

令和 6 年 6 月 14 日現在

機関番号：24701

研究種目：基盤研究(C)（一般）

研究期間：2021～2023

課題番号：21K08209

研究課題名（和文）AXLを標的とした肺がん個別化医療実現に向けた基盤研究

研究課題名（英文）Basic research for AXL-targeted precision medicine

研究代表者

山本 信之（Yamamoto, Nobuyuki）

和歌山県立医科大学・医学部・教授

研究者番号：60298966

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,100,000円

研究成果の概要（和文）：CTCの測定デバイスとして用いるマイクロ流路セルソーターの前臨床評価を実施し、平均回収率は61%であった。特殊保存管を用いた場合の経時的回収率についても60%以上の回収率であることを確認できた。現在、臨床評価のためのAXL染色を確立中である。回収した細胞を用いての次世代シーケンスでの遺伝子変異検出について検討を行った。微小組織検体を用いたオルガノイド培養に取り組み、オルガノイド培養が可能であることを確認した。樹立したオルガノイドについては、次世代シーケンスを実施し、臨床検査におけるデータとの一致を認めた。現在はCTCを用いてのオルガノイド培養の実施を継続している。

研究成果の学術的意義や社会的意義

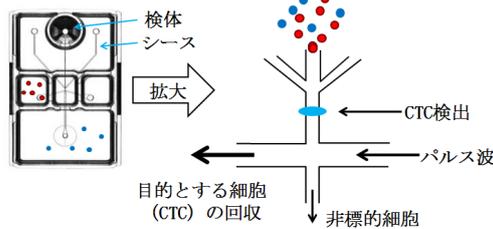
CTCの臨床的意義については数多くの報告があるが、AXL発現陽性CTCのゲノム及び分子生物学的特徴の解明は十分になされていない。これらを明らかにすることで、肺がんにおけるリキッドバイオプシーとしての新たな診断法確立や新規の治療戦略、そして創薬につながる可能性がある。本研究開発においてはAXL陽性CTCの機能、臨床意義のより詳細な研究のため、CTC由来オルガノイド細胞株の樹立に取り組んだ。従来は明らかでなかったAXL陽性CTCの特徴を分子生物学的レベルで解明することにつながるるとともに、創薬ツールとして利用することで、CTCを利用した診断法、治療戦略及び薬剤開発への橋渡しとなる可能性がある。

研究成果の概要（英文）：Preclinical evaluation of micro-fluidic cell sorter for detecting CTCs was conducted and sensitivity of 61% in detecting rare tumor cells was confirmed. Detection rate overtime using the preserve tube was also evaluated and 60% or more sensitivity was confirmed. Additional immuno-staining for AXL is being tested for the clinical evaluation. Next-generation sequencing using rare tumor cells were evaluated and DNA extracted from 10 or more cells were sufficient for the sequencing. Organoid culture using small tissue specimens were tested and it was confirmed to be technically feasible and detection of somatic mutations using those organoids was also feasible. Organoid culture using CTCs are now ongoing.

研究分野：肺癌

キーワード：分子標的治療 個別化医療 肺癌

これまでの取り組みにて、進行肺がん 20 症例における AXL 発現陽性 CTC の測定及び臨床的意義の探索を実施してきた。本研究提案採択後には、分子標的治療薬である EGFR 阻害剤もしくは ALK 阻害剤での治療を受ける症例及び免疫チェックポイント阻害剤治療を受ける肺がん症例に対する前向き臨床研究を実施する。予定登録症例数は全体で 100 例を予定しており、治療開始前、開始 2 週間後、増悪時の 3 ポイントでの測定を実施する。治療への奏功、無増悪生存期間、全生存期間との相関について解析を行い、AXL 発現陽性 CTC の臨床的意義の解明に取り組む。CTC の測定は研究代表者及び分担社が開発に携わったマイクロ流路セルソーターを使用する (図 2)。



