

令和 6 年 6 月 28 日現在

機関番号：22701

研究種目：若手研究

研究期間：2020～2023

課題番号：20K16995

研究課題名（和文）膵IPMNにおける膵液オルガノイドを用いた診断法と創薬研究への応用

研究課題名（英文）Diagnostics using pancreatic fluid organoids in pancreatic IPMN and its application to drug discovery research

研究代表者

栗田 裕介（Kurita, Yusuke）

横浜市立大学・附属病院・助教

研究者番号：30867015

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 2,800,000円

研究成果の概要（和文）：近年、生体内の組織、臓器に極めて近い構造で細胞を増幅させる3次元培養システムとしてオルガノイドという手法の有用性が報告されている。今回、本研究ではIPMNに対してERCPにより採取した膵液より培養したIPMNオルガノイド細胞株を使用し、高感度の病理診断法の確立を試みている。オルガノイドにより同型の細胞を増やすことで診断に有用となる可能性が示唆される。また採取したオルガノイド培養株から継続して遺伝子解析を行っている。引き続き良性IPMNの化学予防薬剤と、悪性IPMNに対する抗腫瘍薬剤からなる新規治療薬剤の同定を目指している。

研究成果の学術的意義や社会的意義

IPMNオルガノイド細胞株を使用し、高感度の病理診断法の確立を試みている。通常ERCPによる細胞採取は限られた量であることが多いが、オルガノイドにより同型の細胞を増やすことで病理学的な診断に有用となる可能性が示唆される。また採取したオルガノイド培養株から継続して遺伝子解析を行っている。引き続き良性IPMNの化学予防薬剤と、悪性IPMNに対する抗腫瘍薬剤からなる新規治療薬剤の同定を目指している。ERCPによる少量の細胞採取では不可能とされてきた遺伝子解析や新規治療薬剤の同定が可能となる可能性が示唆される。

研究成果の概要（英文）：Recently, the usefulness of organoids, a three-dimensional culture system that amplifies cells in a structure very similar to in vivo tissues and organs, has been reported. In this study, we attempted to establish a highly sensitive pathological diagnosis method for IPMN by using IPMN organoid cell lines cultured from pancreatic fluid collected by ERCP. It is suggested that increasing the number of cells of the same type by organoids may be useful for diagnosis. We are also continuing genetic analysis of the collected organoid cultures. We continue to identify novel therapeutic agents consisting of chemopreventive agents for benign IPMN and antitumor agents for malignant IPMN.

研究分野：消化器病学

キーワード：オルガノイド IPMN KRAS GNAS

## 1. 研究開始当初の背景

膵管内乳頭粘液性腫瘍 (Intraductal Papillary Mucinous Neoplasm; IPMN) は膵嚢胞性腫瘍のひとつであり、画像診断機器の進歩と普及に伴い、発見される機会が増えている。IPMN は良性のものが大半を占めるが、経過を追っていくと IPMN そのものが悪性化する IPMN 由来浸潤がんに行進することや、IPMN とは異なる部位に IPMN 併存通常型膵がんが発生する例がある(Oyama H, et al. Gastroenterology. 2019; Aug 29 [Epub ahead of print])。そのため、IPMN は前がん病変として広く認識されている。

IPMN の悪性病変である IPMN 由来浸潤がんに対する手術や抗がん剤治療といった治療方針の決定には、確実な画像診断と病理組織学的な診断が望まれる。実臨床における IPMN の病理組織の採取方法として内視鏡的逆行性胆管膵管造影 (ERCP) がある。しかし、ERCP による膵液採取は、採取できる細胞量が少ないことが多いため、診断感度は 45% (Hara T, et al: Ann Surg 2013;257:1103-11.)と、実臨床において十分な診断能を有しているとは言えず、IPMN に対する感度の高い確実な病理診断法を確立する必要がある。オルガノイドは生体内の組織に極めて近い構造で細胞を増幅させる 3 次元培養システムである。膵液由来の少量の細胞を、オルガノイド培養により再現性のある十分量の細胞量に増幅し病理組織検体として使用することで、IPMN の悪性病変診断能の向上が見込まれる。

