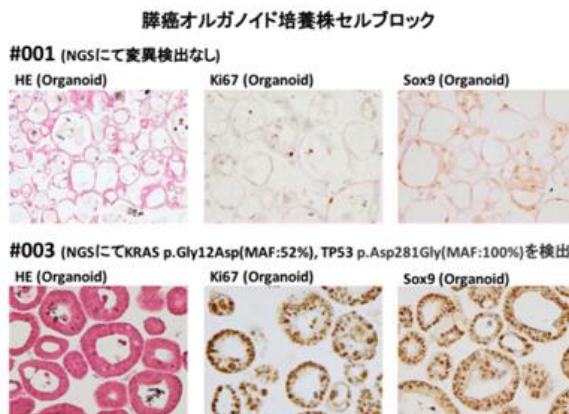
+1mM N-acetyl cysteine (#017-05131, Wako), +1x B27 (#A3582801, Thermo fisher scientific), +1x N2 (#17502048, Thermo fisher scientific), +1x Afamin/Wnt3a condition medium (#J-ORMW301R, JSR ライフサイエンス), +50ng/mL recombinant mouse EGF (#PGM8041, Thermo fisher scientific), +1 μ g/mL recombinant human R-Spondin (#120-38, PeproTech), 100ng/mL Recombinant mouse Noggin (#250-38, PeproTech), +10nM GastrinI (#G9145, Sigma), +500nM A83-01 (#2939, TOCRIS), +10 μ M Y-27632 (#030-24021, Wako)にて培養可能であることを確認した. 実際の EUS-FNA 検体の培養においては, 細菌や真菌のコンタミネーションのために培養に難渋したが, PBSでの十分な洗浄操作と, 培養液に 0.1mg/ml Primocin (#ant-pm-1, INVIVOGEN) および 1x Amphotericin B (#019-23891, Wako)を添加することで培養成功率を向上させることが出来た. 培養条件確立後は, 最終的に進行膵癌 20 例中 16 例において培養株の樹立に成功した.



胆管癌に対しても ERCP 時の胆管生検検体を用いて培養を試みたが, コンタミネーションを起こすケースも多く, 細胞培養は困難であった. 多くが閉塞性横断・胆管炎状態にある症例であったことも影響していると考えられた.

(2) 3次元オルガノイド培養パネルでの遺伝子変異解析・遺伝子発現解析と臨床経過の比較・検討

オルガノイド培養株より抽出した DNA を用いて次世代型シーケンサーによる遺伝子解析を Cancer HotSpot panel v2 (#20019161, illumina)を用いて行った結果, 2例では正常 DNA (末梢 血単核球由来) との paired 解析で変異を検出せず, セルブロック標本に対する免疫染色では Sox9 陽性で Ki-67 陽性率の低いオルガノイド細胞塊を認め, 正常膵管上皮由来のオルガノイド細胞株であることが示唆された. 残る 14 例では, いずれも KRAS 及び TP53 変異を検出し, KRAS 変異箇所については, KRAS codon12, 13 領域変異:13 例, KRAS codon 61 領域変異:1 例であった. 興味深いことに, KRAS codon 12, 13 領域変異 2 例は 100%に近い MAF (mutation allele frequency) 値を示し, ホモ接合型変異であることが示唆された. TP53 については, いずれの変異も ClinVar (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/clinvar/>) において pathogenic 変異として登録があり, いずれも MAF 値からホモ接合型変異であると考えられた. またセルブロック標本では, いずれも高い Ki-67 陽性率が観察された. 遺伝子発現解析及び, 臨床経過の比較解析については現在解析中である.



(3) オルガノイド培養パネルでの既存の抗癌剤及び新規の分子標的阻害薬ライブラリのスクリーニング実験

樹立したオルガノイド培養株より, 既存の抗癌剤及び, MEK 阻害薬や CDK4/6 阻害薬, PARP 阻害薬, 脱メチル化薬, ヒストン脱アセチル化酵素阻害薬等の単剤ないし併用による増殖抑制効果を検討したが, 優位な増殖抑制効果を示す薬剤群の選定には至らなかった. 上述の遺伝子変異解析では KRAS, TP53 の変異を検出したのみであり, 薬剤標的となりうる変異の同定は困難であった. 今後, より網羅的な遺伝子変異解析を検討するとともに, 研究段階にあるものも含めた大規模な化合物ライブラリでのスクリーニング実験を予定している.

