

令和 5 年 6 月 23 日現在

機関番号：22701

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2019～2022

課題番号：19K09087

研究課題名(和文) 甲状腺未分化癌患者由来オルガノイドによる新規薬剤感受性予測とバイオマーカーの確立

研究課題名(英文) Establishment of novel drug susceptibility testing and biomarker using anaplastic thyroid cancer organoid

研究代表者

菅沼 伸康 (SUGANUMA, Nobuyasu)

横浜市立大学・医学部・講師

研究者番号：40724927

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)：本研究では、甲状腺未分化癌を中心とした患者由来オルガノイド(PDO)を作成し、これを用いた薬剤感受性予測法の確立にとりくんだ。Sachsらが報告した方法をもとに、甲状腺腫瘍PDOに適した条件設定を行い、安定した樹立方法と各組織型の特徴を保持したPDOであることを確認した。次に薬剤感受性試験を行いIC50の設定や薬剤治療前後の変化を確認した。しかし、コロナ禍における手術症例の減少による症例数の伸び悩みにより、短期間での薬剤感受性予測方法の確立と各薬剤の感受性バイオマーカーの同定には至らなかった。引き続き症例を蓄積し、甲状腺癌のプレジジョンメディシン実現にむけて検討していきたい。

研究成果の学術的意義や社会的意義

甲状腺未分化癌は1年生存率5～20%と予後不良な疾患であり、分子標的薬の出現により予後の改善が期待されたが十分な効果は得られておらず、これは甲状腺癌の他の組織型についても同様である。要因の一つとして、既存の甲状腺癌細胞株では遺伝子異常と脱分化が生じているため、薬剤感受性を含めた基礎研究が行えないことがあげられている。現時点では、本研究の目的である、短期間での薬剤感受性予測方法の確立と各薬剤の感受性バイオマーカーの同定には至っていないが、各組織型の特徴を保持した甲状腺腫瘍PDOの安定した作成に成功しており、今後の甲状腺腫瘍における基礎研究に貢献できると考えている。

研究成果の概要(英文)：In this study, we generated patient-derived tumor organoids (PDOs) mainly from undifferentiated thyroid carcinomas and established a method for predicting drug sensitivity using these PDOs. Based on the method reported by Sachs et al. we set up suitable conditions for thyroid PDOs and confirmed a stable establishment method and retention of the characteristics of each histological type. Next, drug sensitivity testing was conducted to confirm the IC50 settings and changes before and after drug treatment. However, due to the slow growth in the number of cases caused by the decrease in the number of surgical cases of coronary disaster, we were unable to establish a method for predicting drug sensitivity in a short period of time and to identify biomarkers of sensitivity for each drug. We will continue to accumulate cases and study the possibility of realizing precision medicine for thyroid cancer.

研究分野：内分泌外科

キーワード：甲状腺癌 オルガノイド

1. 研究開始当初の背景

甲状腺未分化癌は全甲状腺悪性腫瘍の 1.4% と少ないが、甲状腺癌関連死の約 1/3 を占める。急速な増大と周囲臓器への浸潤により切除不能であることが多く、根治切除が行えたとしてもその高い悪性度からほとんどの場合局所再発、遠隔転移をきたす。また、およそ半分の症例では診断時すでに遠隔転移が認められており、生存期間の中央値は 5.1 か月～ 9.4 か月、1 年生存率は 5～20% と非常に予後不良な疾患である。治療成績向上のために、拡大手術や多剤併用化学療法、化学放射線療法など試みられてきたが、現在まで予後の改善に至っていない。

こうした状況の中、タキサン系抗癌剤の一つであるパクリタキセル (paclitaxel; PTX) の術前投与により、遠隔転移のない Stage IVB 症例の予後を改善する可能性が報告された。従来の抗癌剤レジメンよりも副作用が少なく、汎用性が高いためキードラッグの一つと考えられるが、その奏効率は 20% 程度であり、増殖速度が極めて速い本癌種において、効果が得られなかった場合には気道閉塞や頸部出血などで致命的になることが課題として挙げられる。

一方、2015 年には分子標的薬レンパチニブ (Lenvatinib; LEN) が発売され、甲状腺未分化癌にも保険適用となった。LEN は、VEGFR1-3/FGFR1-4/PDGFR/c-KIT/RET を標的とし、血管新生阻害作用や細胞増殖抑制作用により抗腫瘍効果を発揮するチロシンキナーゼ阻害薬 (Tyrosine kinase inhibitor; TKI) である。国内第 2 相臨床試験 (208 試験) では、奏効率 23.5%、無増悪生存期間 7.4 か月、全生存期間 10.6 か月と既存の薬剤と比較して改善が認められたが、十分な奏効率や生存期間が得られていない。

