

令和 5 年 6 月 6 日現在

機関番号：32612

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2019～2022

課題番号：19K08664

研究課題名(和文) 悪性胸膜中皮腫におけるMET遺伝子異常の解明と新薬の個別化治療への臨床応用

研究課題名(英文) Genetic abnormalities in malignant pleural mesothelioma and its clinical application to personalized therapy

研究代表者

川田 一郎 (KAWADA, Ichiro)

慶應義塾大学・保健管理センター(日吉)・准教授

研究者番号：00327503

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)：本研究は、予後の厳しい悪性胸膜中皮腫(malignant pleural mesothelioma; MPM)患者への新たな治療薬と個別化治療への臨床応用を目的としている。有効な臨床応用MPMモデルとして、三次元的にin vitroでつくられた臓器であるオルガノイドの樹立に成功した。樹立したオルガノイドによるゲノムシーケンスにてMPMに特異的な遺伝子変異が判明した。RNA-seqのデータから主成分解析PCAを行い、MPMは、肺癌、正常肺胞、気道上皮とは異なる分布を示した。MPMからのオルガノイドライブラリーの構築が可能となりつつあり、病態解明の有効なツールとして確立されつつある。

研究成果の学術的意義や社会的意義

分子シグナル伝達経路を標的とした新たな治療探索のため、樹立したMPMオルガノイドでRNA-seqを用いてその分子異常の把握に努める。そして、MPMにおけるMETシグナル経路異常などの生物学的意義を検証する。これにより、治療に伴うMPMの分子進化を把握し、化学療法や免疫治療に対する耐性化機序などを同定できる可能性がある。正常細胞からも樹立できるという利点から、正常細胞への毒性を考慮に入れた患者毎の薬剤スクリーニングの構築の可能性がある。一人一人の患者の治療効果予測にオルガノイドモデルを用いることで、Precision Medicineへの応用が期待される。

研究成果の概要(英文)：The aim of this study is to develop new therapeutic agents and clinical applications for individualized treatment for malignant pleural mesothelioma (MPM) patients with a severe prognosis. We succeeded in establishing an MPM model using an organoid, which is an organ made in vitro three-dimensionally. At present, 9 cases have been stably established.

We are going to strive to understand molecular abnormalities using RNA-seq. We are currently proceeding with genome sequencing using the established organoids, and found that each line has MPM-specific gene mutations. Principal component analysis (PCA) was performed from RNA-seq data, and MPM showed a different distribution from adenocarcinoma, squamous cell carcinoma, small cell lung cancer, normal alveoli, and airway epithelium. Furthermore, in order to confirm the homology with the original patient tissue, we are conducting immunostaining of organoids and verification with Xenograft models.

研究分野：肺癌, 悪性中皮腫の遺伝子異常

キーワード：悪性胸膜中皮腫 オルガノイド 薬剤感受性 Precision medicine

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

(1) 悪性胸膜中皮腫 (malignant pleural mesothelioma; MPM) 患者は、5年生存率5%、生存期間中央値12カ月という短い予後の中で、胸痛などの激しい苦痛を抱えながら永眠される。MPMに対する新たな治療法の開発は喫緊の課題である。MPMの研究が発展せず、効果的な治療法がみいだされない原因の一つは、有効な臨床応用モデルが確立されていない事である。申請者は、これらの欠点を解消する研究モデルとして、3次元培養によるオルガノイドに着目した。オルガノイドは解剖学的・機能的に生体内に存在する器官に近い特徴を示すことから、これまで研究対象とすることが比較的困難であったヒトにおけるさまざまな生命現象に迫ることが可能となった。申請者は、3次的に *in vitro* でつくられた臓器であるオルガノイドを用いた悪性胸膜中皮腫モデルの樹立に成功した。

(2) MPMにおいてMET遺伝子の異常、蛋白過剰発現が82%に報告されている。申請者らはMPM患者においてMETとその下流シグナルであるPI3K、mTORの異常、蛋白過剰発現を報告した¹⁾。肺腺癌においてすでにMETはドライバー遺伝子と認識されているが、申請者は、METシグナル経路はMPMにおいても治療標的となると考えている。

2. 研究の目的

本研究は、予後の厳しい MPM 患者への新たな治療薬と個別化治療への臨床応用を目的としている。MPM の病態解明、Precision Medicine の確立において、本研究は、以下に焦点を定め、目的とした。

(1) 他の臓器、疾患で病態解明の有効手段として確立されてきたオルガノイドモデルを MPM に応用する。一人一人の患者から得られた MPM 細胞を用いて、患者の分身としての ” ミニ臓器 ” オルガノイドの作成をいかに正確に確立させるかが課題である。