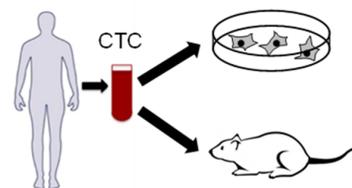
(図2) 微量セルソーターによるCTCの回収

(2) AXL 陽性血中腫瘍細胞のシングルセルレベルでの分子生物学的特徴の解明

上記の臨床試験実施時に AXL 発現陽性 CTC を回収し、次世代シーケンスを用いてのゲノム異常の解析を実施する。また、CTC における heterogeneity/不均一性の解明に取り組むため、シングルセルレベルでの遺伝子発現解析を平行して行う。シングルセル解析用のライブラリ製作には 10X genomics 社の single cell controller を用い、RNA シークエンスにはイルミナ社の次世代シーケンサー (NextSeq 500) を用いる。AXL 発現陽性 CTC における heterogeneity の解明を行うことで、従来の検討では不可能であった CTC の多様性について新たな知見を見出すことが可能となる。加えて、原発巣の腫瘍組織と発現プロファイルの比較を行うことで、従来は明らかにすることが不可能であった新規の治療標的を同定することを目指す。

(3) AXL 陽性 CTC のオルガノイド培養研究

本研究開発において、我々はオルガノイド培養法、高度免疫不全マウスへの移植及びゲノム編集の手法を用いることで AXL 陽性 CTC の培養を行い、AXL 陽性 CTC 由来細胞株の樹立を行う (図 3)。その上で AXL 陽性 CTC の多様かつ特異的な分子生物学的特徴を解明し、さらなるがん個別化医療の実現に向けた CTC を利用した創薬基盤の確立に取り組む。本研究においては 20 症例からのオルガノイド培養の樹立を目指す。培養においては、ヒト幹細胞培養用の培養液を用いるとともに、細胞外マトリックスの添加を行う。CTC に応じた細胞外マトリックス及び線維芽細胞等の間質細胞の選定を最適化することにより、より効率的な三次元細胞培養モデルの確立に取り組む。樹立されたオルガノイドが元の腫瘍の性質を維持しているかどうかの確認のために、NOG マウス等の高度免疫不全マウスへの皮下移植により腫瘍形成能を確認する。患者組織と形成された腫瘍の病理組織学的及び各種免疫染色マーカー発現の比較を行い、その類似性及び差異を組織学的に評価する。加えて、次世代シーケンスにてゲノムレベルでの原発巣との違いを同定することで、CTC に特異的な分子生物学的特徴を明らかにする。

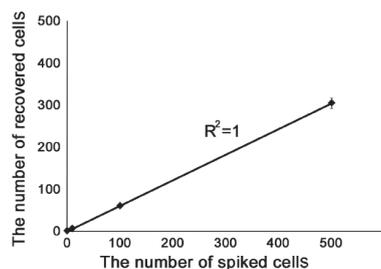


(図3) CTC由来培養細胞樹立

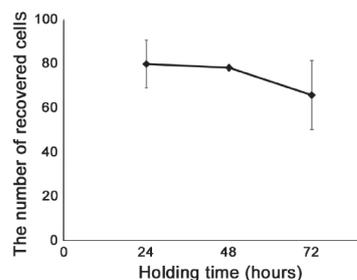
4. 研究成果

(1) AXL 発現 CTC の前向き臨床試験試験

CTC の測定デバイスとして用いるマイクロ流路セルソーターの評価を実施した。肺癌細胞株である PC-9 細胞を用いてスパイクイン実験を行った。特殊保存管を用いて健常人から採取した末梢血中に PC-9 細胞を 0、10、100、500 個添加して、実際に回収できた細胞数を評価した。結果をグラフ化したものが図 4 であり、回収率の平均は 61%であった。また、特殊保存管を用いた場合の経時的回収率の評価についても検討を実施した (図 5)。保存管中に検体を 24、48、72 時間保存し、回収率の検討を行った。72 時間ではやや低下を認めるも概ね 60%以上の回収率を達成することが確認できた。