上記問題点を解決するためには各薬剤の効果予測が重要であると考え、申請者らのグループはこれまでに PTX 並びに LEN の効果予測因子に関する研究を行ってきた。PTX は微小管に結合して脱重合を阻害することで紡錘体形成を障害して抗腫瘍効果を発揮する。そこで作用機序に関与する紡錘体チェックポイントに着目して構成因子の mRNA 発現を検討し、BUB1/BUBR1/BUB3/MAD2 が高発現していることを証明した。さらに、自施設少数例で上記因子の発現と PTX 治療効果を検討したところ、MAD2 高発現群は奏効率が高く効果予測因子として有用である可能性を見出し、国内第 2 相試験「甲状腺未分化癌に対する Weekly paclitaxel による化学療法の認容性、安全性に関する前向き研究」での症例を用いて追加検討したが、効果予測因子としての可能性は否定された。また、LEN に関してもターゲットである VEGFR を中心に標的因子の発現と治療効果を解析したが、有意な因子を見出すことはできなかった。その他いくつかの単一因子に注目した既報告はあるが、いずれも臨床に応用可能な効果予測因子を同定するには至っていない。

こうした標的因子に注目した薬剤効果予測とは別に、近年、個々の患者ごとに有効な薬剤を選択し、それを施すプレジジョンメディシンを目指した研究が国内外で行われている。抗がん剤感受性試験は、患者腫瘍から採取した細胞又は組織を培養し、抗がん剤の感受性を *in vitro* で解析する検査法であり、細胞株を用いる SDI 法、CD-DST 法や組織を用いる HDRA 法が先進医療として取り扱われてきた。これらの試験は、がんの個別医療の確立に寄与する検査法として脚光を浴びたが、真陰性率は高いものの真陽性率が低く、無効な薬剤を排除することには貢献したものの有効な薬剤の選択肢を示すことはできなかった。その原因として、腫瘍の heterogeneity や血管新生阻害作用を持つ薬剤の評価ができないことなど、複雑な生体内環境が反映されていないことが挙げられている。

これに対し、生体内環境が擬似されるように患者由来組織をそのままマウスに移植して評価

する Patient Derived Xenograft (PDX) が開発され注目されている。上記に記したような従来の薬剤感受性試験の問題点を補う優れた方法だが、原発巣では見られない遺伝子変異が多く見られること、生着には多くの細胞が必要なこと、樹立に時間がかかること、樹立成功率が低いことなどの課題が残る。

2. 研究の目的

本研究では、甲状腺未分化癌に対するすべての薬剤に適応可能かつ短期間で薬剤感受性予測方法の確立と、レンパチニブを中心とした各薬剤の感受性バイオマーカーの同定を目的とした。

前述した PDX の問題点を解決する方法として、近年 Patient Derived Organoid (PDO) が開発され、注目を集めている。PDO は生体内を擬似した培養方法であり、古くから発生生物学や幹細胞分野を中心に発展してきた方法が基になっている。さらに、がん組織の間質細胞から得られる成長因子や阻害剤等を添加物として培地に加えることで生体内の腫瘍環境を再現し、PDX で問題となる遺伝子変異の発生や必要細胞数、樹立までの時間、樹立成功率の低さなどが改善されるようになった。PDO は乳癌患者の論文を皮切りに、消化器系癌など様々な癌種の報告がされているが、現在までに甲状腺未分化癌 PDO の報告はない。このため、最初に甲状腺未分化癌 PDO を作成し、それを用いてすべての薬剤に対応した薬剤感受性評価系の確立をめざした。

また、レンパチニブを代表とする TKI は、血管新生阻害作用が腫瘍縮小に関与しているため *in vivo* での評価が必要だが、多くの細胞量や樹立までの時間が長いといった課題が残る。これに対して、PDO 培養で増殖した腫瘍を PDX に移植する方法を用いることで、短期間で *in vitro* / *vivo* 双方に対応した薬剤感受性評価系を確立することを目指した。この方法により、PDX 作成期間を約半年から 5 週間に短縮できると考えている。

最後に、臨床での治療結果を基に、薬剤奏功患者由来 PDO (PDO-S) と薬剤耐性患者由来 PDO (PDO-IS) の分泌タンパク質を網羅的に比較検討するセクレトーム解析を行い、申請者らのグループが開発した数理モデルを活用することで効率的に薬剤感受性予測マーカーの同定を目指した。

