

令和 3 年 6 月 20 日現在

機関番号：12102

研究種目：若手研究

研究期間：2019～2020

課題番号：19K18139

研究課題名（和文）ヒト膵癌3Dオルガノイドバイオバンクの構築と膵癌特異的糖鎖の探索

研究課題名（英文）Construction of human pancreatic cancer 3D organoid biobank and search for pancreatic cancer-specific sugar chains

研究代表者

大和田 洋平（Owada, Yohei）

筑波大学・医学医療系・助教

研究者番号：00819584

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）：手術で採取した膵切除検体を用いて、ヒト膵癌3Dオルガノイド培養の手技を確立した。2020年4月27日から2021年1月18日までに25症例のヒト膵癌検体から計19種類のオルガノイド樹立に成功した。樹立成功率76%（19/25例）と既報と同程度であった（Tiriác H et al, Cancer Discovery 2018）。「ヒト膵癌3Dオルガノイドバイオバンク」を構築し、作成したオルガノイドは冷凍保存し、解凍、培養継続を確認している。バンク化したオルガノイドを用いて膵癌特異的糖鎖、レクチンを解析中である。

研究成果の学術的意義や社会的意義

3Dオルガノイド培養は従来の2D平面培養系よりも癌の生物学的特性をより忠実に反映しており癌研究を飛躍的に進歩させる可能性を秘めている。作成したオルガノイドをバイオバンク化することで、状態の良いオルガノイドを用いて様々な解析が可能となる。ヒト膵癌由来の3Dオルガノイドのバンク化は国内外でも例が少なく、今回バンク化に成功したことは今後の膵癌研究に大きな役割を果たす可能性を秘めている。

研究成果の概要（英文）：A technique for culturing human pancreatic cancer 3D organoids was established using surgically collected pancreatic excision specimens. From April 27, 2020 to January 18, 2021, a total of 19 organoids were successfully established from 25 human pancreatic cancer specimens. The success rate of establishment was 76% (19/25 cases), which was about the same as the previously reported (Tiriác H et al, Cancer Discovery 2018). A "human pancreatic cancer 3D organoid biobank" has been constructed, and the created organoids are stored frozen and the continuation of culture has been confirmed. Pancreatic cancer-specific sugar chains and lectins are being analyzed using banked organoids.

研究分野：オルガノイド

キーワード：3Dオルガノイド バイオバンク 膵癌 レクチン

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

膵癌は難治性悪性腫瘍の代表である。我々はこれまで癌細胞の最外層を覆う糖鎖に着目し、糖鎖をターゲットとする膵癌治療法の研究開発を進めてきた (Shimomura O et al, Molecular Cancer Therapeutics 2018)。3D オルガノイド培養は、Sato らが腸管上皮幹細胞培養技術 (腸管オルガノイド培養) を開発して以降 (Sato T et al, Nature. 2009)、様々な臓器で応用されている。3D オルガノイド培養の特徴は、従来の 2D 平面培養系よりも癌の生物学的特性をより忠実に反映することで、癌研究を飛躍的に進歩させる可能性を秘めている。

医学研究において、臨床での応用を出口とするためには、臨床で得られたヒト試料を用いた研究が必要不可欠である。筑波大学では 2013 年 11 月に「つくばヒト組織バイオバンクセンター」を設立し、組織、血液の採取、保存のシステムを確立し、保存検体を用いた研究を行ってきた。このノウハウを用いて新たに「ヒト膵癌 3D オルガノイドバイオバンク」の構築を目指す。我々が構築する 3D オルガノイドバンクを利用して、患者毎から作成した各々のオルガノイド腫瘍からライセートを抽出し、これまで確立した高密度レクチンマイクロアレイを用いて糖鎖解析を行い、複数の糖鎖発現パターンで膵癌の早期発見を目指すことが可能ではないかと着想した。

