

令和 5 年 5 月 9 日現在

機関番号：84409

研究種目：若手研究

研究期間：2020～2022

課題番号：20K18048

研究課題名(和文)新規治療開発を目指した肉腫由来オルガノイドパネルの構築

研究課題名(英文)Development of organoid panel from human sarcoma for establishment of novel treatment

研究代表者

若松 透 (Wakamatsu, Toru)

地方独立行政法人大阪府立病院機構大阪国際がんセンター(研究所)・その他部局等・整形外科 副部長

研究者番号：90833476

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)：ヒト肉腫検体より、コラーゲン中で培養する培養法を用いてマウスへの移植も可能な20株以上の肉腫オルガノイドの樹立に成功した。その中で類上皮肉腫2株について論文報告した。また悪性骨巨細胞腫や脂肪肉腫6株についても研究報告予定である。またオルガノイドを用いた増殖実験や薬効実験、また遺伝子改変実験などについても検討、実践し安定して可能となった。

さらに、オルガノイドを用いて遺伝子解析を行い肉腫の悪性化メカニズムの解析を行い、薬剤による治療実験を行った。さらなる症例を蓄積し本研究を継続・発展させることで、肉腫に対する新規治療へとつながる可能性を示した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究は有効な治療法の少ない希少がんである肉腫を対象とした研究であること、また腫瘍本来の特徴を保持できる肉腫オルガノイドが樹立できたという報告は殆どなく社会的・学術的にも意義の大きいものであると考えられる。また樹立できたオルガノイドは継続的に使用可能であり研究材料の乏しい肉腫の分野においては非常に価値が高く、培養技術の更なる改良も視野に入れることで研究や治療の継続的な発展の礎になるものとする。実際の医療情報と関連付けて更なる研究を行い、アンメットニーズに応えられるように進めていきたい。

研究成果の概要(英文)：We established more than transplantable 20 organoids from human sarcoma samples with organoid culture using collagen. We reported the study about 2 established epithelioid sarcoma organoids. In addition, we are planning to report about the established organoids of malignant giant cell tumor and liposarcoma. We also became able to perform the experiments about organoid growth, drug treatment and RNAi. We performed genetic analysis with established organoids to investigate the mechanism of malignant progression of sarcomas and treated with some drugs against those organoids. We demonstrated that continuing research of sarcoma organoid panel enable to establish novel treatment for sarcoma.

研究分野：骨軟部腫瘍

キーワード：肉腫 オルガノイド

1. 研究開始当初の背景

癌治療は分子標的治療薬、免疫療法の臨床応用やがんゲノム医療の進歩により飛躍的に進歩し、目覚ましい生命予後改善が成されている。一方、肉腫治療に対しては2012年に分子標的治療薬のひとつである Pazopanib が軟部肉腫に対して国内で初承認され、続いて、Eribulin や Trabectedin の2剤も承認された。しかしながら臨床においてその治療効果は思わしくなく、一部の組織型を除いては十分な生命予後の改善は達成されていない。肉腫治療の進歩が遅れている要因として、肉腫が希少がんであるため基礎研究の機会が限られていることや同じ肉腫でも組織型が多様であることに加えて、間葉系細胞特性を示す肉腫の特徴が平面接着培養条件下では反映できていないことが挙げられる。そこで申請者は、これまでの研究で培った3次元培養法技術を発展させて、肉腫研究に殆ど用いられていなかったオルガノイド培養法を導入し、より細胞特性を保持した条件下での効率的な解析を行い、究極的には肉腫研究および肉腫治療の発展を目指す。

2. 研究の目的

本研究の目的は肉腫由来オルガノイドのパネルを構築し、有効な新規肉腫治療を開発することである。がん治療はオーダーメイドの方向に進んでいるが、肉腫を含む希少がんは特にオーダーメイド治療が必要とされる対象であると考えられる。将来的には、本研究で構築した肉腫オルガノイドパネルを肉腫研究を効率的に推進させるための研究資源として提供することも視野に入れ肉腫研究の発展への寄与も目的の一つとする。

