

令和 5 年 6 月 1 日現在

機関番号：12601

研究種目：基盤研究(C)（一般）

研究期間：2018～2022

課題番号：18K07932

研究課題名（和文）膵発がん早期病変を標的とした診断マーカーの新規オルガノイドモデルを用いた探索

研究課題名（英文）Exploration of diagnostic markers targeting early-stage lesions of pancreatic carcinogenesis using novel organoid models.

研究代表者

泉谷 昌志（Izumiya, Masashi）

東京大学・大学院医学系研究科（医学部）・講師

研究者番号：90532739

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,400,000円

研究成果の概要（和文）：本研究では、オルガノイドを用いた膵発がん過程再現モデルを用いて、膵がんの予後改善につながる成果を見出すことを目的とした。まず、マウス正常膵オルガノイドに変異Krasやp53 KO等の変異を導入し、ヌードマウス皮下に移植し腫瘍形成能及び腫瘍を病理学的に評価したところ、Kras変異単独ではPanINに相当する腫瘍が、Kras変異に加えてp53等の変異を導入した場合により異型度の高い腫瘍が形成された。次に、このモデルを用いて腫瘍オルガノイドの増殖抑制効果を有する薬剤のスクリーニングを行った。約400種類の薬剤ライブラリーの化合物をスクリーニングした結果、増殖抑制を呈する化合物が複数同定された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

膵がんは代表的な難治性の固形がんであり、依然としてその予後は不良である。オルガノイドを用いた膵発がんモデルは、比較的短期間でヒトの膵がんに類似した病理組織像を持つ腫瘍の形成が可能であり、新規の治療法開発の基盤としての有用性が示された。また、Kras、p53の変異には特異的な阻害薬に乏しく、これらを有する腫瘍を抑制する候補薬が同定されたことは、新規治療標的につながるものとして有意義であると言える。

研究成果の概要（英文）：In this study, we aimed to find the results that can improve the prognosis of pancreatic cancer by using a model that recapitulates the pancreatic carcinogenesis process using organoids. First, we introduced mutations such as Kras and p53 KO into normal pancreatic organoids of mice, transplanted subcutaneously into nude mice, and pathologically evaluated tumorigenic potential and tumors. Tumors corresponding to PanIN were formed by the Kras mutation alone. Tumors with a higher degree of atypia were formed when we introduced mutations such as p53 in addition to the Kras mutation. Next, this model was used to screen for drugs that inhibit tumor organoid growth. After screening about 400 compounds from the drug library, we identified several compounds that exhibited growth inhibition.

研究分野：発がん

キーワード：膵がん オルガノイド 発がんモデル スクリーニング

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

膵がんは代表的な難治性の固形がんであり、近年化学療法の進歩も見られる一方で、その予後は依然として他の固形がんと比較して不良である。その理由として、早期発見の困難さや、進行がんに対する有効な化学療法の選択肢の少なさがあり、新規の診断・治療法の開発が強く求められている。

ヒト検体を用いた研究も重要である一方で、個人差あるいはがんの病態と直接関連性の低い遺伝子変異の存在により、その解析、意味づけは容易ではなく、ヒト検体だけを用いての研究は困難である。発がんモデルは、がんの発生・成長過程で重要な既知の因子を用いて発がん過程を再現するものであるが、ヒト検体を用いた研究の困難な点を補完するものであり有用であると言える。

近年、細胞培養においてオルガノイドを用いた3次元培養を行うことで、従来の2次元培養よりもより細胞の特性を反映した研究が可能であることが認識されており、オルガノイドを用いた発がんモデルを基盤として、新規治療開発のための研究を行うことで、新たな治療アプローチが可能になることが期待される。

2. 研究の目的

本研究は、代表的な難治性固形がんである膵がんの早期発見ならびにこれによる予後改善を実現するために、Kras, p53などの膵がん関連遺伝子を導入したマウスオルガノイドによる膵発がん過程再現モデルを応用することで、新規の診断・治療法などにつながるような手法を見出すことを目的とする。

3. 研究の方法

・マウス膵発がんモデル：CreリコンビナーゼによりKras変異、あるいはp53ノックアウトが誘導可能な遺伝子改変マウスの膵臓より樹立した膵オルガノイドに、*in vitro*でウイルスベクターによりCreリコンビナーゼを加え、変異Krasやp53 KOなどの変異を導入する。変異が誘導されたオルガノイドをヌードマウス皮下に移植し腫瘍形成能及び腫瘍を病理学的に評価する。