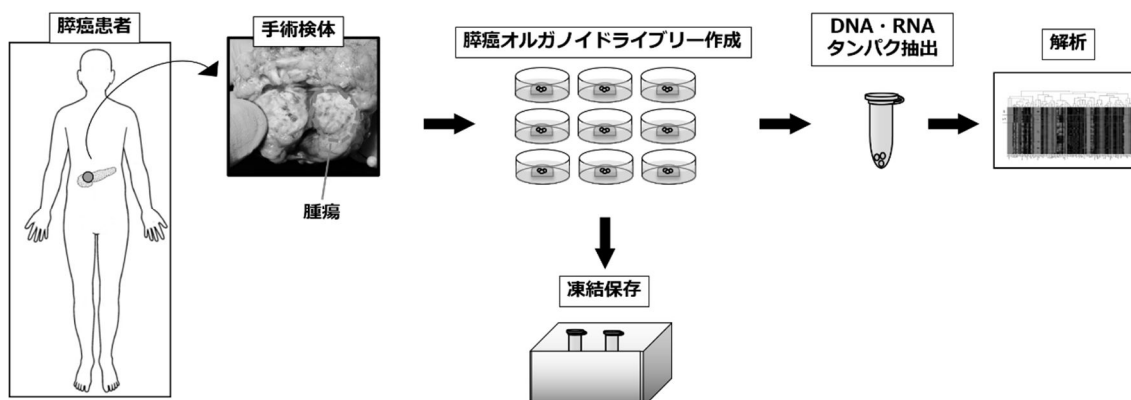
2. 研究の目的

ヒト膵癌の 3D オルガノイド培養の手技を確立し、「ヒト膵癌 3D オルガノイドバイオバンク」を構築することを目的とする。さらに、作成したオルガノイドを用いて膵癌に特異的な糖鎖の解析、対応するレクチンの同定を行い、膵癌の早期診断法の確立を目指す。

3. 研究の方法

筑波大学消化器外科における膵癌手術検体から腫瘍部位および非腫瘍部位それぞれの切片を作成し、細胞抽出を行った後、3D オルガノイド細胞株の樹立を行う。樹立したオルガノイド細胞株から DNA、RNA、タンパクを抽出し解析を行うとともに、冷凍保存しバンク構築を行う (図 1)。

図 1: オルガノイドバイオバンクの構築、解析まで



4. 研究成果

2020年4月27日から2021年1月18日までに計41症例の膵切除検体（膵癌25例、膵嚢胞性疾患11例、膵神経内分泌腫瘍4例、十二指腸乳頭部癌1例、胆管癌1例）から計23種類のオルガノイド樹立に成功、膵癌では樹立成功率76%（19/25例）と既報と同程度であった（引用文献）。樹立した19例の一覧および代表的な写真を下（図2.3）に示す。これらの大部分で冷凍保存、解凍、培養継続に成功しておりバンクとして機能することを確認した。

