

令和 6 年 6 月 20 日現在

機関番号：13501

研究種目：基盤研究(C)（一般）

研究期間：2020～2023

課題番号：20K08574

研究課題名（和文）患者由来オルガノイドを用いた、病理診断、遺伝子解析、治療有効性に関する研究

研究課題名（英文）Research on pathological diagnosis, genetic analysis, and therapeutic efficacy using patient-derived organoids

研究代表者

池村 辰之介（Ikemura, Shinnosuke）

山梨大学・大学院総合研究部・特任講師

研究者番号：30445291

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）：肺癌の多様な分子生物学的、組織学的な表現型を有する患者由来の肺癌オルガノイドライブラリーを作成した(Ebisudani T et al. Cell Rep. 2023 Mar 28;42(3):112212.)。腺癌、扁平上皮癌、小細胞癌、大細胞神経内分泌癌を網羅する43の肺癌オルガノイドライブラリーを確立した。喀痰、血中循環腫瘍細胞からもオルガノイドを樹立できた。オルガノイドを免疫不全マウスに移植し、その病理組織をそれぞれ患者の腫瘍と比較した結果、病理学的所見、遺伝子変異、コピー数異常、異数性、タンパク質発現において一致した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

今回確立した肺癌患者由来のオルガノイド樹立技術の応用により、臨床的な薬剤感受性の予測、薬剤耐性化機序の解明、予後予測などが可能となる。また、基礎研究として、発癌・その予防・抑制機序の解明、薬剤開発などに広く応用することが可能である。肺癌だけでなく、広く癌研究、癌治療への応用も期待される。

研究成果の概要（英文）：We have generated lung cancer organoid libraries derived from patients with diverse molecular and histological phenotypes of lung cancer (Ebisudani T et al. Cell Rep. 2023 Mar 28;42(3):112212.). We established 43 lung cancer organoid libraries covering adenocarcinoma, squamous cell carcinoma, small cell carcinoma, and large cell neuroendocrine carcinoma. Organoids could also be established from sputum and circulating tumor cells in blood. Organoids were transplanted into immunodeficient mice, and their pathology was compared with that of the respective patients' tumors, which matched in pathological findings, genetic mutations, copy number aberrations, aneuploidy, and protein expression.

研究分野：肺癌

キーワード：オルガノイド培養 肺癌 病理学的診断 分子生物学的診断 精密医療

科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属します。

## 様式 C-19、F-19-1 (共通)

### 1. 研究開始当初の背景

肺癌領域ではがんゲノム医療の進歩や免疫チェックポイント阻害薬など新規薬剤の登場により肺癌患者の予後は急速に改善してきている。ただ、これら新たな医療あるいは薬剤による治療を受けるためには、十分量の検体が採取できていることが必要である。近年、病理診断に必要な通常の HE 染色や免疫染色に加えて、EGFR、EML4-ALK、BRAF、ROS1 などの遺伝子異常の評価、あるいはこれらを包括的に行う次世代シーケンサーによる検査、さらに PD-L1 など免疫染色を評価するためにより多くの検体が必要になってきている。進行肺癌の多くの患者では十分な量の腫瘍検体が採れないことがあり、その後の個別化医療の実施が困難である。次世代シーケンサーによる検査には、切片面積 25mm<sup>2</sup> 以上の 4 μm プレパラートが 10 枚必要とされているが、肺癌の生検検体でこの量を得るのは不可能である。不十分な検体量で検査を行い、診療を進めていくのは医療倫理としても問題である。このような臨床現場における課題を克服するための診断補助ツールが期待されている。

これまでは組織検体としてほとんど意義を持たなかったごく微小な生検検体、残余検体だけでなく、生検器具洗浄液、胸水、喀痰などの液性検体からでも、癌細胞を増やし、解析できることが、オルガノイド培養技術の強みである。また、肺癌オルガノイドを確立できれば、診断だけでなく、薬剤感受性・耐性の評価などの実際の治療面においても、活用できる可能性がある。