3. 研究の方法

(1) PDOの作成

- ・生体試料の摘出と保存

甲状腺未分化癌患者の生検試料を 1-3 mm³ にカットし、写真撮影後一部を急速凍結後 -80 で保存する。

- ・PDOの作成

残りの試料を用いて PDO を作製する。PDO 作製方法は Sachs らが報告した方法に準じて行う (Sachs et al. Cell 2018)。

(2) 薬剤感受性評価系の確立と臨床結果との比較

本研究計画では、*in vitro* での薬物評価を 1 週間、*in vivo* の薬物評価を3週間に設定し、検体取得から最長で 5 週間という短期間で薬剤感受性評価系の確立を目指す。

- ・*in vitro* での薬剤感受性評価

PDO 培地中に異なる濃度の PTX、レンパチニブを添加し、IC 50 を算出する。

- ・*in vivo* での薬剤感受性評価

PDO をヌードマウスの皮下に移植し、1 週間後からPTX、レンパチニブを 3 日毎に尾静脈投与

し、腫瘍の大きさを記録する。

・上記で得られた結果と臨床結果を比較検討する。

(3) セクレトーム解析とマーカー分子の同定

本研究計画では、臨床での治療結果を基に、薬剤奏功患者由来 PDO (PDO-S) と薬剤耐性患者由来 PDO (PDO-IS) の分泌タンパク質を網羅的に比較検討するセクレトーム解析を行い、レンパチニブを中心とした感受性予測マーカーの同定を目指す。

・定量プロテオミクス解析

PDO-S と PDO-IS を、血清を含まない培地で2日間培養後の培地を回収し、定量プロテオミクス解析 (iTraQ) により網羅的かつ定量的に両者の違いを明らかにする。

・定量プロテオミクス解析で得られたデータの数理モデル解析

申請者らが開発した浸潤ネットワークモデルとキープス解析を拡張し、定量プロテオミクス解析で得られたデータからマーカー分子の有望な候補を効率的に抽出する。

・甲状腺未分化癌患者血清を用いた薬剤感受性予測マーカーの検討

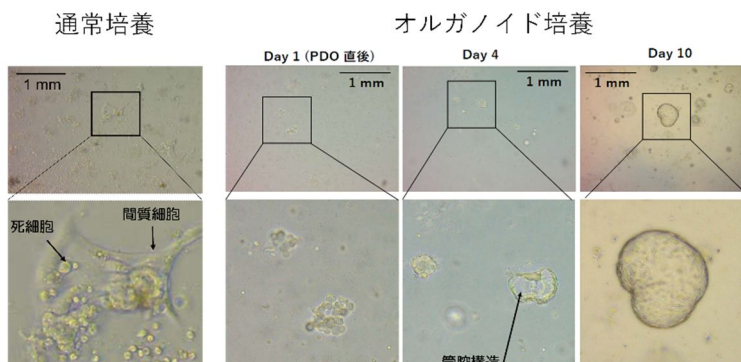
生検時に同時に取得、保存した患者血清を用いて、血液中の薬剤感受性予測マーカーの量を ELISA によって定量し、臨床結果と比較検討する。

4. 研究成果

(1) PDOの作成

まずは、いまだ確立されていない甲状腺未分化癌の樹立を目標として研究を進めた。神奈川県立がんセンターと共同研究2施設 (横浜市立大学附属病院、横浜市立大学附属市民総合医療センター) において診断・採取された甲状腺未分化癌より、Sachs らが報告した方法 (Sachs et al. Cell 2018) を基準として、甲状腺癌のオルガノイドに適した条件設定を行った。また、甲状腺未分化癌としての生物学的特徴を有しているかどうかを確認するためには、甲状腺分化癌を中心とした他の組織型の甲状腺癌や正常甲状腺組織との比較が重要となる。このため、甲状腺未分化癌以外に、正常甲状腺組織や他の組織型の甲状腺癌のオルガノイド作成も行った。その結果、現在までに甲状腺未分化癌オルガノイド株と、様々な組織型の甲状腺癌並びに甲状腺正常組織のオルガノイドを作製することができた (図1)。