手術検体を用いた悪性 IPMN の分子基盤、遺伝子異常は解明されつつあり、IPMN を含む膵がんは一般に 90%以上の *KRAS* 遺伝子変異を有している。近年では *GNAS* 変異が IPMN に特徴的な遺伝子異常として発見され、膵癌の分子サブタイプのマーカーとして使用されている。*GNAS* は、*KRAS* と同様に血液や膵液などを使用したりキッドバイオプシーなどの臨床検査に運用が試みられている。しかし、手術に至らない良性 IPMN は、依然として不明確な点が多い。ERCP により採取した膵液オルガノイドを用いることで、悪性 IPMN のほか、通常の臨床で手術検体の得られない良性 IPMN の分子基盤、遺伝子異常も含めた検証も可能となり、画像診断しかサーベイランスの手法がない IPMN において、新たなバイオマーカーや予後マーカーが明らかとなる可能性がある。

また、患者由来のオルガノイドは体内組織と同様な性質を示すため、従来の細胞培養に比較し、実際の生体により近い環境での薬剤効果の研究を可能にするとされる。IPMN は病理学的な悪性度から浸潤がんと異形成に分類され、浸潤がんは悪性であり手術適応とされる。一方、異形成は、良性病変だが、一定の割合で悪性化することがあるため注意を要する。しかし、良性 IPMN である異形成病変の悪性化予防法はいまだなく慎重な経過観察をするしかない状況にある。現在、欧米を中心に経口薬を内服することで悪性化を予防する試みが行われており化学予防と呼ばれている。大腸がん領域では前がん病変に対して糖尿病薬のメトホルミン(Higurashi T, et al: Lancet Oncol. 2016;17:475-83.)や、抗血小板剤であるアスピリンといった化学予防薬剤が同定されており、良性の IPMN においても悪性の IPMN への進行を予防する薬剤の同定が囑望されている。さらに、IPMN が悪性化し、切除不能段階に行進した IPMN 由来浸潤がんは抗がん剤治療が適応となるが、抗腫瘍薬剤のエビデンスはなく(Gut. 2018;67:789-804.)、有効な治療法は依然として未解明である。がん細胞の性質が異なるにも関わらず、慣習的に通常型膵がんと同様なレジメンの抗がん剤治療が行われており、IPMN 由来浸潤がんに対しても特異的に有効

な抗腫瘍薬剤の同定が望まれる。

## 2. 研究の目的

本研究は、IPMNにおける高感度の病理診断能の確立とバイオマーカーの探索、化学予防薬剤ならびに抗腫瘍薬剤の同定を目的とする。本研究の独自性は、IPMNの診断法と創薬における研究に、膵液オルガノイドを使用する点である。オルガノイド細胞株は、生体組織から得られた細胞を、マトリゲルを使用し3次元培養するものであり、従来の平面培養に比べて、細胞の継代による遺伝子変異の蓄積が少ないことが知られている。他のモデルではヒト膵IPMNの性質を正確に模倣出来ておらず、膵液オルガノイド細胞株は、ヒトIPMNと類似した間質、粘性環境が作成されるため、IPMN微小環境の包括的な解析が可能であり、薬剤感受性スクリーニングには有効とされる。本研究課題の創造性は、実現可能なIPMNにおける高感度の病理診断法の確立、バイオマーカーの探索、治療薬剤の同定であり、検証のみで終了せず臨床に導入することを目指す。そのため特に治療薬剤の同定に当たっては試薬として購入可能なものなど実現可能性の高い薬剤から解析を開始する。また本手法が確立すれば消化器系を始めとする他の腫瘍性疾患に対しても応用可能と考えられる。

