

令和 3 年 6 月 5 日現在

機関番号：11301

研究種目：若手研究

研究期間：2018～2020

課題番号：18K16297

研究課題名（和文）オルガノイド培養に基づいた胃癌個別化治療の確立

研究課題名（英文）Personalized medicine for gastric cancer patients based on organoid culture

研究代表者

山村 明寛 (Yamamura, Akihiro)

東北大学・大学病院・助教

研究者番号：30814678

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,200,000円

研究成果の概要（和文）：今回は進行胃癌の症例が少なく、大腸癌症例を使用して研究を進めた。まず、原発腫瘍組織とオルガノイドにおける遺伝子変異を比較したところ、98%から99%の遺伝子変異が一致しており、オルガノイドは生体内に近い結果が得られると思われた。さらに、最近臨床でよく使用される次世代シーケンサー（NGS）を用いた薬剤感受性予測と、オルガノイドによる薬剤感受性試験の結果を比較すると、NGSにて指摘された遺伝子変異に基づく感受性予測が一致しない症例があった。オルガノイドによる感受性予測はNGSに基づく治療戦略の限界を補完し、より精度の高い個別化医療へ貢献できる可能性を秘めていると考えられた。

研究成果の学術的意義や社会的意義

今回、消化器癌に対するオルガノイド培養を用いた薬剤感受性試験が、効果のある薬剤を選択するための有効な手段となりうることを示した。特に、現在主流となっている次世代シーケンサーを用いた遺伝子変異に基づく薬剤選択に対し、オルガノイドによる薬剤感受性試験は生体内での効果に対する予測を追加することができる。遺伝子変異によらないより臨床に近い薬剤効果判定に用いることができる可能性を示した。オルガノイド薬剤感受性試験という新たな薬剤予測の可能性を示したことで意義が大きいと考えている。

研究成果の概要（英文）：We have used colorectal cancer specimens instead of gastric cancer because of the lack of the advanced gastric cancer in surgical cases. The mutations in the primary tumor shared 98%&#8211;99% of the genes with patient derived organoid (PDO). Thus, the high similar genetic background provided us the evidence that drug response in PDO should recapitulate the original tumors. Then, we compared the Next Generation Sequence (NGS)-based drug selection, which is frequently used in clinical practice recently, and the drug sensitivity testing in PDO. The NGS-based drug selection is not necessarily overlapping with the drug response in PDO. The results of this study suggested that the molecular status of the clinical specimens are likely to represent the sensitivity in the PDOs but is not necessarily absolutely overlapping. PDO might be able to complement the limitations of the gene panel and have the potential to provide a novel precision medicine.

研究分野：消化器外科学

キーワード：オルガノイド 薬剤感受性試験 消化器癌

## 様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

### 1. 研究開始当初の背景

#### (1) 胃癌の多様性と個別化治療の必要性

胃癌は診断及び治療技術の向上、またピロリ菌の除菌や感染率の減少によって、徐々に死亡率が改善してきている。しかしながら、本邦においてはいまだに癌死亡の第3位を占め、年間約4万人あまりが胃癌によって死亡している。早期胃癌においては、外科治療の標準化が進み、治療効果は徐々に向上してきている。一方で、進行胃癌においてはいまだ改善の余地が指摘されており、手術に加え術前及び術後の適切な化学療法の選択が、生存率の向上に重要である。特に、胃癌の特徴の一つに、患者間における癌の多様性 (Heterogeneity) が挙げられ、標準化学療法の奏功率を低下させる原因となっている。また、同一腫瘍内においても癌細胞の多様性が存在し (Intratatumoral heterogeneity)、胃癌の潜在的な化学療法抵抗性を引き起こしている (Tabassum DP, *et al.*, Nat Rev Can. 2015)。これらの背景より、胃癌においてはそれぞれの患者に合わせた個別化治療が必要であると考えられる。