(2) オルガノイドを用いて、MET シグナルを中心とした分子標的治療の探索を行う。

3. 研究の方法

(1) 悪性胸膜中皮腫細胞によるオルガノイド作成系の樹立

肺癌患者肺および腫瘍組織からの効率の高い独自のオルガノイド樹立プロトコールが確立されている。同時に MPM 及び正常肺においても、オルガノイドの樹立に成功した。悪性胸膜中皮腫患者の数は肺癌に比較して症例数が非常に少なく、症例の集積を継続する。

(2) MPM オルガノイドモデルにおける薬剤感受性の検討

樹立した MPM オルガノイドにおいて薬剤感受性試験を行う。

(3) 樹立したオルガノイドを用いたゲノムシーケンス

MPM の遺伝子変異解析を進める

(4) MET を介するシグナル伝達経路の治療標的などを含めた新たな癌治療の探索

MET の発現や遺伝子異常と薬剤感受性の関係を明らかにする。MET 遺伝子異常とその下流シグナルやレセプタークロストークの機序を明確にし、これら複数経路の障害の効果や影響を *in vitro* で解明する。MET 以外の治療標的にも着目し、新たな癌治療の探索を行う。

4. 研究成果

(1) MPM (細胞株及び)オルガノイドの樹立: 肺癌患者正常肺および腫瘍組織からのリピングバンクの構築と、これらを用いた約 150 例の肺癌オルガノイドの作成の経験を元に、MPM においてもオルガノイドの樹立を行っている。現在までに合計 10 ラインの MPM オルガノイドを樹立できている (図 1)。

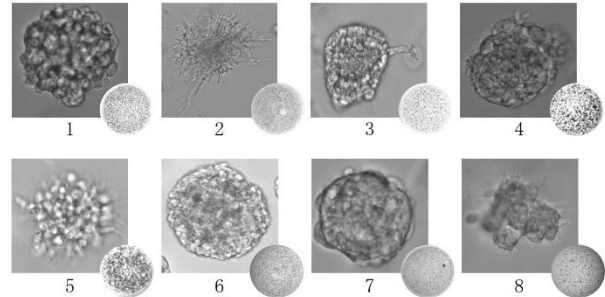


図1 樹立した悪性中皮腫オルガノイド

しかし、凍結保存後、約 20% の MPM オルガノイドにおいて、解凍後十分な増殖がみられなかった。樹立成功率を上げ、そして長期培養に適した条件を同定するため、様々なリガンド・小化合物を添加、調整しながら培養条件の検討を行っている。MPM 患者からのオルガノイド作成が確実なものとなれば、実臨床に近い形での薬剤感受性の評価が可能となり、オルガノイドを用いた患者毎の最適な治療の選択は Precision medicine に近づくと考える。

(2) MPM オルガノイドモデルにおける薬剤感受性の検討: 樹立した MPM オルガノイドにおいて薬剤感受性試験を開始している。二次元培養モデルを用いた薬剤感受性試験とも一致する良好な成績が得られつつある。しかし、一部の MPM オルガノイドにおいて、凍結保存後の解凍による生存率の低下が認められたことにより、現時点では、安定した培養条件の確立後に検討していく予定である。

(3) 樹立したオルガノイドを用いてゲノムシーケンスを進めており、それぞれのラインで MPM に特異的な遺伝子変異が認められることが判明した。RNA-seq のデータから主成分解析 PCA を行い、MPM は、腺癌、扁平上皮癌、小細胞肺癌、正常肺胞、気道上皮とは異なる分布を示した (図 2)。

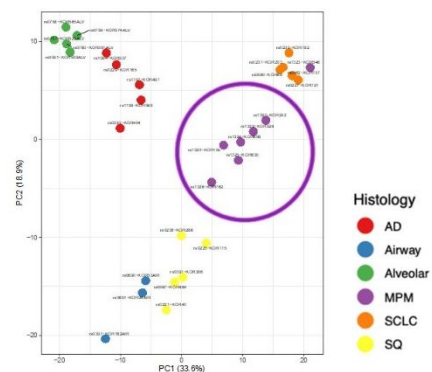


図2 悪性中皮腫の主成分分析

(4) Niche の検討で YAP 経路や FGF 経路が増殖に関与することが予測されたため、現在 RTK アレイなどでの解析を検討している。更に、もとの患者組織との相同性を確認するため、オルガノイドの免疫染色や Xenograft モデルでの検証を行っている。

<引用文献>

- 1) Kanteti R, Dhanasingh I, Kawada I, Lennon FE, Arif Q, Bueno R, Hasina R, Husain AN, Vigneswaran W, Seiwert T, Kindler HL, Salgia R. MET and PI3K/mTOR as a Potential Combinatorial Therapeutic Target in Malignant Pleural Mesothelioma.

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔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
---------	---------