## 3. 研究の方法

### 膵液オルガノイドによるIPMNの悪性病理診断能の確立

IPMNの患者からERCPにより膵液を採取し、培養、継代により再現性のある細胞を十分量増幅したオルガノイド細胞株を樹立する。そして、同オルガノイド細胞株よりhematoxylin eosin染色(HE)標本および免疫組織化学染色標本を作成する。手術検体による最終診断と照らし合わせて、オルガノイド細胞株により作成した標本の病理診断能の検証を行う。さらに、従来の手法であるERCPで得られた膵液による細胞診断能、放射線専門医による画像診断能と、それぞれ感度、特異度、正診率を含めた診断能の比較を行い、統計解析を行う。以上より膵液オルガノイド細胞株より作成したHE標本と免疫組織化学染色標本を使用した病理診断による悪性診断能の向上について検証を行う。

### 膵液オルガノイドによるIPMNの遺伝子解析

膵液オルガノイド細胞株を使用し、遺伝子解析を行う。得られた膵液オルガノイド細胞株よりDNA、RNAを抽出し、KRAS、GNASのほか網羅的にIPMNの遺伝子変異解析ならびに遺伝子発現解析を行う。良性IPMNと悪性のIPMNの差異を比較し、IPMNの分子基盤を明らかにし、臨床データとも照らし合わせることで、バイオマーカー、予後因子となりえる対象を探索する。また遺伝子変異、遺伝子発現の解析が進んだところで、  
で行う薬剤感受性との関連性を調べ、個別化治療の可能性についても検討を行う。

### 良性IPMNから悪性IPMNへの進行を防ぐ化学予防薬剤の同定

良性IPMN(で得られた異形成病変)のオルガノイド細胞株を用いて、安全性の高い経口内服剤を投与し検討する。今回、検証する薬剤の候補としてはNSAIDs(ロキソプロフェン、イブプロフェンほか)、糖尿病薬(メトホルミンほか)、脂質異常薬(スタチンほか)、抗血小板薬(アスピリンほか)、抗菌薬(ペニシリン、クラリスロマイシンほか)、抗真菌薬(フルコナゾールほか)を使用する。培養プレートの各ウェルにIPMN

の膵液オルガノイド細胞株を樹立させ、それぞれに各薬剤を投与する。その後、コントロールのウェルと比較して細胞生存率を計測し、各薬剤の細胞増殖抑制効果を検証する。これらの既存の経口内服剤による薬剤感受性スクリーニングを行うことで IPMN に対する安全かつ効果的な化学予防薬剤の同定を行う。

悪性 IPMN ( IPMN 由来浸潤がん ) に対する抗腫瘍薬剤の同定

悪性 IPMN ( 得られた IPMN 由来浸潤がん ) の膵液オルガノイド細胞株に対して各種薬剤を投与し、と同様の手法で各薬剤の細胞増殖抑制効果について検証する。上述の経口内服剤に加え、各抗腫瘍薬剤を使用し検証を行う。使用する抗腫瘍薬剤の候補としては通常型膵がんに行われるゲムシタピンをはじめとする各レジメンの各化学療法のほか、分子標的薬 ( エベロリムス、セツキシマブほか )、免疫チェックポイント阻害剤 ( ニボルマブ、ペムプロリズマブほか ) を含む他臓器のがんで使用される抗腫瘍薬剤も使用し検証を行う。

#### 4 . 研究成果

IPMN オルガノイド細胞株を使用し、高感度の病理診断法の確立を試みた。通常 ERCP による細胞採取は限られた量であることが多い。オルガノイドにより同型の細胞を増やし、継続的に継代していくことで安定したオルガノイド株の培養に成功した。細胞の形態は ERCP にして採取された細胞と同様な形態を取っており、診断感度を上昇させ病理診断に有用となる可能性が示唆された。一方で感染が強い症例については継代が困難な症例も一定の割合で存在することから、症例によらず培養可能となるような安定した技術開発が、全体症例における高感度診断法の確立に向けた今後の課題である。いずれにせよ安定したオルガノイド株の培養成功症例は、オルガノイド培養が診断感度を上昇させる可能性が示唆された。