本研究では、各患者から採取した検体から樹立した肺癌オルガノイドが、実際の肺癌検体と、病理学的、分子生物学的な同一性、相違性を評価する。臨床情報と比較することにより、薬剤感受性・耐性についても評価を行う。

### 2. 研究の目的

近年、がんゲノム医療の進歩や新規治療薬の開発により肺癌患者の予後は急速に改善しつつある。これら医学進歩の恩恵を受けるためには、十分量の検体が採取できていることが必要である。しかし、進行肺癌患者の多くは気管支鏡検査や画像ガイド下針生検などによる微小な検体しか採取できない場合が多く、様々な遺伝子異常、発現プロファイルが十分に評価できないことが実臨床における問題となっている。申請者らは微小の肺癌検体から癌細胞を増殖させ、継続培養するオルガノイド培養基盤を確立した。肺癌オルガノイドを用いることで、癌細胞を増殖させ、遺伝子変異や発現プロファイルを評価できる可能性がある。また、生きた細胞である肺癌オルガノイドを用いることで有効な薬剤を体外で評価することも可能になる。本研究の目的は、「肺癌の診断・個別化医療における肺癌オルガノイドの有用性を評価すること」である。

### 3. 研究の方法

・肺癌患者から得た手術検体、気管支鏡生検、胸水から肺癌細胞を分離し、様々な培養条件で培養し、オルガノイドの樹立を試みる。

・樹立したオルガノイドを継代、凍結保存、再度培養し、増殖できるか確認する。

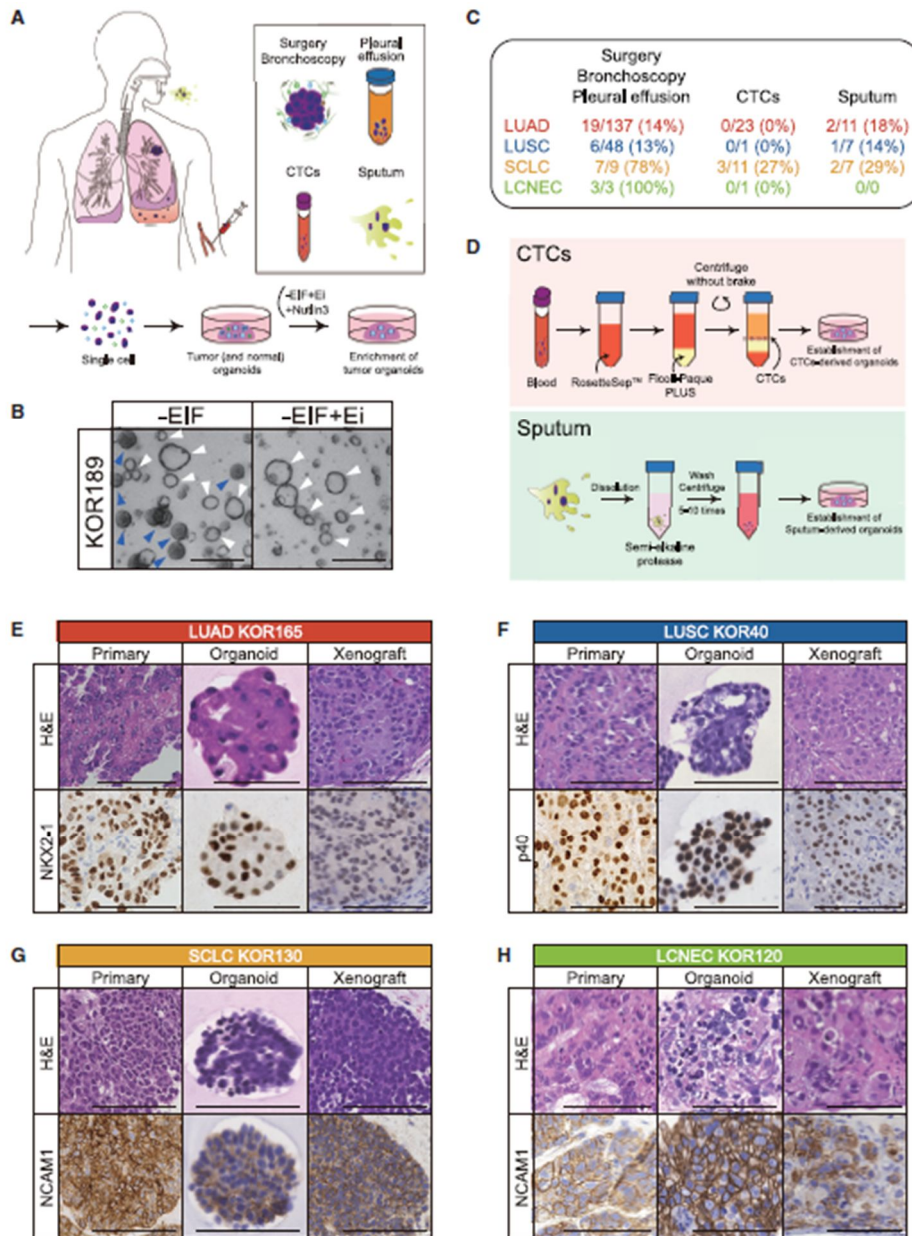
・オルガノイドの組織像、分子生物学的な解析を行い、患者の腫瘍との比較を行う。

・オルガノイドを免疫不全マウスに移植し、形成された腫瘍のその病理学的、分子生物学的な解析を行い、患者の腫瘍との比較を行う

### 4. 研究成果

肺癌の多様な分子生物学的、組織学的な表現型を有する患者由来の肺癌オルガノイドライブラリーを作成した(Ebisudani T et al. Cell Rep. 2023 Mar 28;42(3):112212.)。肺癌患者から得た手術検体、気管支鏡生検、胸水から肺癌細胞を分離し、まず、EGF/IGF-1/FGF-2(EIF)、Noggin、TGF- 阻害剤、Wnt-3A/R-spondin を含む既報の条件下で培養した。次に正常気道上皮の増殖を抑制するために、Nutlin-3 を追加、その後 EIF 除去、ERBB 阻害剤追加、というオルガノイド培養方法を確立した。