

令和 4 年 6 月 27 日現在

機関番号：24701

研究種目：若手研究

研究期間：2019～2021

課題番号：19K16806

研究課題名(和文) ヒト肺がんオルガノイドを用いたプレジジョンメディシンに向けた基盤研究

研究課題名(英文) Basic Research Toward Precision Medicine Using Human Lung Cancer Organoids

研究代表者

小柳 潤 (Jun, Oyanagi)

和歌山県立医科大学・バイオメディカルサイエンスセンター・助教

研究者番号：80716069

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)：和歌山県立医科大学呼吸器内科・腫瘍内科において気管支鏡生検を受けた患者より提供された検体を用いて培養を行い、オルガノイドの樹立に成功した。培養に成功したオルガノイドを免疫不全マウスへ移植したところ、造腫瘍性が確認された。また、次世代シーケンズ解析を行ったところ、臨床検査において検出されたドライバー遺伝子変異がオルガノイドでも検出されることが明らかになり、本研究で樹立されたオルガノイドは患者の腫瘍細胞に由来することが示された。さらに、エルロチニブおよびオシメルチニブ耐性を示す患者から樹立されたオルガノイドの薬効評価を行ったところ、両薬剤への耐性を示すとともに、それを克服しうる薬剤を見出した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

個別化医療の実現を実現するためには、各患者由来のがん細胞を詳細に解析することが必須である。しかしながら、がん組織からの細胞株化効率が低い事が大きな障壁となっている。また、肺がんは進行期で発見されることが多く、また生検の侵襲性が高いため、繰り返し検体を採取することが困難である。本研究では気管支鏡生検検体よりオルガノイドを樹立することに成功した。本研究の試みから、治療に伴う薬剤耐性獲得時のオルガノイドを樹立することで、治療抵抗性の克服の探索をはじめ、創薬等への応用が期待される。

研究成果の概要(英文)：Organoids were successfully established by culture using specimens provided by patients who underwent bronchoscopic biopsy at the Internal Medicine III, Wakayama Medical University. The cultured organoids were transplanted into immunodeficient mice, and tumorigenicity was confirmed. Next-generation sequencing analysis revealed that the driver gene mutations detected in the clinical test were also detected in the organoids, indicating that the organoids established in this study were derived from the patient's tumor cells. Furthermore, drug evaluation of organoids established from patients showing resistance to erlotinib and osimertinib revealed resistance to both drugs as well as drugs that could overcome it.

研究分野：腫瘍生物学

キーワード：オルガノイド 肺がん

## 1. 研究開始当初の背景

近年の肺がん薬物療法は種々の分子標的治療薬の開発により目覚ましい進歩を遂げている。Epidermal Growth Factor Receptor(EGFR)変異や EML4-ALK をはじめとする融合遺伝子等のドライバー遺伝子変異が数多く報告されている。これらの変異をもつ患者に対する分子標的治療は従来の化学療法に対し非常に良好な成績を収めている。しかし分子標的薬は一時的に効果が認められても、がん細胞が薬剤耐性を獲得する事で、再度病勢が進行する事が大きな問題となっている。特に EGFR チロシンキナーゼ阻害剤(EGFR-TKI)や ALK 阻害剤では多様な耐性の出現が報告されており、耐性獲得時の治療戦略の確立が喫緊の課題である。また、PD-1 を標的とする免疫チェックポイント阻害剤は PD-L1 陽性率がコンパニオン診断に用いられているが、PD-L1 陰性症例でも効果が認められる。PD-L1 以外にも Tumor Mutation Burden(TMB)がバイオマーカーの候補として有望とされているが、その解析コストをはじめ実用化への課題は多く、更なるバイオマーカーの開発が急務となっている。