#### (2) 消化器組織におけるオルガノイド培養

2009年にSatoらは、組織幹細胞研究のツールとして、オルガノイド培養技術を発表した。これは小腸において、組織を最小機能単位である単一の腸陰窩に分離してマトリジェルに埋伏し、幹細胞ニッチ因子 (EGF, Wnt3a などの成長因子) を培養液に添加して培養すると、3次元の特徴的な構造体を形成するというものである。このオルガノイドには、小腸を構成する分化細胞が全て含まれ、さらにこれらの細胞は生体内と同様に機能することが証明され、臓器を模倣する *in vitro* モデルとして注目された。オルガノイドは数日で形成され、継代、保存、遺伝子導入も可能であり、*in vivo* 実験に近い新たな培養モデルとして期待されている。我々はこのオルガノイドを用いて、Runx1 のエンハンサー領域 (eR1) の活性化が、胃の幹細胞マーカーとなり得ることを証明し発表した。

#### (3) 次世代シーケンス (NGS) による遺伝子変異解析と薬剤感受性予測

固形癌に対する NGS を利用した個別化医療の効果を評価した報告では、NGS で抽出された治療を受けた患者では奏効率が 33%、病勢コントロール率が 78%であったのに対し、標準治療を受けた患者では奏効率が 6%、病勢コントロール率が 56%に留まっていた<sup>2)</sup>。しかし、NGS による遺伝子パネル検査は時間やコストがかかることが欠点であることに加え、臨床的意義が不明な遺伝子変異が同定されることも多く、効果が期待される薬剤が見つかり、さらに実際に投与に至る症例は 11%程度とも報告されている。またコンパニオン診断はバイオマーカーとされる限られた遺伝子変異の有無により行われるが、他の遺伝子変異により薬剤感受性が左右される可能性を加味することが困難である。抗 EGFR (Epidermal Growth Factor Receptor) 抗体を例にとると、当初は KRAS (v-Ki-ras2 Kirsten rat sarcoma viral oncogene homolog) 遺伝子変異の有無のみで投与可否が判断され、現在では無効と考えられる BRAF (v-raf murine sarcoma viral oncogene homolog B1) 遺伝子変異症例にも投与が行われていた事実があり、最近では新たな感受性規定遺伝子変異も報告されている事からも、適正症例の抽出にも改善の余地があると言える。このように、遺伝子変異による感受性予測のみでは限界があり、更なる進歩が望まれる。

#### (4) MAPK 経路と ERK 阻害薬

細胞外シグナル制御キナーゼ (Extracellular signal-Regulated Kinase : ERK) は MAPK 経路の最も下流に位置することから、ERK 阻害薬は BRAF・MEK 阻害薬への耐性を克服する上でも期待されており、現在様々な臨床試験が進行中である。ERK 阻害薬である SCH722984 は BRAF 変異のある癌細胞株の 88%に有効であり、KRAS 変異のある癌細胞株に対しては 49%に有効であると報告

されている。しかし、オルガノイドやヒトでの ERK 阻害薬の感受性規定因子は明確でなく、遺伝子変異に基づく薬剤効果予測と ERK 阻害薬の臨床効果とが一致していない可能性がある。これはどのシグナル伝達経路に対する阻害薬においても同様であり、遺伝子変異のみに基づく治療選択の限界とも言える。そのため、本研究では MAPK 経路と ERK 阻害薬に着目し、オルガノイドを用いて遺伝子変異と薬剤感受性の関連性を検証することとした。

## 2. 研究の目的

大腸癌における ERK 阻害薬感受性と MAPK 経路遺伝子変異の関連性を検証することである。

## 3. 研究の方法

- (1)大腸癌の臨床検体 13 症例を用いてオルガノイドを作成し、ERK 阻害薬の感受性試験を行う。
- (2) NGS によって解析した大腸癌原発巣の遺伝子変異と、ERK 阻害薬への感受性を比較する。

## 4. 研究成果

- (1) 次世代シーケンシング (NGS) を用いた大腸癌切除検体とオルガノイドに対する全エクソーム解析 (WES)