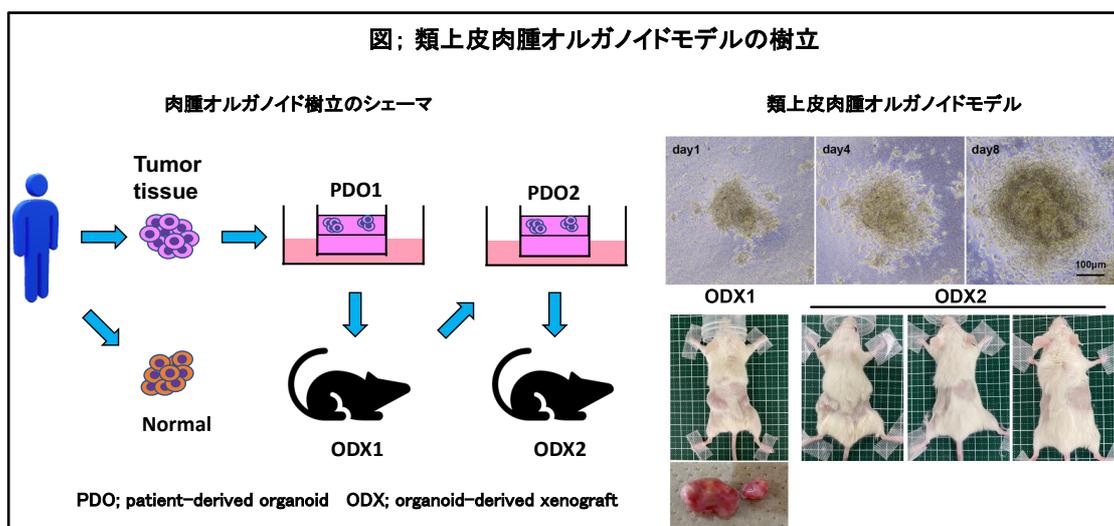
3. 研究の方法

肉腫組織を用いて、より生体に近い肉腫オルガノイドを作製、パネル化し、肉腫組織の特性を反映した培養環境下で新規治療法の開発を目指す。対象とする肉腫は、症例数が比較的多く治療抵抗性である脂肪肉腫、未分化多形肉腫などを主な対象とする。並行して、可能な限り他の肉腫組織型にも適用を試みる。樹立できたものに対して遺伝子解析や腫瘍学的な性状解析を行い肉腫の悪性化メカニズムの解明を目指す。

4. 研究成果

(1) Air-Liquid Interface 法を用いたヒト類上皮肉腫オルガノイドの樹立

類上皮肉腫組織サンプルから Air-Liquid Interface 法を用いてオルガノイド2株を樹立することに成功した(下図)。上記培養方法はコラーゲンを細胞外基質として用い、細胞がエアレーションできる環境下で培養を行うオルガノイド培養法である。樹立したオルガノイドは本来の腫瘍組織の形態的特徴、タンパク質発現の特徴を保持しており、類上皮肉腫の悪性化の原因とされている INI1 の欠損も認められた。また次世代シーケンサーによる遺伝子発現解析結果から、オルガノイドでは元の腫瘍における遺伝子発現を高度に担保していることが確認された。従って樹立した類上皮肉腫オルガノイドモデルは患者組織における肉腫本来の特徴を保持したこれまでにない肉腫モデルであることを示した。(引用文献1)。



(2) 他の肉腫オルガノイドの樹立

肉腫オルガノイドの樹立を継続的に行いこれまでにおよそ20株の樹立に成功した。主に脱分化型脂肪肉腫や悪性抹消神経鞘腫瘍、未分化多形肉腫、軟骨肉腫などである。また培養法の改良を行っており、継代時にコラーゲンを溶解せずそのまま細かく刻み再度コラーゲンに包埋し

培養することで腫瘍生存率効率や時間、試薬の削減などにつながることを見出した。また一度はマウスに生着したものの、2回目以降に生着率が落ちるものもあるため、マウスから腫瘍を採取した際に、そのまま *in vitro* での培養を介さず別のマウスへ移植し継代する方法も模索している。肉腫サンプルは非常に貴重であり上記の様な様々な方法を用いて再生産可能な研究資源の創出に取り組んでいる。また悪性骨巨細胞腫の研究は論文報告中であり、脂肪肉腫、軟骨肉腫などが現在論文報告を目指し準備中である。

さらに肉腫に限らず希少がんを範囲を広げて有効な治療や研究材料に乏しい腫瘍型について大阪国際がんセンターの他診療科と協力しながら希少がんオルガノイドの樹立も進めている。

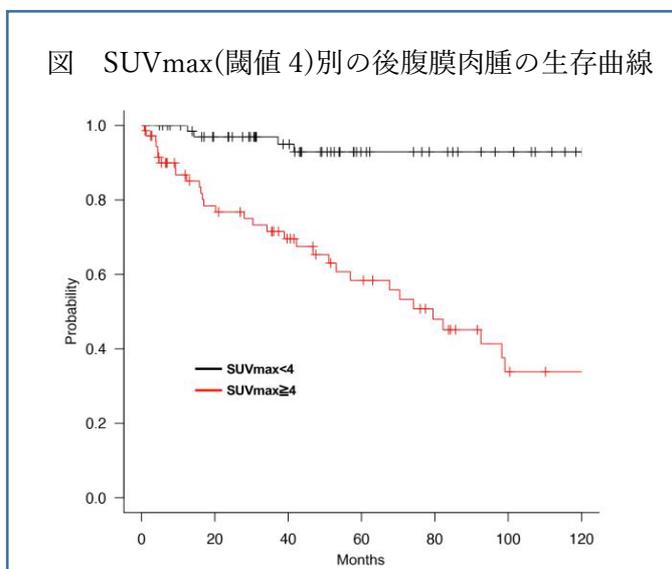
(3) 後腹膜肉腫における PET-CT 検査における 18F-FDG の取り込みによる悪性度の予測