図2：当研究室で樹立した膵癌3Dオルガノイド

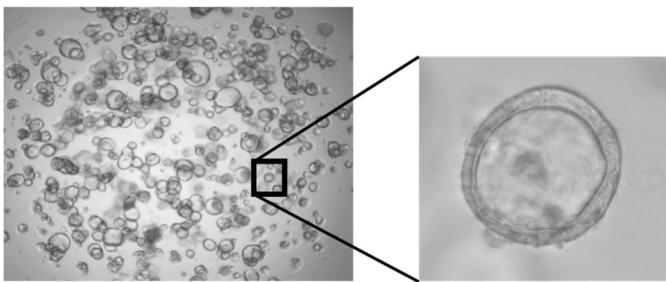
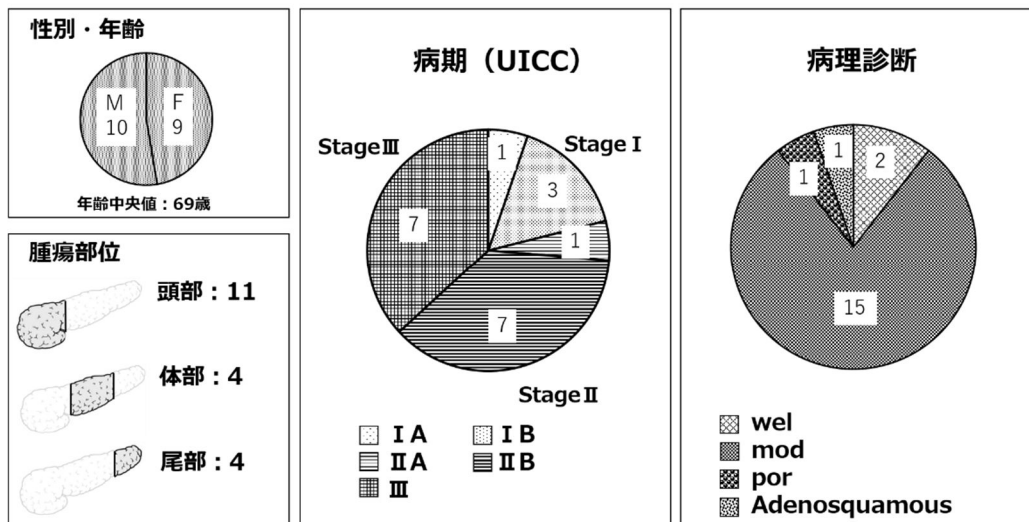


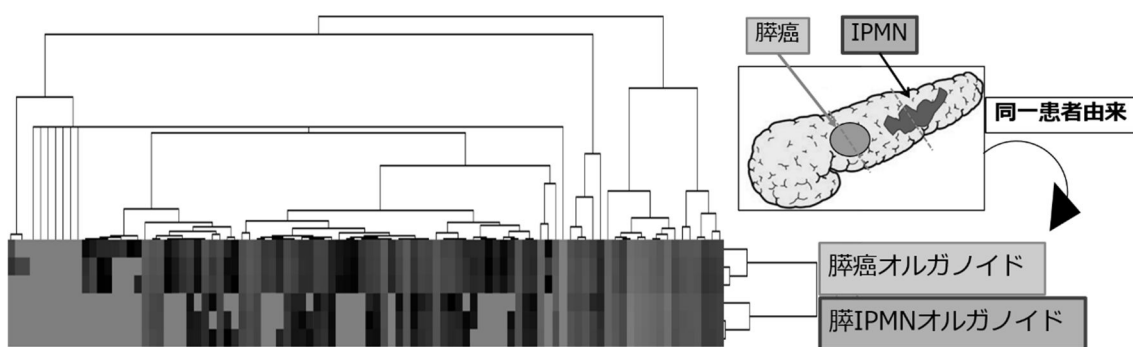
図3：現在まで樹立に成功した膵癌患者背景



今後樹立に成功した細胞からタンパクを抽出し、特異的な糖鎖に結合する糖結合タンパク「レクチン」が96種類搭載されたレクチンマイクロアレイを用いて糖鎖構造解析を行い膵癌特異的な糖鎖構造の同定を目指す。同一患者の膵癌およびIPMN(膵管内乳頭粘液線種)から樹立したオルガノイドを用いて解析した結果を例として下記に示す。(図4)

オルガノイド培養に用いられる細胞外マトリクスの成分には糖鎖構造が含まれており、糖鎖解析に支障を来す可能性が懸念されたが、タンパク抽出の課程で成分除去することで、この影響が軽減できると考えた。図 4 のように同一患者由来のオルガノイドを用いた解析ではクラスター解析により正常に機能していることがわかる。このように発現の異なるレクチンを同定し、早期発見ツールとしての妥当性を検証していく。

図 4：膵オルガノイドを用いたレクチンマイクロアレイ



< 引用文献 >

Tiriach H et al, Cancer Discovery 2018 Sep;8(9):1112-1129

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