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計4件（うち査読付論文 4件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 1件）

1. 著者名 Sugimori M, Sugimori K, Tsuchiya H, Suzuki Y, Tsuyuki S, Yoshihiro, Hirotsu A, Sanga K, Tozuka Y, Komiyama S, Sato T, Tezuka S, Goda Y, Irie K, Miwa H, Miura Yi, Ishii T, Kaneko T, Nagahama M, Shibata W, Nozaki A, Maeda S	4. 巻 111
2. 論文標題 Quantitative monitoring of circulating tumor DNA in patients with advanced pancreatic cancer undergoing chemotherapy	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Cancer Science	6. 最初と最後の頁 266 ~ 278
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1111/cas.14245	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 Morizane C., Okusaka T., Sugimori K., Furuse J et al.	4. 巻 30
2. 論文標題 Combination gemcitabine plus S-1 versus gemcitabine plus cisplatin for advanced/recurrent biliary tract cancer: the FUGA-BT (JCOG1113) randomized phase III clinical trial	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Annals of Oncology	6. 最初と最後の頁 1950 ~ 1958
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1093/annonc/mdz402	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 Kaneko Takashi, Sugimori Kazuya, Tozuka Yuichiro, Fukushima Taito, Okada Kazuya, Oka Hiroyuki, Okazaki Hiroshi, Maeda Shin	4. 巻 12
2. 論文標題 Combination chemotherapy with gemcitabine and nab-paclitaxel for a metastatic pancreatic ductal adenocarcinoma patient undergoing hemodialysis	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Clinical Journal of Gastroenterology	6. 最初と最後の頁 484 ~ 489
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1007/s12328-019-00976-w	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 Ioka T, Ueno M, Ueno H, Park JO, Chang HM, Sasahira N, Kanai M, Chung IJ, Ikeda M, Nakamori S, Mizuno N, Omuro Y, Yamaguchi T, Hara H, Sugimori K, Furuse J, Maguchi H, Furukawa M, Fukuzawa K, Kim JS, Yukisawa S, Takeuchi M, Okusaka T, Boku N, Hyodo I	4. 巻 106
2. 論文標題 TAS-118 (S-1 plus leucovorin) versus S-1 in patients with gemcitabine-refractory advanced pancreatic cancer: a randomised, open-label, phase 3 study (GRAPE trial)	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 European Journal of Cancer	6. 最初と最後の頁 78 ~ 88
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.ejca.2018.10.004	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7件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 1件）

1. 発表者名 杉森 慎, 杉森 一哉, 前田 慎ら.
2. 発表標題 Practice of Genome Diagnosis in Pancreatic Tumor
3. 学会等名 第77回日本癌学会学術総会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 杉森 一哉, 合田 賢弘, 三箇 克幸, 廣谷 あかね, 手塚 瞬, 入江 邦泰, 三輪 治生, 沼田 和司, 小寺 輝明, 稲山 嘉明, 前田 慎
2. 発表標題 膵腫瘍に対するEUS-FNA 液状化検体細胞診を用いた効率的な検体処理法の検討
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 杉森 慎, 杉森 一哉, 前田 慎ら.
2. 発表標題 膵腫瘍におけるゲノム解析-病態解明と臨床的意義 Digital PCRと次世代型シーケンサーを用いた膵腫瘍におけるゲノム診療の実践
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 杉森 慎, 杉森 一哉, 前田 慎ら.
2. 発表標題 進行膵癌における腫瘍由来血中遊離遺伝子の定量的モニタリングの有用性の検討
3. 学会等名 第105回 日本消化器病学会総会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Makoto Sugimori, Kazuya Sugimori, Shin Maeda, et al.
2. 発表標題 CLINICAL UTILITY OF THE QUANTITATIVE MONITORING OF CIRCULATING TUMOR DNA IN PATIENTS WITH ADVANCED PDAC UNDERGOING CHEMOTHERAPY
3. 学会等名 DIGESTIVE DISEASE WEEK, Poster session, 2019. (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 杉森慎、前田慎
2. 発表標題 膵癌診断におけるdigital PCRを用いたKRAS変異スクリーニングの有効性の検討
3. 学会等名 第104回日本消化器病学会総会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 杉森 慎, 杉森 一哉, 前田 慎ら.
2. 発表標題 The liquid biopsy monitoring of KRAS mutation in the subjects with advanced PDAC during chemotherapy
3. 学会等名 第78回日本癌学会学術総会
4. 発表年 2019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	芝田 涉 (Shibata Wataru) (00435819)	横浜市立大学・医学研究科・客員准教授 (22701)	