3 症例の大腸癌臨床検体において WES 解析により同定された遺伝子変異を、米国癌研究所の TCGA データベース (<https://portal.gdc.cancer.gov/>) に示されている大腸癌における変異頻度が多い順に図 1 に表記した。大腸癌で頻度の高い APC や TP53、KRAS の遺伝子変異は複数の症例で検出され、BRAF 変異のある症例は 1 例であった。TCGA データベースと本研究で認めた遺伝子変異の頻度を比較すると、概ね一致していた (図 2A)。次に、オルガノイドが原発腫瘍の特性を保持しているかどうかを確かめるために、2 症例において原発腫瘍とオルガノイドの遺伝子変異を比較検討した。検出されたすべての体細胞遺伝子変異の Allele Frequency を症例 1 と 2 で比較すると、相関係数はそれぞれ 0.89 と 0.77 であり、強い相関を示していた (図 2)。さらに、遺伝子パネル検査である MSK-IMPACT、Oncoprime、Guardant360、NCCOncoPanel、FoundationOne で用いられている遺伝子変異に絞り、Allele Frequency の閾値を 0.1 に設定したところ、原発腫瘍で認められる体細胞遺伝子変異の 98 から 99% がオルガノイドでも認められた (図 3)。

図 1 各症例における遺伝子変異

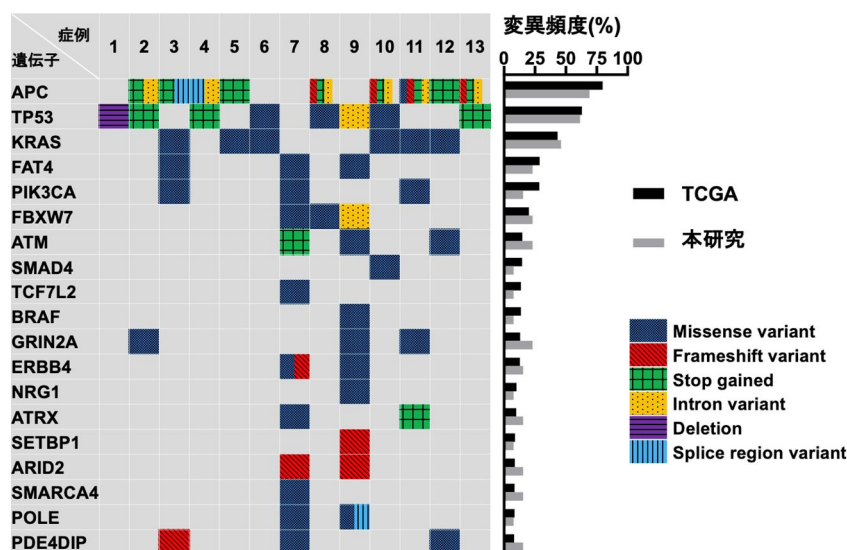


図2 原発腫瘍とオルガノイドの変異比較

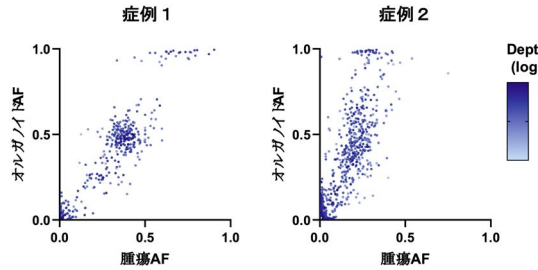
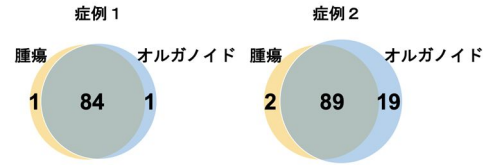