・薬剤スクリーニング：約400種類の薬剤からなるライブラリーを用いて、マウス皮下で形成された腫瘍から樹立した腫瘍オルガノイドに対して1 μ Mの濃度で薬剤を添加し96 well plate上で5,000 cell/well, 20 μ L Matrigel/well, duplicateでオルガノイド培養を行う。48時間の培養後に、ATPによるcell viability assayの評価を行う (CellTiterGlo 3D)。陰性コントロールと比較して、その増殖を抑制する候補薬のスクリーニングを行う。

4. 研究成果

・マウス膵発がんモデル：マウス正常オルガノイド、Kras変異導入オルガノイド、Kras/p53変異導入オルガノイドのいずれも、無血清培地で、EGF、Y-27632を添加したadvanced DMEF/F12のみで長期培養可能であった。これらを、ヌードマウスの皮下に注入し、腫瘍の形成能や形成された腫瘍の病理学的評価を確認した。Kras変異単独ではPanINに相当する腫瘍の形成が、Kras変異に加えてp53等の変異を導入した場合により異程度の高い腫瘍の形成が確認された。

・腫瘍オルガノイドを用いた薬剤スクリーニング：マルチウェルプレート上にてKrasG12D;Trp53-/-の膵臓オルガノイドから形成された皮下腫瘍由来の膵臓腫瘍オルガノイドを3次元培養し、これに約400種類の薬剤ライブラリーの化合物をスクリーニングした結果、増殖抑制を呈する化合物が複数同定された。特に増殖効果の強かったもの8種類を示す(図)。これらについては、さらに個別に複数の濃度でdose-response curveの検討を行い、再現性・有効性の確認の評価を行った。なお、最も増殖抑制効果が強いものとしてbortezomibが同定され、陰性コントロールと比して1%未満のviabilityであったが、同薬剤は多くのオルガノイドで増殖抑制効果が報告されており、真に腫瘍抑制効果を反映しているかどうかは不詳であり、さらなる慎重な検討が必要と考えられた。なお、上位8種類のものについて同じ遺伝子型(Kras/Trp53変異)を有する腸管オルガノイドとの効果の比較をおこなったところ、両者で共通して増殖を抑制する化合物が同定され、由来臓器によらず、いわゆるtissue-agnosticな治療の可能性が示唆された。

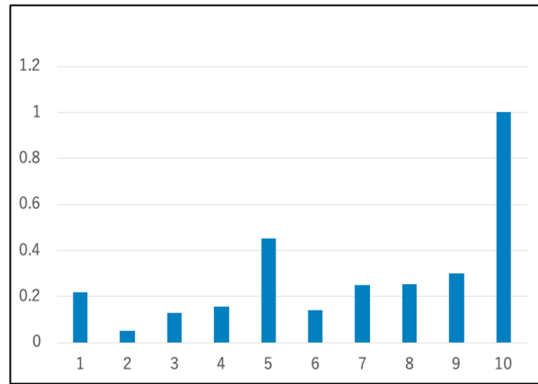


図 スクリーニングの上位8種類の薬剤の再検証時のcell viability(1-8は候補薬剤 (1 μ M)、9は gemcitabine, 10は陰性コントロール)。薬剤ごとの viability: drug 1, 0.216; drug 2, 0.049; drug 3, 0.128; drug 4, 0.156; drug 5, 0.453; drug 6, 0.139; drug 7, 0.248; drug 8 0.255, drug 9(gemcitabine), 0.301。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計2件（うち査読付論文 2件/うち国際共著 1件/うちオープンアクセス 0件）

1. 著者名 Matsuura T, Maru Y, Izumiya M, Hoshi D, Kato S, Ochiai M, Hori M, Yamamoto S, Tatsuno K, Imai T, Aburatani H, Nakajima A, Hippo Y	4. 巻 in press
2. 論文標題 Organoid-based Ex Vivo Reconstitution of Kras-driven Pancreatic Ductal Carcinogenesis	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Carcinogenesis	6. 最初と最後の頁 in press
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 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 Ochiai M, Yoshihara Y, Maru Y, Matsuura T, Izumiya M, Imai T, Hippo Y	4. 巻 in press
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 in press
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 該当する

〔学会発表〕 計1件（うち招待講演 0件/うち国際学会 1件）

1. 発表者名 泉谷昌志, 吉原靖典, 丸喜明, 落合雅子, 松浦哲也, 今井俊夫, 筆宝義隆
2. 発表標題 変異遺伝子のin vitro再構成による胆管細胞発がんの誘導
3. 学会等名 第77回日本癌学会学術総会（国際学会）
4. 発表年 2018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	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・研究所長 (82504)	

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
---------	---------