

令和 4 年 6 月 2 日現在

機関番号：32612

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2019～2021

課題番号：19K07739

研究課題名(和文)胆膵がんオルガノイドをもちいた薬剤感受性試験確立と薬剤応答性メカニズムの解明

研究課題名(英文) Establishment of organoid-based drug screening testing facilitates precision chemotherapy for pancreatic cancer

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) 3,300,000円

研究成果の概要(和文)：膵臓がんオルガノイドバンクをもちいた薬剤感受性試験の結果、Tp53変異存在下でNutlin3aに対する薬剤耐性があることが再現され妥当性が示された。また、オルガノイドバンク40例の臨床情報と既存薬の感受性試験にて、PTXまたはGEMの高いIC50値は、全体的な生存率低下と有意に関連した。薬剤感受性試験の短縮に向けて、Paclitaxelとtubulin形成異常、フローサイトメトリーを用いた細胞周期分布変化を解析するSnap-organoid testを確立し、3週間以内に行うことを可能とした。高悪性度がんに迅速な精密医療を提供できる可能性が示された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

胆膵悪性腫瘍患者は年々増加し、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。化学療法は多数の患者による臨床試験結果に基づき「画一的に」行われるため、患者ごとに治療効果は異なる。同じ腫瘍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、「オーダーメイド」治療の実現が望まれている。今回は胆膵腫瘍から作成した癌オルガノイドを用いて薬剤感受性試験の開発をすすめ、短期間でその結果を得られる新規手法を開発したことから、学術的、社会的意義は高い。

研究成果の概要(英文)：The drug sensitivity of patient derived PDAC organoids recapitulated known pharmacogenetic associations using their exome sequencing data showed that organoids with TP53 mutation were more resistant to Nutlin-3a than TP53-wild-type organoids. Our system seems to be a valid platform for drug screening. We compared organoid drug sensitivity with clinical response of 40 patients. A high IC50 value for PTX or GEM in patient-derived organoids was significantly associated with an inferior overall survival of the donor patients. To rapidly identify potential responders, we further established a cell cycle-based assay that predicts drug response within 1-2 days following drug treatment. Snap-organoid test applying this technique revealed that screening procedures could be done in 3 weeks. Our results shows not only the potential of organoid-based drug screening in predicting clinical response but also the benefit of Snap-organoid test in streamlining precision treatment for aggressive cancers.

研究分野：消化器内科学

キーワード：膵臓がん オルガノイド

## 1. 研究開始当初の背景

### 1) 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癌 (Pancreatic ductal adenocarcinoma: PDAC) は 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「画一的に」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。「画一的な」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おこなわれている。

### 2) 「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 年にスフェア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、成功率が低く実用的ではなかった。今回の研究では、分担者である佐藤俊朗特任准教授が開発した、マウス消化管上皮幹細胞の画期的な培養システム方法 (Sato T et al. Nature 2009, Barker N et al. Cell Stem Cell, 2010) を用いた。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。分担者らは本培養システムを利用して、腸管上皮幹細胞ニッチを同定し (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、がん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がん幹細胞を用いた患者由来「がんオルガノイド」 (patient derived organoid: PDOs) 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 PDAC における診断治療の改善のため、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、全エクソン同定、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おこなう。最終的には PDOs 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

- (1) PDOs をもちいた high throughput screening 法による薬剤感受性試験と、エクソームシーケンスデータをを用いた妥当性の評価
- (2) PDOs の in vitro における薬物感受性と臨床情報との比較検討
- (3) PDOs の異種移植片 (ゼノグラフト) の薬物反応の比較検討
- (4) 臨床的な薬物感受性予測のための迅速な薬剤スクリーニング試験の開発とパイロットスタディ

### 4. 研究成果

- (1) 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, 全エクソームシーケンス, 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 を定義した. 川崎慎太郎らを中心に樹立した膵臓がんオルガノイド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 40 例に行った. 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 ( $p < 0.001$ ), 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.
- (2) 膵臓癌の標準的治療である nab-Paclitaxel + Gemcitabine 療法を施行し, CT での治療効果判定がなされた 14 症例において, 腫瘍縮小率と薬剤感受性試験における Paclitaxel の IC50 に相関性が認められた. このことから Paclitaxel の薬剤感受性試験の結果が nab-Paclitaxel + Gemcitabine 療法の臨床効果予測となる可能性が示唆された.
- (3) ゼノグラフトを用いて in vivo での薬剤感受性試験と in vitro での薬剤の IC50 の薬物応答の関係を検証したが, GEM,5-FU/カペシタピンについては中等度の相関があるものの, パクリタキセル, オキサリプラチンを含めたその他の薬剤については明瞭な正の相関は観察されなかった.
- (4) 結果を取得するまでに 2 か月程かかる薬剤感受性試験の短縮に向けて, 細胞周期フローサイトメトリー分析を使用して PDOs の DNA 含有量を分析する手法を応用した. Paclitaxel と tubulin 形成異常, 細胞周期分布変化を解析する「スナップオルガノイド」アッセイを確立した. 本アッセイを用いた場合, 患者検体採取, オルガノイド樹立, 薬物テストを含めたスクリーニング手順を 18 日で実行することが可能であった. 以上の結果をもとに, 現在論文投稿中である.

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 Iwasaki E, Fukuhara S, Horibe M, Kawasaki S, Seino T, Takimoto Y, Tamagawa H, Machida Y, Kayashima A, Noda M, Hayashi H, Kanai T.	4. 巻 8
2. 論文標題 Endoscopic Ultrasound-Guided Sampling for Personalized Pancreatic Cancer Treatment.	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Dianogstics	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.3390/diagnostics11030469.	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〕

なし
----

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	佐藤 俊朗  (SATO Toshiro)  (70365245)	慶應義塾大学・医学部（信濃町）・教授        (32612)	

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