図3 原発腫瘍とオルガノイドの変異重複



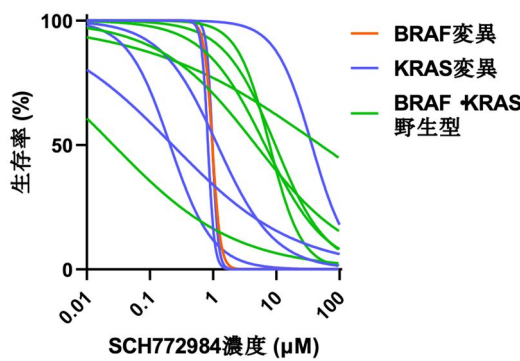
(2)オルガノイドにおける SCH772984 の感受性試験

次いで、オルガノイドに対する SCH772984 の薬剤感受性試験を行った。全 13 例の SCH772984 に対する細胞生存率曲線を図 4A に示すが、BRAF または KRAS 変異がある症例で感受性が高い傾向にあった。

次に、BRAF や KRAS 変異が SCH772984 の IC<sub>50</sub> 値と関連するか検討した。IC<sub>50</sub> 値は、BRAF や KRAS 変異がある症例では概ね 0.1 から 1 μM であるのに対し、BRAF・KRAS 野生型の症例ではほとんどが 4 μM 以上であった。

しかし、KRAS 変異群と BRAF・KRAS 野生型群とでは、IC<sub>50</sub> 値に統計的有意差は認められなかった (p = 0.24) (図 4B)。IC<sub>50</sub> 値が 2 μM よりも低い症例を感受性群とすると、BRAF または KRAS 変異のある 7 例中 6 例、BRAF・KRAS 野生型症例の 6 例中 1 例で SCH772984 に感受性があった。症例 12 は KRAS 変異があるにもかかわらず SCH772984 に耐性を示し、症例 7 は BRAF・KRAS 野生型であるにもかかわらず SCH772984 に感受性を示した (図 4C)。BRAF や KRAS 変異により SCH772984 の感受性を予測できる傾向を認めたが、遺伝子変異と関連しない症例も存在していた。

図 4 A



B

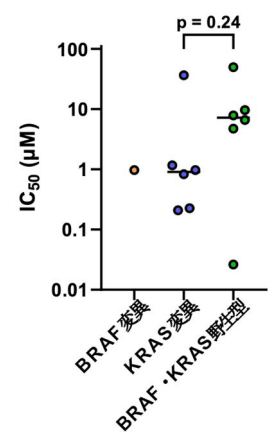


図 4 (A)大腸癌 13 症例のオルガノイドにおける SCH772984 感受性試験 (B) オルガノイドにおける SCH772984 の IC<sub>50</sub> 値を BRAF 変異、KRAS 変異、BRAF・KRAS 野生型に分けてドットプロットで示す。それぞれの IC<sub>50</sub> 値の中央値を横棒で表している。

図 4 C BRAF・KRAS 遺伝子変異と SCH772984 の感受性との関係

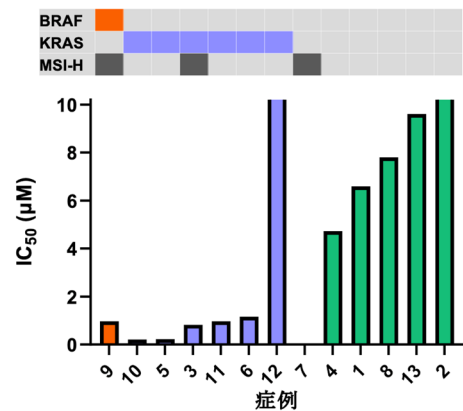


図 4 (C) パネルは、BRAF 変異、KRAS 変異、および高頻度マイクロサテライト不安定性を有する症例を表示している。13 例の SCH772984 の IC<sub>50</sub> 値を BRAF 変異、KRAS 変異、BRAF・KRAS 野生型の順に棒グラフで示している。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計1件（うち査読付論文 1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 Hodaka Tayama	4. 巻 560
2. 論文標題 The association between ERK inhibitor sensitivity and molecular characteristics in colorectal cancer	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Biochemical and Biophysical Research Communications	6. 最初と最後の頁 59-65
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.bbrc.2021.04.130	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 -

〔学会発表〕 計0件

〔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
---------	---------