

令和 6 年 6 月 13 日現在

機関番号：15401

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2021～2023

課題番号：21K08734

研究課題名(和文)患者由来オルガノイドを用いた胃癌新規治療標的の探索

研究課題名(英文) Exploration of novel therapeutic targets for gastric cancer using patient-derived organoids

研究代表者

田邊 和照 (Tanabe, Kazuaki)

広島大学・医系科学研究科(保)・教授

研究者番号：40379847

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)：胃癌臨床検体から作成した患者由来胃癌オルガノイドを用いて3次元培養下で患者由来免疫細胞を用いて免疫応答を解析しうるオルガノイド培養系の確立と新規治療標的の探索を目的とした。本研究期間内では、免疫細胞応答が可能なオルガノイド培養法であるオーバーレイ培養法を確立した。さらに胃癌オルガノイドオーバーレイ培養下で患者由来NK細胞と接触させ細胞障害性およびコンカナマイシンによるその抑制効果を確認した。今後は、リアルタイムに腫瘍内微小環境免疫応答を患者生体内により近い反応として展開できるものとする。結果を、英文誌(Heliyon)に発表した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究結果であるオルガノイドオーバーレイ培養法は、これまで困難であったオルガノイドと免疫細胞応答を可能にした。我々は実際に、胃癌オルガノイドにNK細胞などの免疫細胞を接触させ免疫応答を確認し得た。本研究の成果により、たとえば癌オルガノイドを用いた新規免疫治療開発など様々な基礎研究に展開される可能性を有しており、われわれも引き続き研究発展を目指していく予定である。

研究成果の概要(英文)：The objective of this study was to establish an organoid culture system in which patient-derived gastric cancer organoids generated from clinical specimens of gastric cancer can be used to analyze immune responses using patient-derived immune cells under three-dimensional culture and to explore new therapeutic targets. Within this research period, we established the overlay culture method, an organoid culture method capable of immune cell response. Furthermore, we confirmed the cytotoxicity and the inhibitory effect of concanamycin on gastric cancer organoids in contact with patient-derived NK cells under overlay culture. In the future, we will be able to develop a real-time intratumor microenvironmental immune response that is closer to the patient's in vivo response. The results were published in Heliyon.

Translated with DeepL.com (free version)

研究分野：胃癌

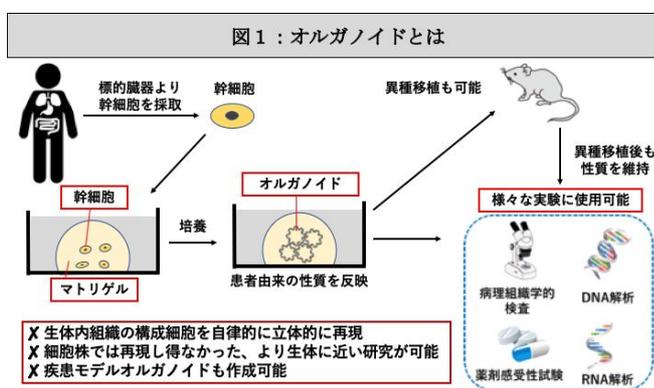
キーワード：オルガノイド 胃癌

## 1. 研究開始当初の背景

高度進行胃癌の予後は未だ不良で、特に胃癌の特性である heterogeneity が胃癌の治療予測・治療抵抗性に関与している可能性がある。申請者らはこれまで抗がん剤の種類により臓器特異性があることを明らかにした(Tanabe et al. Ann Oncol 20151) 他)。このことはこれまでの胃癌細胞株を用いた胃癌治療開発では不十分であることを示しており、より生体に近い環境での研究が望まれている。一方、佐藤らはマウス小腸からオルガノイドと呼ばれる生体内組織に似た構成要素を含む構造の三次元培養法を確立し、臨床検体からの大腸腫瘍オルガノイドを樹立した(Cell Stem Cell. 2016)。胃癌においても Seidilitz T らにより 2018 年胃癌オルガノイドの樹立の報告がなされている(Gut. 2018)。オルガノイドは in vivo の臓器と同様に幹細胞を豊富に含むため、オルガノイドを癌研究における利点として、

- 1 不死化の必要がない
- 2 臨床検体からの癌オルガノイドが作成可能
- 3 長期継代培養や凍結保可能などが挙げられる。(図 1)

