

令和 4 年 5 月 31 日現在

機関番号：32612

研究種目：若手研究

研究期間：2020～2021

課題番号：20K17757

研究課題名(和文)オルガノイドライブラリーを用いた胸腺腫・胸腺癌の本態解明

研究課題名(英文)Elucidating the Nature of Thymoma and Thymic Carcinoma Using Organoid Libraries

研究代表者

大村 征司 (Seiji, Omura)

慶應義塾大学・医学部(信濃町)・助教

研究者番号：80814441

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)：胸腺腫と胸腺癌のオルガノイドについて樹立時の培養液の添加因子(ニッチ因子)の調整を行った。先行論文より、増殖する可能性の高いニッチ因子を加えた結果、2例の胸腺癌と1例の胸腺異型カルチノイドのオルガノイドが臨床応用可能なレベルで顕著な増殖を示した。胸腺癌オルガノイドの2例に関しては薬剤投与下での細胞増殖能を評価するMTSアッセイも行った。imatinibとorafenibで軽度ながら増殖抑制効果があることが認められた。また、胸腺癌オルガノイドの2例にnutlinを加えるといずれも増殖はみられず、この2例の胸腺癌に関してはp53の変異はないと考えられた。

研究成果の学術的意義や社会的意義

胸腺腫・胸腺癌は頻度が少なく、研究の焦点が当たっていないため十分な病態解明が進んでおらず、手術療法以外に有効な治療法がない。胸腺腫・胸腺癌の病態解明のためには、患者由来の組織あるいは細胞を用いた研究モデルが必要であるが、現在まで臨床を反映した研究モデルは存在しない。今回私たちは、手術検体から採取した患者由来の胸腺腫・胸腺癌検体から胸腺細胞を“生きたまま”保存管理し、培養するオルガノイド培養技術の確立に成功した。これによりDNA、RNAレベルの解析のみでなく、生きた細胞ならではの薬剤感受性や特定のパスウェイへの依存度などを多方面から生物学的に検証することが可能になる。

研究成果の概要(英文)：We adjusted the factors (niche factors) added to the culture medium at the time of establishment for thymoma and thymic carcinoma organoids. Based on the results of the previous paper, the addition of niche factors with high proliferative potential resulted in significant proliferation of two thymic carcinoma and one thymic atypical carcinoid organoids at a clinically applicable level. In the two thymic carcinoma organoids, MTS assays were also performed to evaluate cell proliferative potential under drug administration. imatinib and orafenib were found to have a mild inhibitory effect on proliferation. In the two thymic carcinoma organoids, no proliferation was observed when nutlin was added, suggesting that p53 mutations were not present in these two thymic carcinomas.

研究分野：オルガノイド

キーワード：胸腺腫 胸腺癌 オルガノイド

## 様式 C-19、F-19-1、Z-19 (共通)

### 1. 研究開始当初の背景

本邦において、胸腺腫は10万人あたり0.44人から0.68人と稀な疾患であり、胸腺癌に関してはさらに頻度が低いとされている。そのため、肺癌のように研究の焦点が当たっておらず、いまだに十分な病態解明につながっていない。そのため有効な治療法が確立しておらず、手術が唯一の治療法となっている。しかし、隣接臓器に浸潤、あるいは、遠隔転移を認めるなど手術適応外の症例には有効な治療法がなく臨床病期 期の胸腺腫・胸腺癌の患者の5年生存率は胸腺腫で52.6%、胸腺癌で37.6%と予後不良と報告されている。今後、胸腺腫・胸腺癌患者の予後改善のためには、患者由来の細胞を用いた新たな研究モデルの確立が期待されている。

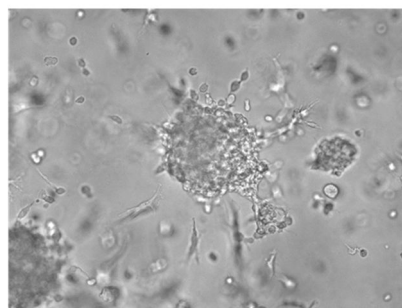
### 2. 研究の目的

近年、細胞培養技術(オルガノイド培養技術)の進歩により患者由来の細胞を「生きたまま」継続培養することが可能になってきている。この細胞培養技術の最大の特徴は、従来の平面的、二次元的に細胞を培養する細胞株と異なり、立体的、三次元的に細胞を培養するため多様性を保ちながら継続培養できる点にある。

本技術を用いることで、ゲノム情報などからでは予測できない薬剤感受性や増殖速度など生きた細胞ならではの生物学的情報を取得することが可能になる。我々は、オルガノイド培養技術の世界的トップランナーである佐藤俊朗(慶應義塾大学、オルガノイド医学講座教授)(*Nature* 2009, *Nature* 2011, *Science* 2013, *Nature Med* 2015, *Nature* 2017, *Cell Stem Cell* 2018, *Cell* 2018)と安田浩之(慶應義塾大学医学部呼吸器内科専任講師)との共同研究により世界に先駆けて患者由来の胸腺腫あるいは胸腺癌オルガノイドを効率よく樹立する基盤を確立した。我々が知る限り、これらは世界初の胸腺腫・胸腺癌由来オルガノイドである。右図は、我々が樹立した胸腺腫由来オルガノイドの一例である。