オルガノイドは少なくとも 5 代継代すること、凍結保存後も再度培養、増殖させることが可能であった。樹立割合は、腺癌と扁平上皮 13%、小細胞癌 78%、大細胞神経内分泌癌 100%であり、喀痰、血中循環腫瘍細胞(CTC)といった、低侵襲に得られる検体からもオルガノイドを樹立可能であった(それぞれ 5 株、3 株)。以上、4 つの主要な組織型(腺癌 21、扁平上皮癌 7、小細胞癌 12、大細胞神経内分泌癌 3)を網羅する 43 の肺癌オルガノイドライブラリーを確立した。

オルガノイドを免疫不全マウスに移植し、その病理組織をそれぞれ患者の腫瘍と比較した。病理学的所見と、組織学的マーカーである NKX2-1(TTF-1)、p40、NCAM1 の発現は、原発組織、オルガノイド、マウス移植片で一致した。また、遺伝子変異、コピー数異常、異数性において分子生物学的特徴を有しており、オルガノイドにおける mRNA 発現は、腫瘍におけるタンパク質発現と一致した。これらの結果により、オルガノイドが癌由来であること、および、組織病理学的、分子生物学的な同一性が保たれていること示した。



(Ebisudani T et al. Cell Rep. 2023 Mar 28;42(3):112212.)

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 Ebisudani Toshiki et al.	4. 巻 42
2. 論文標題 Genotype-phenotype mapping of a patient-derived lung cancer organoid biobank identifies NKX2-1-defined Wnt dependency in lung adenocarcinoma	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 Cell Reports	6. 最初と最後の頁 112212 ~ 112212
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.celrep.2023.112212	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〕

-

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