われわれは胃癌の heterogeneity を考慮すると患者の体内で生じている腫瘍動態についてオルガノイドを用いることでそれぞれの対象臓器ごとに詳細に解析できると考え、これまでに胃癌や大腸癌などの消化器癌オルガノイドの樹立を行い胃癌オルガノイドと 5-Fu など抗癌剤感受性につい



ての報告も行うとともに(Sakamoto N et al. eLife. 2017)患者臨床検体からの胃癌オルガノイド培養システムの樹立もすでに確立した。近年免疫チェックポイントやリンパ球など免疫細胞による細胞傷害性の向上に関する開発が期待されている。しかしながら通常のオルガノイド培養法では細胞外マトリックスであるマトリゲル内に包埋することが必要で、マトリゲル内にはリンパ球は侵入することはできないという問題がある。これまでの報告では作成した癌オルガノイドを single cell 化した後にリンパ球と共培養するとして報告(Dijkstra KK et al. Cell 2018)はあるもののオルガノイドの特徴である 3 次元構造を保った状態での免疫療法感受性モデルは確立されておらず、3 次元培養下での免疫細胞接触を可能とするモデル開発が急務と考えられた。

## 2. 研究の目的

本研究では、胃癌臨床検体から作成した胃癌オルガノイドを用いて抗がん剤感受性試験や免疫細胞を含めた免疫チェックポイント阻害剤投与による細胞傷害性試験を行い種々の疲弊マーカー変化などを解析し実際の臨床での治療効果との相関や新規治療標的分子の探索を行い、胃癌に対する個別化薬物療法や細胞療法の基盤となる研究を行うことを目的とした。

### 3. 研究の方法

具体的な研究題目として、

#### 免疫応答が可能な胃癌オルガノイド培養系の確立

#### 胃癌オルガノイドに対する免疫応答

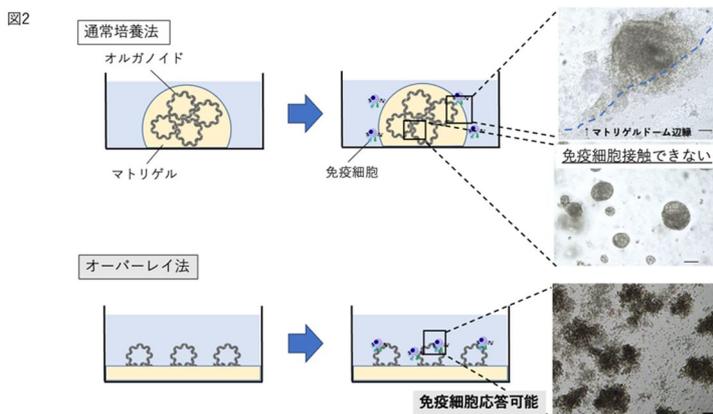
を掲げ、将来的な新規免疫化学療法開発やリアルタイム免疫モニタリングの実現のための基盤になることを目指した。

### 4. 研究成果

#### 免疫応答が可能な胃癌オルガノイド培養系の確立

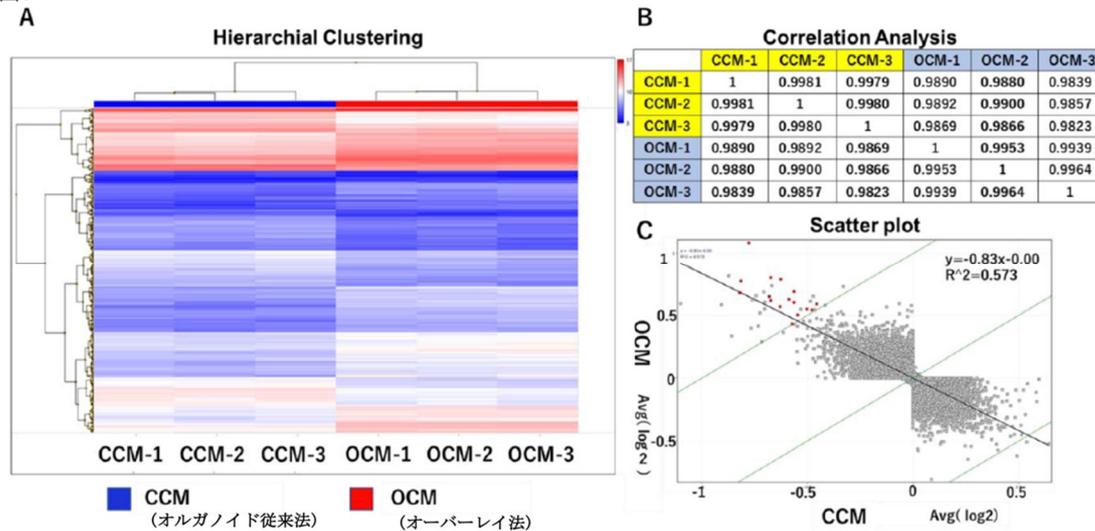
従来のオルガノイド培養では、マトリゲル内にオルガノイドを包埋して培養する必要があり、このために、癌オルガノイドと免疫細胞応答の観察を行うことができず、先行研究では一旦オルガノイドを形成させて後に、マトリゲルを溶解して免疫細胞と接触させるといった報告が多く、3次元構造を保ったままで経時的に免疫応答を観察できるモデルの確立が急務と考えた。