また採取したオルガノイド培養株から継続して遺伝子解析を行っている。得られたオルガノイド細胞株より、DNA、RNA の抽出を行い、デジタル PCR を用いた遺伝子変異解析を行った。IPMN に特徴的なドライバー遺伝子 *GNAS* 変異、*KRAS* 変異の有無のデータを集積している。また悪性 IPMN に対する抗腫瘍薬剤からなる新規治療薬剤の同定を行っている。ERCP による少量の細胞であっても継代して培養することで同定に必要な細胞量の確保に成功しており、今後も具体的薬剤の同定を目指している。

## 5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計4件（うち査読付論文 0件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 0件）

1. 著者名 Kurita Yusuke, Hara Kazuo, Kobayashi Noritoshi, Kuwahara Takamichi, Mizuno Nobumasa, Okuno Nozomi, Haba Shin, Yagi Shin, Hasegawa Sho, Sato Takamitsu, Hosono Kunihiro, Endo Itaru, Shimizu Yasuhiro, Niwa Yasumasa, Utsunomiya Daisuke, Inaba Yoshitaka, Nakajima Atsushi, Kubota Kensuke, Ichikawa Yasushi	4. 巻 29
2. 論文標題 Detection rate of endoscopic ultrasound and computed tomography in diagnosing pancreatic neuroendocrine neoplasms including small lesions: A multicenter study	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Journal of Hepato-Biliary-Pancreatic Sciences	6. 最初と最後の頁 950 ~ 959
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1002/jhbp.1144	査読の有無 無
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Kurita Yusuke, Fujita Yuji, Sekino Yusuke, Watanabe Seitaro, Iwasaki Akito, Kagawa Koichi, Tanida Emiko, Yagi Shin, Hasegawa Sho, Sato Takamitsu, Hosono Kunihiro, Kato Shingo, Kobayashi Noritoshi, Ichikawa Yasushi, Endo Itaru, Nakajima Atsushi, Kubota Kensuke	4. 巻 28
2. 論文標題 IgG4 related sclerosing cholangitis may be a risk factor for cancer	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Journal of Hepato-Biliary-Pancreatic Sciences	6. 最初と最後の頁 524 ~ 532
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1002/jhbp.957	査読の有無 無
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Kurita Yusuke, Kubota Kensuke, Fujita Yuji, Tsujino Seitaro, Sekino Yusuke, Kasuga Noriki, Iwasaki Akito, Iwase Mai, Izuka Takeshi, Kagawa Koichi, Tanida Emiko, Yagi Shin, Hasegawa Sho, Sato Takamitsu, Hosono Kunihiro, Kobayashi Noritoshi, Ichikawa Yasushi, Nakajima Atsushi, Endo Itaru	4. 巻 31
2. 論文標題 IgG4 related pancreatobiliary diseases could be associated with onset of pancreatobiliary cancer: A multicenter cohort study	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 Journal of Hepato-Biliary-Pancreatic Sciences	6. 最初と最後の頁 173 ~ 182
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1002/jhbp.1404	査読の有無 無
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Nihei Shinichi, Kurita Yusuke, Hasegawa Sho, Hosono Kunihiro, Kobayashi Noritoshi, Kubota Kensuke, Nakajima Atsushi	4. 巻 56
2. 論文標題 Detective flow imaging endoscopic ultrasound for localizing pancreatic insulinomas that are undetectable with other imaging modalities	5. 発行年 2024年
3. 雑誌名 Endoscopy	6. 最初と最後の頁 E342 ~ E343
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1055/a-2291-9116	査読の有無 無
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

〔学会発表〕 計2件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 1件）

1. 発表者名 緒方智樹、栗田裕介
2. 発表標題 IPMNの診断に対するSpyDSの有用性
3. 学会等名 第54回日本膵臓学会大会
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 Yusuke Kurita1、Kensuke Kubota1、Yuji Fujita2、Yusuke Sekino3、Akito Iwasaki4、Mai Iwase5、Koichi Kagawa6、Emiko Tanida7、Masato Yoneda1、Atsushi Nakajima
2. 発表標題 UEG-1. IgG4-related pancreatobiliary diseases could be associated with onset of pancreatobiliary cancer : a multicenter cohort study
3. 学会等名 The 110th General meeting of the japanese society of gastroenterology (国際学会)
4. 発表年 2024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
---------	---------