個別化医療の実現を実現するためには、各患者由来のがん細胞を詳細に解析することが必須である。しかしながら、がん組織からの細胞株化効率が低い事が大きな障壁となっている。また、培養が生体と大きく異なる単層培養法で行われることも大きな問題のひとつである。そのため、生体と同様の 3次元環境で細胞を培養する三次元培養法を用いた研究が広く行われ始めている。そのなかでも最近ではオルガノイド培養法を用いたがん研究が盛んになりつつある。オルガノイド培養法はマウス正常小腸由来細胞の培養を皮切りに、ヒトがん組織からの細胞培養に応用されており、これまで培養が困難であったがん腫でも培養が可能になっている。以上を鑑みると、オルガノイドを駆使する事で生体を反映した条件下で肺がん細胞の挙動を詳細に解析する事が可能となり、がん研究における新たな切り口を創成できる可能性が考えられる。そこで本研究では、肺がん患者より提供されたがん組織検体よりオルガノイドを樹立、バンキングし、これを用いて薬剤耐性機序とその克服法の解明、治療効果予測バイオマーカーの探索などに応用し、さらなる個別化医療、プレジジョンメディシンを展開する事である。

## 2. 研究の目的

本研究の目的は、肺がん患者より提供されたがん組織検体よりオルガノイドを樹立、バンキングし、これを用いて薬剤耐性機序とその克服法の解明、治療効果予測バイオマーカーの探索などに応用し、さらなる個別化医療、プレジジョンメディシンを展開する事である。

## 3. 研究の方法

(1) 肺がん患者生検検体及び胸水検体からのオルガノイド樹立：肺がん患者手術検体及び生検検体からのオルガノイド樹立：肺がん患者より提供された気管支鏡生検検体、超音波ガイド下生検検体、胸腔鏡下生検検体および胸水よりオルガノイドの樹立を行った。

(2) オルガノイドの造腫瘍性と組織学的検討：培養されたオルガノイドが腫瘍細胞由来であることを確かめるため、核異型など細胞学的異常が認められるかを評価した。また NSG マウスへ移植し、培養したオルガノイドの造腫瘍性を検討した。

(3) オルガノイドの遺伝子変異・遺伝子発現解析：診断時に検出されたドライバー遺伝子変異がオルガノイドで維持されているかを確かめるため、培養に成功したオルガノイドの DNA を抽出し、次世代シーケンサーを用いた遺伝子変異解析を行った。遺伝子変異は代表的ながん遺伝子、がん抑制遺伝子のホットスポット変異を解析した。

(4) 薬効評価：遺伝子変異、遺伝子発現といったオルガノイドの特性解析の結果を踏まえて薬効評価を行った。

4. 研究成果和歌山県立医科大学において、2019年5月から2021年8月までに178名の患者が登録された。適格基準を満たした161名の患者から提供された180検体を用いてオルガノイドの培養を試みた(図1)。悪性腫瘍の種類は、非小細胞肺癌(NSCLC)/SCLC/その他、102/14/4であった。合計24個の凍結保存に成功した。培養したオルガノイドは、組織サンプルを用いた臨床検査で検出されたものと同じ変異を保有していることが確認された。さらに、13個のオルガノイドが異種移植も

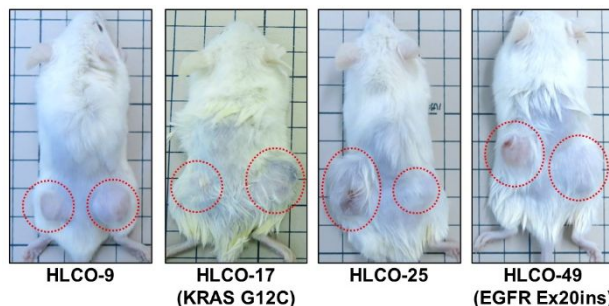


図2 オルガノイドの造腫瘍性

デルで腫瘍を形成した(図2)。成立率は18.3%(23/126)であった。なお、本研究では凍結保存

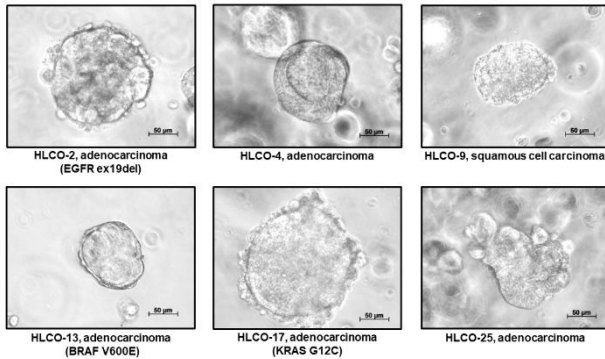


Fig.1 オルガノイドの形態 (A)