これを実現するためにマトリゲルを必要としない培養系など様々な方法を試みたが、最終的にオーバーレイオルガノイド培養法を確立することができた。通常培養法では免疫細胞はマトリゲル内に侵入できないのに対し、マトリゲルを底面に薄く引き、その上でオルガノイドを培養すると、オルガノイド内に免疫細胞が侵入することが確認できた(図2)。



オーバーレイ法で作成したオルガノイドが通常培養法で作成したオルガノイドと相同性が保たれているかを確認すべく両者をマイクロアレイ解析を行ったところ、99%以上の相同性があることが確認できた(図3)。

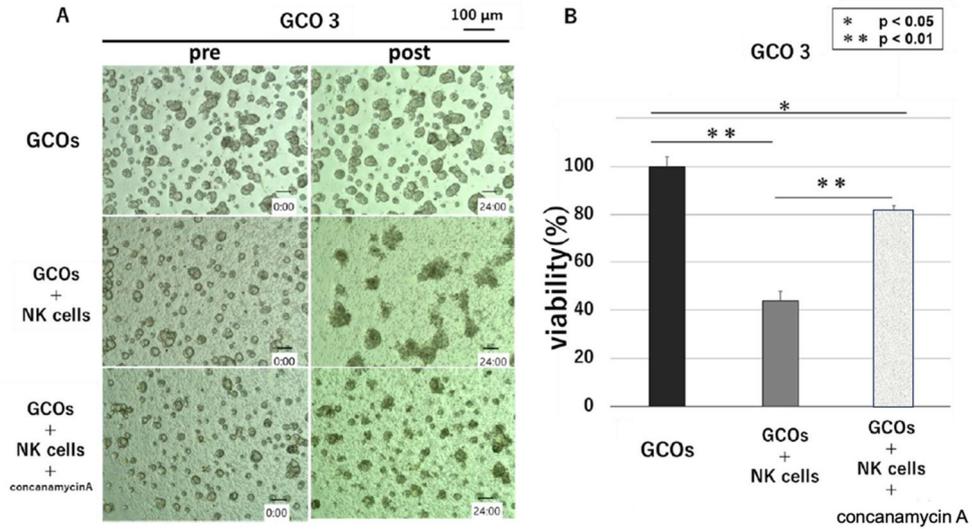
図3



## 胃癌オルガノイドに対する免疫応答

次に実際にオーバーレイ培養下での免疫応答を確認した。胃癌オルガノイドをオーバーレイ培養を行い、healthy donor からの NK 細胞を投与したところ、NK 障害が生じていることが形態学的にも確認され、この反応は concanamycin A で抑制されることも核にできた (図 4)。