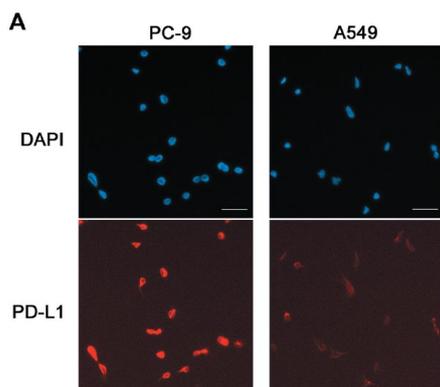
(図 4) スパイクイン実験での線形性



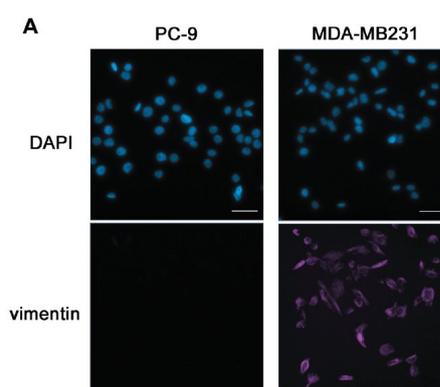
(図 5) 経時的回収率の評価

上記に加えて、標的とするタンパク質の発現の検出について検討を行った。PD-L1 と vimentin の発現の検出を、PC-9 と A549 の 2 種類の肺癌細胞株及び MDA-MB231 乳癌細胞株を用いて実施し

た。検討の結果、本システムにおいて追加での免疫染色が可能であり、標的タンパク質の評価が可能であることを確認した (図 6)。現在、AXL の染色を確立中である。



(図 6) PD-L1 発現の評価



(図 7) Vimentin 発現の評価

(2) AXL 陽性血中腫瘍細胞のシングルセルレベルでの分子生物学的特徴の解明

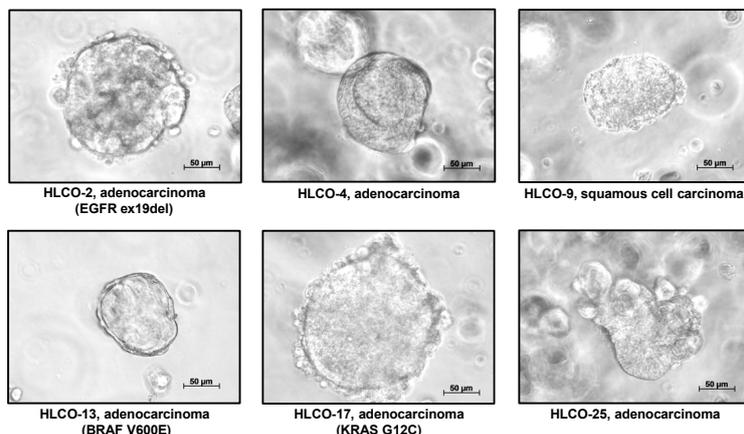
次に、回収した細胞を用いて、次世代シーケンスでの遺伝子変異検出が可能かどうかの評価を行った。肺癌及び乳癌の 3 種類の細胞株を用いて、マイクロ流路セルソーターを用いてスパイクインモデルより回収した細胞株より抽出した DNA を用いてシーケンスを実施した (表 1)。いずれの細胞株においても特徴的な遺伝子変異を検出することができたことより、本法での回収に伴う細胞への侵襲が低いことが確認された。加えて、10 個の細胞から抽出した DNA を用いても遺伝子変異検出が可能であったことより、臨床検体から回収した非常に限られた数の CTC を用いての次世代シーケンスについて技術的に問題無いことが確認できた。

Cell line	Spiked cell number	Mean depth	Gene	Type	Allele frequency (%)
PC-9	10	1689	<i>EGFR</i>	Deletion	70.13
			<i>CDKN2A</i>	SNV	3.18
			<i>TP53</i>	SNV	26.83
	100	1780	<i>EGFR</i>	Deletion	97.62
			<i>CDKN2A</i>	SNV	22.73
			<i>TP53</i>	SNV	49.38
500	1687	<i>EGFR</i>	Deletion	100	
		<i>CDKN2A</i>	SNV	46.15	
		<i>TP53</i>	SNV	74.63	
A549	10	1687	<i>KRAS</i>	SNV	8.57
	500	2076	<i>KRAS</i>	SNV	95.45
	MDA-MB231	317	<i>BRAF</i>	SNV	36
<i>KRAS</i>			SNV	28.41	
<i>TP53</i>			SNV	44.58	