胸腺腫・胸腺癌オルガノイドを用いることで、胸腺腫・胸腺癌の病態の統合的理解(遺伝子変異、遺伝子発現プロファイルの変化)、有効な薬剤の評価などが可能になる。最終的に、新規の治療標的の同定から胸腺腫、胸腺癌に対する治療法開発につなげ、患者予後改善につなげることを目的とする。

胸腺腫オルガノイド



### 3. 研究の方法

我々の施設では胸腺腫・胸腺癌に対する手術を年間約30例行っている。右図は、我々が切除した胸腺腫検体の写真である。これらの手術検体から腫瘍細胞を採取し、胸腺腫・胸腺癌オルガノイドを樹立する。症例数を増やし胸腺腫あるいは胸腺癌オルガノイド樹立を試みるとともに、それらオルガノイドに対する次世代シーケンサーを用いたオミクス解析(RNA sequencing, whole exome sequencing)を用いた胸腺腫・胸腺癌における分子異常(遺伝子変異、遺伝子発現プロファイル)の把握を行う。右図は、我々が樹立した肺癌オルガノイドライブラリーに対して whole exome sequencing を行った結果の一部である。

*TP53*, *EGFR*, *KRAS* など臨床で報告されている遺伝子変異分布にマッチした結果が得られており、臨床を反映するライブラリーであることを確認している。本研究では同様の手法を用いて、胸腺腫・胸腺癌に対するオミクス解析を進める。

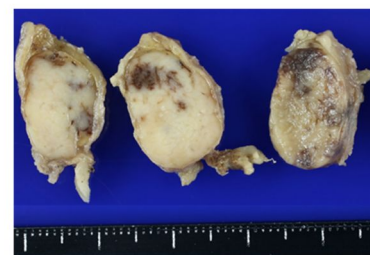
また、胸腺腫・胸腺癌に対して有効な薬剤を探索するため、樹立した胸腺腫・胸腺癌オルガノイドに対して *in vitro*での薬剤感受性検査を行う。具体的には、薬剤投与下での細胞増殖能を評価するMTSアッセイを行う。約50種類の既存の抗癌剤(分子標的治療薬含む)で解析を行い、胸腺腫・胸腺癌に有効と思われる薬剤を同定する。

### 4. 研究成果

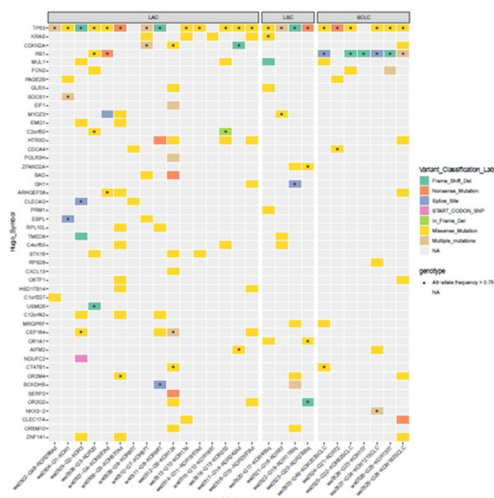
前年度から引き続き胸腺腫と胸腺癌のオルガノイドについて樹立時の培養液の添加因子(ニッチ因子)の調整を行った。先行論文より、胸腺腫・胸腺癌の遺伝子変異の頻度を同定し、より増殖

する可能性の高いニッチ因子を加えた。その結果、下図のように2例の胸腺癌と1例の胸腺カル

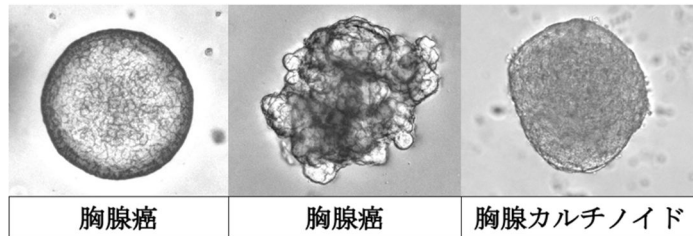
胸腺腫切除検体断面



肺癌オルガノイドに対する遺伝子変異解析



チノイドのオルガノイドが臨床応用可能なレベルで顕著な増殖を示した。この3例について、生成されたオルガノイドが胸腺癌、胸腺カルチノイドであることを証明するためHE染色と免疫染色を行った。胸腺癌、胸腺カルチノイドいずれも元々の手術検体と同様の染色形態を示した。次世代シーケンサーを用いたオミクス解析(whole exome sequencing、RNA sequencing)も行った。現時点でRNA sequencingの結果のみ返却されているが、胸腺カルチノイドのオルガノイドはそれであることが証明された。また胸腺癌オルガノイドの2例に関してはwhole exome sequencingの結果を待っていることに加えてnude mouseの皮下と腎皮膜に移植し増殖を待っている段階である。胸腺癌オルガノイドの2例に関しては薬剤投与下での細胞増殖能を評価するMTSアッセイも行った。imatinibとorafenibで軽度ながら増殖抑制効果があることが認められた。また、胸腺癌オルガノイドの2例にnutlinを加えるといずれも増殖はみられず、この2例の胸腺癌に関してはp53の変異はないと考えられた。



5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計1件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 大村征司
2. 発表標題 オルガノイド培養技術を用いた胸腺腫、胸腺癌の病態解明
3. 学会等名 第40回 日本胸腺研究会
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
---------	---------