肉腫オルガノイド樹立を継続的に行っている際に、後腹膜肉腫の中で大部分を占める脂肪肉腫オルガノイド株を複数樹立することができた。同オルガノイドの解析は遂行中であるが、樹立できた株は临床上、PET-CT 検査で 18-FDG の取り込み (SUVmax) が非常に高値であった。一般的に細胞株など悪性度が高いものの方が樹立しやすいと考えられており、後腹膜肉腫においても SUVmax によって後腹膜肉腫の生命予後予測が可能ではないかと仮説を立てた。

そこで大阪国際がんセンターで過去に診療した 201 人の後腹膜腫瘍患者の臨床情報を抽出し、SUVmax と生命予後に関連性があるか検討した。組織型は 75 人 (37.3%) が脱分化型脂肪肉腫、52 人 (25.9%) が高分化型脂肪肉腫、29 人 (14.4%) が平滑筋肉腫であった。PET-CT を受けた症例のみで解析を行うと、SUVmax=4 を閾値として 2 群に分けた場合有意にその予後に差が認められた (下図)。SUVmax \geq 4、SUVmax $<$ 4 で生存期間中央値はそれぞれ 275.8 ヶ月、79.5 ヶ月であった。後腹膜腫瘍においては手術のみが有意に予後を改善させることのできる治療であることが報告されているが、多変量解析を用いた場合に SUVmax \geq 4 は独立した予後不良因子であった。また脱分化型脂肪肉腫においても同様に有意な予後不良因子であった。(引用文献②)

18-FDG の活発な取り込みは主に代謝経路が活発であることの指標であると考えられており、今後そのような視点から樹立した脂肪肉腫オルガノイドを用いて遺伝的・腫瘍学的性状解析を行い悪性化メカニズムの解析を行っていく。

図 SUVmax(閾値 4)別の後腹膜肉腫の生存曲線



<引用文献>

- ① Wakamatsu Toru, Ogawa Hisataka, Yoshida Keiichi, et al. Establishment of Organoids from Human Epithelioid Sarcoma With the Air-Liquid Interface Organoid Cultures. *Front Oncol.* 2022; 12:893592.
- ② Wakamatsu Toru, Imura Yoshinori, Tamiya Hironari, et al. 18F-Fluorodeoxyglucose Positron Emission Tomography Is Useful in the Evaluation of Prognosis in Retroperitoneal Sarcoma. *Cancers.* 2021;13(18):4611.

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計2件（うち査読付論文 2件 / うち国際共著 0件 / うちオープンアクセス 2件）

1. 著者名 Wakamatsu Toru, Imura Yoshinori, Tamiya Hironari, Yagi Toshinari, Yasuda Naohiro, Nakai Sho, Nakai Takaaki, Outani Hidetatsu, Hamada Kenichiro, Kakunaga Shigeki, Araki Nobuhito, Ueda Takafumi, Takenaka Satoshi	4. 巻 13
2. 論文標題 18F-Fluorodeoxyglucose Positron Emission Tomography Is Useful in the Evaluation of Prognosis in Retroperitoneal Sarcoma	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Cancers	6. 最初と最後の頁 4611 ~ 4611
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3390/cancers13184611	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 -

1. 著者名 Wakamatsu Toru, Ogawa Hisataka, Yoshida Keiichi, Matsuoka Yukiko, Shizuma Kazuko, Imura Yoshinori, Tamiya Hironari, Nakai Sho, Yagi Toshinari, Nagata Shigenori, Yui Yoshihiro, Sasagawa Satoru, Takenaka Satoshi	4. 巻 12
2. 論文標題 Establishment of Organoids From Human Epithelioid Sarcoma With the Air-Liquid Interface Organoid Cultures	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Frontiers in Oncology	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3389/fonc.2022.893592	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4件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 若松 透
2. 発表標題 FDG-PETによる後腹膜悪性軟部腫瘍の悪性度評価および治療方針・成績の検討
3. 学会等名 第54回日本整形外科学会骨・軟部腫瘍学術集会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 若松 透
2. 発表標題 FDG-PETによる後腹膜肉腫における予後予測の有用性の検討
3. 学会等名 第5回日本サルコーム治療研究学会学術集会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 若松 透
2. 発表標題 患者由来肉腫を用いた肉腫オルガノイド株およびマウス移植モデルの樹立
3. 学会等名 第55回日本整形外科学会骨・軟部腫瘍学術集会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 若松 透
2. 発表標題 Development of sarcoma organoid panel with the air-liquid interface organoid cultures
3. 学会等名 第81回日本癌学会学術総会
4. 発表年 2022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