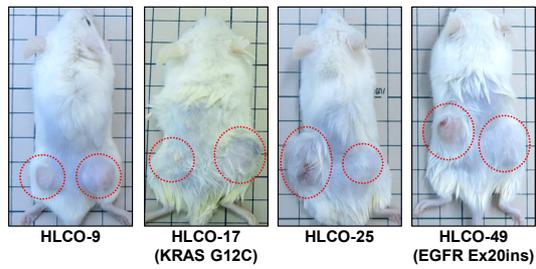
(表 1) 次世代シーケンスの結果

(3) AXL 陽性 CTC のオルガノイド培養研究

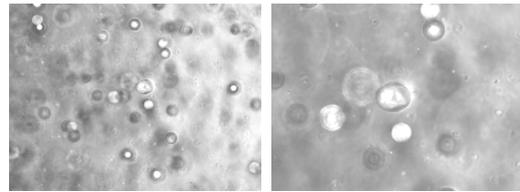
CTC を用いてのオルガノイド培養の前段階として、組織検体を用いたオルガノイド培養にまずは取り組んだ。肺癌症例において内視鏡的に採取した微小組織を用いてのオルガノイド培養が可能であることを確認することができた (図 8)。オルガノイドを樹立できたものについてマウスに移殖しその腫瘍形成能を評価した (図 9)。移殖後の腫瘍形成の成功率は 18.3%であった。この結果は一般的な成功率より高く、本研究に用いた腫瘍組織検体の多くが、診断時の微小検体であることを考慮すると良好な数字であると考える。樹立したオルガノイドについては、次世代シーケンスを実施し、患者の臨床検査におけるデータとの一致を認めた。今後の肺癌研究におけるツールとして有用であることが本研究の結果から得られた。



(図 8) 生検組織を用いてのオルガノイド培養



(図9) マウスでの腫瘍形成能の確認



(図10) CTCを用いてのオルガノイド培養

組織検体でのオルガノイド培養の検討を実施した後に、CTCを用いてのオルガノイド培養の取り組みを開始した。現在、原発性肺癌と診断された症例より採取した末梢血からCTCを用いてオルガノイド培養を実施・継続中である(図10)。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計3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 Miura Satoru, Koh Yasuhiro, Azuma Koichi, Yoshioka Hiroshige, Koyama Kenichi, Teraoka Shunsuke, Ishii Hidenobu, Kibata Kayoko, Ozawa Yuichi, Tokito Takaaki, Oyanagi Jun, Shimokawa Toshio, Kurata Takayasu, Yamamoto Nobuyuki, Tanaka Hiroshi	4. 巻 23
2. 論文標題 Afatinib plus osimertinib in the treatment of osimertinib-resistant non-small cell lung carcinoma: a phase I clinical trial	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 BMC Cancer	6. 最初と最後の頁 オンラインのため頁なし
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1186/s12885-022-10467-w	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 IKEDA MIO, KOH YASUHIRO, OYANAGI JUN, TERAOKA SHUNSUKE, ISHIGE MASAYUKI, FUJIMURA YUU, TAKEDA KAZUO, TOKUDOME NAHOMI, OZAWA YUICHI, UEDA HIROKI, YAMAMOTO NOBUYUKI	4. 巻 42
2. 論文標題 High-purity Isolation for Genotyping Rare Cancer Cells from Blood Using a Microfluidic Chip Cell Sorter	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Anticancer Research	6. 最初と最後の頁 407 ~ 417
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.21873/anticancerres.15499	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 Ikeda Mio, Koh Yasuhiro, Teraoka Shunsuke, Sato Koichi, Oyanagi Jun, Hayata Atsushi, Tokudome Nahomi, Akamatsu Hiroaki, Ozawa Yuichi, Endo Katsuya, Higuchi Masayuki, Nakanishi Masanori, Ueda Hiroki, Yamamoto Nobuyuki	4. 巻 13
2. 論文標題 Longitudinal Evaluation of PD-L1 Expression on Circulating Tumor Cells in Non-Small Cell Lung Cancer Patients Treated with Nivolumab	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Cancers	6. 最初と最後の頁 2290 ~ 2290
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3390/cancers13102290	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3件（うち招待講演 0件／うち国際学会 1件）

1. 発表者名 小柳潤
2. 発表標題 進行性胸部原発悪性腫瘍患者からのオルガノイドの樹立
3. 学会等名 日本肺癌学会学術総会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 Jun Oyanagi
2. 発表標題 Establishment of organoids derived from patients with advanced thoracic malignancies
3. 学会等名 American Association for Cancer Research Annual Meeting (国際学会)
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 小柳潤
2. 発表標題 Establishment of organoids derived from patients with advanced thoracic malignancies
3. 学会等名 日本癌学会学術総会
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
研究分担者	洪 泰浩 (Koh Yasuhiro) (80426519)	和歌山県立医科大学・医学部・准教授 (24701)	

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