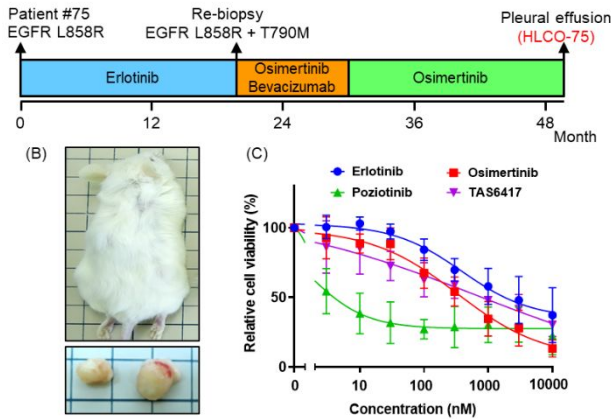


図3 オルガノイドの薬効評価

に成功し、かつ像腫瘍性を認めたオルガノイドについて樹立成功と定義した。EGFR変異陽性患者においてエルロチニブ、オシメルチニブ治療に耐性を獲得した際の胸水検体よりオルガノイドを作成した(図3)。遺伝子変異解析の結果、オルガノイドにおいてはEGFR T790M変異を認めず、ERBB2 V777L変異が検出された。このオルガノイドを用いた薬効評価を実施した結果、エルロチニブ、オシメルチニブへの感受性を認めず、pan-HER阻害剤であるpoziotinibに対して高い感受性を示した。

Dijkstraらの先行研究では、外科手術検体を用いた肺がんオルガノイドの樹立成功率は17%であった。本研究は外科手術のように腫瘍量が確保できない生検検体でも、外科手術検体と同程度の成功率で肺がんオルガノイドの樹立が可能であることを明らかにした。一方、これまで報告されている大腸がんオルガノイドの樹立成功率と比較すると、本研究を含めた肺がんオルガノイドの樹立成功率はいまだ低いままである。今後はニッチ因子を含めた培養条件の最適化等が必要となると考えられる。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計4件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 1件）

1. 発表者名	Jun Oyanagi, Yasuhiro Koh, Koichi Sato, Masanori Tanaka, Katsuyuki Furuta, Takeya Sugimoto, Ryota Shibaki, Shunsuke Teraoka, Daichi Fujimoto, Nahomi Tokudome, Hiroaki Akamatsu, Atsushi Hayata, Yuichi Ozawa, Hiroki Ueda, Nobuyuki Yamamoto
2. 発表標題	Establishment of organoids derived from patients with advanced thoracic malignancies
3. 学会等名	第18回日本臨床腫瘍学会学術集会
4. 発表年	2021年

1. 発表者名	Jun Oyanagi, Yasuhiro Koh, Koichi Sato, Masanori Tanaka, Katsuyuki Furuta, Takeya Sugimoto, Ryota Shibaki, Shunsuke Teraoka, Daichi Fujimoto, Nahomi Tokudome, Hiroaki Akamatsu, Atsushi Hayata, Yuichi Ozawa, Hiroki Ueda, Nobuyuki Yamamoto
2. 発表標題	Establishment of organoids derived from patients with advanced thoracic malignancies
3. 学会等名	AACR ANNUAL MEETING 2020 (国際学会)
4. 発表年	2020年

1. 発表者名	Jun Oyanagi, Yasuhiro Koh, Koichi Sato, Hiroaki Akamatsu, Hiroki Ueda, Nobuyuki Yamamoto
2. 発表標題	Establishment of organoids derived from patients with advanced thoracic malignancies
3. 学会等名	第80回日本癌学会学術総会
4. 発表年	2021年

1. 発表者名	小柳 潤、洪 泰浩、佐藤 孝一、杉本 武哉、柴木 亮太、寺岡 俊輔、藤本 大智、徳留 なほみ、早田 敦志、小澤 雄一、赤松 弘朗、中西 正典、上田 弘樹、山本 信之
2. 発表標題	Establishment of organoids derived from patients with advanced thoracic malignancies
3. 学会等名	第62回日本肺癌学会学術集会
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
--	---------------------------	-----------------------	----

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