図4



さらに、この免疫応答を3次元培養下にリアルタイムに観察できるかどうかについても検討することとした。細胞障害性は LDH 細胞障害アッセイを用いることとした。

図5

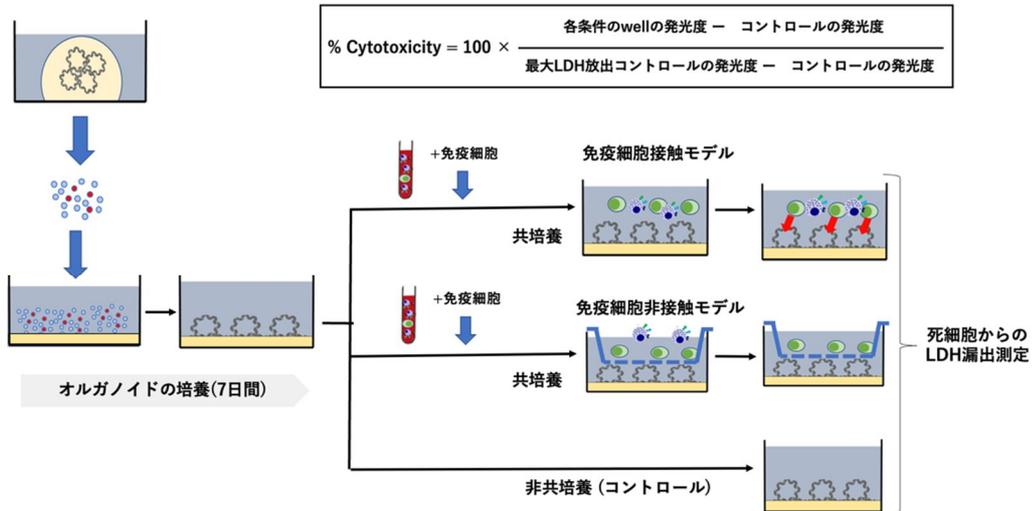
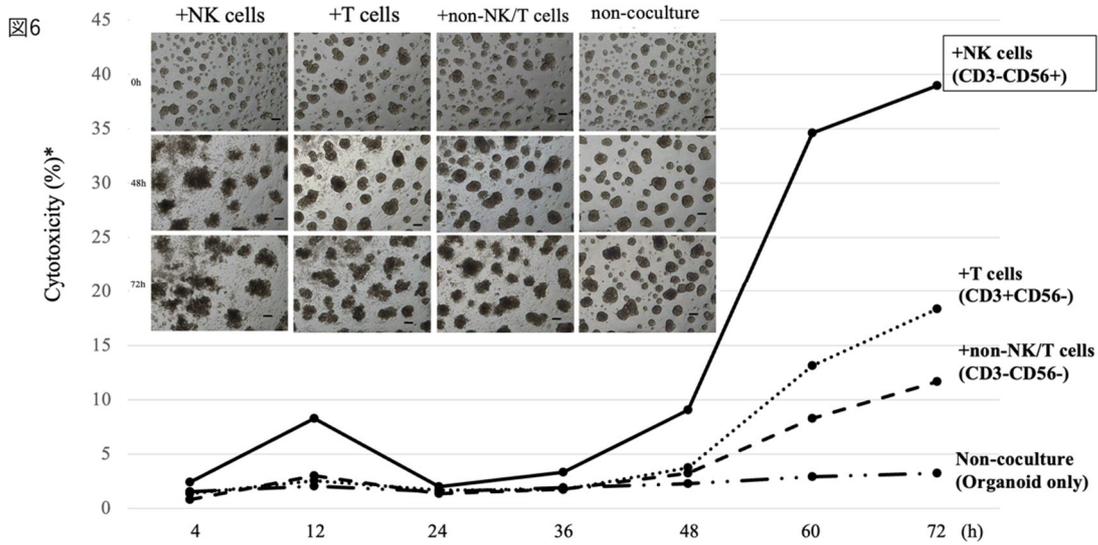


図5の如く、胃癌オルガノイド培養7日後に免疫細胞と共培養し、死細胞からのLDHを経時的に測定することでリアルタイム細胞障害アッセイについて解析した。



health donor からの血液を胃癌オルガノイドと応答させたところ、経時的な細胞障害を確認することができた (図6)。72時間の共培養で最も細胞障害が高かったのはNK細胞を加えた群で、次にTcell, nonNK/Tcellの順であることが確認できた。

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 Ota Hiroshi, Tanabe Kazuaki, Saeki Yoshihiro, Takemoto Yuki, Chikuie Emi, Sakamoto Naoya, Ohdan hideki	4. 巻 9
2. 論文標題 Establishment of a novel overlay culture method that enables immune response assessment using gastric cancer organoids	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 Heliyon	6. 最初と最後の頁 e23520
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.heliyon.2023.e23520	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

〔出願〕 計1件

産業財産権の名称 がんオルガノイドの製造方法，評価方法および培養キット	発明者 大段秀樹，田邊和照，杉山友加，太田浩志	権利者 同左
産業財産権の種類、番号 特許、2021-087909	出願年 2021年	国内・外国の別 国内

〔取得〕 計0件

〔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	坂本 直也  (Sakamoto Naoya)  (20571798)	国立研究開発法人国立がん研究センター・先端医療開発センター・ユニット長   (82606)	

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