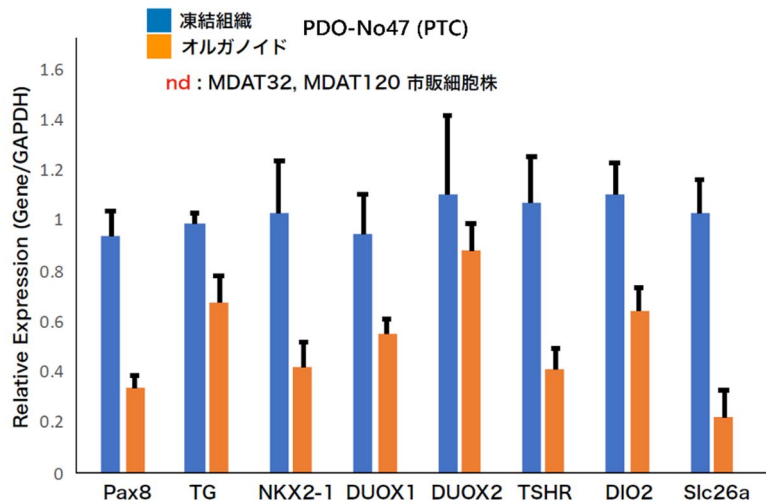
(図1) 培養法による成長の違い



通常培養では生育しない甲状腺癌細胞が、組織型にかかわらずオルガノイド培養では生育する。

また、これらのオルガノイドに対して、サイログロブリンやPax8、TSH受容体などの分化マーカーの発現評価を行い、それぞれの組織型において特徴を維持した結果を得ることができた (図2)。

(図2) 分化マーカーの維持



甲状腺分化マーカーの発現をReal time PCRを用いて検討したところ、凍結組織での発現には劣るものの、オルガノイドでは各因子の発現を確認できた。一方、市販の甲状腺乳頭癌細胞株 (MDAT32, MDAT120) では発現がみられなかった。

(2) 薬剤感受性評価系の確立

上記手法により確立した甲状腺癌オルガノイドを用いて、レンパチニブ感受性およびレンパチニブ処理後の甲状腺分化マーカーの変動を解析した。まず、オルガノイドと既存の細胞株に異なる濃度のレンパチニブを処理し、IC 50 を求めたところ、オルガノイドのIC50は43 μ Mであることが分かった。次に、これらの細胞にレンパチニブを IC 50 の濃度で処理後、分化マーカーである Thyroglobulin, TFF1, Pax8, NISの変動を検討したところ、分化マーカー (Tg, TFF1, Pax8, NIS) の発現は、レンパチニブ投与前後で大きな変動を認められなかった。

続いて、in vivo での薬剤感受性評価を行うため、PDO をヌードマウスの皮下に移植し、1週間後からPTX、レンパチニブを3日毎に尾静脈投与し、腫瘍の大きさを記録する計画を立てていたが、コロナ禍における手術症例の減少により、未分化癌患者をはじめとした症例数を伸ばすことができず、1年間の研究延長申請を行ったものの十分な検体量の確保ができなかったため、以降の解析は今後引き続き検体の確保に努めつつ継続し、甲状腺癌のプレジジョンメディスン実現をめざすこととした。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計2件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 菅沼伸康
2. 発表標題 甲状腺濾胞性腫瘍並びに濾胞癌オルガノイドの樹立と良悪性の鑑別に対する試み
3. 学会等名 第34回日本内分泌外科学会総会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 菅沼伸康
2. 発表標題 甲状腺乳頭癌オルガノイドを用いた薬剤感受性と甲状腺分化マーカーの変動
3. 学会等名 第33回日本内分泌外科学会
4. 発表年 2021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	宮城 洋平 (Miyagi Yohei) (00254194)	地方独立行政法人神奈川県立病院機構神奈川県立がんセンター（臨床研究所）・臨床研究所・所長 (82713)	
研究分担者	益田 宗孝 (Masuda Munetaka) (10190365)	横浜市立大学・医学研究科・客員教授 (22701)	

6. 研究組織（つづき）

	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	星野 大輔 (Hoshino Daisuke) (30571434)	地方独立行政法人神奈川県立病院機構神奈川県立がんセンター（臨床研究所）・その他部局等・部長代理 (82713)	
研究分担者	利野 靖 (Rino Yasushi) (50254206)	横浜市立大学・附属病院・准教授 (22701)	
研究分担者	中山 博貴 (Nakayama Hirotaka) (60438158)	横浜市立大学・医学研究科・客員講師 (22701)	
研究分担者	吉田 達也 (Yoshida Tatsuya) (70748350)	横浜市立大学・医学部・助教 (22701)	

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