

患者由来オルガノイドと遺伝子解析を用いた IPMN の 増殖進展形態の解明

東北大学大学院医学系研究科 病態病理学分野

椎 原 正 尋

I 要 旨

膵管内乳頭粘液性腫瘍 (IPMN) は通常型膵管癌とは異なる増殖、浸潤形態をとることが近年明らかになってきたが、いまだ不明な点が多い。また、細胞株の樹立が極めて難しく *in vitro* モデルが少ない。我々は患者由来 IPMN オルガノイドと遺伝子解析を用いて IPMN の増殖進展形態の解明を試みた。

外科切除検体からオルガノイド培養を行った。培養に成功した患者由来オルガノイドのタイムラプス観察と遺伝子解析を行い増殖形態の観察と変異プロファイルを明らかにした。変異プロファイルから治療標的分子候補を抽出し、候補分子標的薬の効果をオルガノイド培養細胞で確認した。

Subtype の異なる数種類の IPMN オルガノイド培養に成功した。タイムラプス観察では、オルガノイドが粘液を分泌する形態や分裂増殖する形態の観察に成功した。全エクソーム解析の結果から抽出したドライバー遺伝子変異の特異的阻害剤によって IPMN オルガノイドの増殖と粘液分泌が抑制された。さらに同一症例から培養した IPMC オルガノイドと膵管癌オルガノイドの transcriptome 解析の結果の比較から IPMC に高発現している geneX を同定した。

外科切除腫瘍検体を用いたオルガノイドの観察と遺伝子解析の結果から IPMN の増殖形態の

一部を解明した。さらなる解明や治療薬の開発につなげたい。

II 目 的

膵管内乳頭粘液性腫瘍 (IPMN) は前癌病変として位置づけられるが、その特徴は通常型膵管癌とは異なり独自の発現、浸潤形態を取ることが近年の研究で明らかになっている。さらに、IPMN は亜型によっても発現形態と進行癌への形質転換の過程が異なることも遺伝子研究で解明されてきている。しかし、患者由来 IPMN 細胞株の樹立は極めて困難で報告も少なく、*in vitro* モデルも不足しており、IPMN の増殖・浸潤形態は不明な点が多い。また、近年 IPMN の遺伝的 heterogeneity を示唆する報告が散見されるが、このことが培養を困難にしている一つの理由であると考えられる。

オルガノイド細胞とは、組織特異的な機能を保ちながら増殖する三次元構造体である。患者の癌細胞から作成、培養されたオルガノイドは従来の二次元培養細胞と比較して、より生体の組織環境を模倣しているため、癌モデルとしての利用が期待されている。申請者は、これまで膵・胆道癌の手術切除サンプルからオルガノイド培養法を確立させ、オルガノイドを用いた膵・胆道癌の個別化医療 *in vitro* モデルを開発した。過去に報告がほとんどない患者由来 IPMN オルガノイドの培養にも成功している。

本研究では、IPMN 切除検体から患者由来オルガノイドを培養し、遺伝子解析 (whole

exome sequencing, transcriptome sequencing, single cell sequencing) を行う。また、継代による発現の変化とオルガノイドを観察、比較することで IPMN の増殖、進展に関与するドライバー遺伝子、ターゲット遺伝子の同定を計る。進展に関わる遺伝子を in vitro モデルの中で同定することを目的とし、IPMN の治療に直結する期待がある。

III 方 法

IPMN 手術切除検体から腫瘍組織をサンプリングし、オルガノイド培養を行った。我々の既存のプロトコール (Shiihara M, Ishikawa T, Furukawa T, et al. Development of a system combining comprehensive genotyping and organoid cultures for identifying and testing genotype-oriented personalised medicine for pancreaticobiliary cancers. Eur J Cancer 2021; 148: 239-250.) に改変を加えて培養を試みた。培養に成功した患者由来 IPMN オルガノイドは全エクソーム解析、transcriptome 解析を行い、変異プロファイルを明らかにした。変異プロファイルの中から driver gene を抽出し、さらにその中から治療標的分子候補を選択し、候補分子標的薬の効果を organoid 培養細胞で細胞増殖アッセイ、粘液分泌解析を行い検証した。

IV 結 果

subtype の異なる患者由来 IPMN オルガノイドの培養に成功した。培養した患者由来オルガノイドは原発腫瘍と同様の形態的特徴を保ちながらも、免疫染色では heterogeneous な発現形態を示した。

増殖過程においてオルガノイドの細胞塊の周囲に粘液が多く観察され、タイムラプス観察では、オルガノイドが粘液を分泌する瞬間と子オルガノイドが分裂する瞬間を捉えることに成功

した。(図 1)

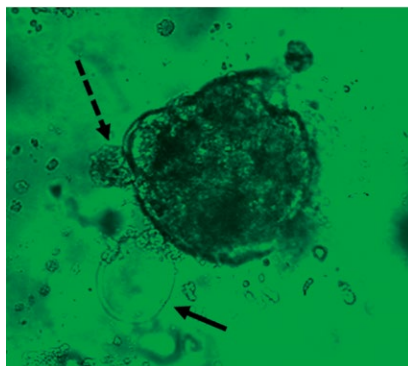


図 1 オルガノイドのタイムラプス観察画像
矢印：粘液
破線矢印：分裂した子オルガノイド

次に、培養に成功したオルガノイドと原発腫瘍の全エクソーム解析の結果を比較した。オルガノイドは IPMN に特徴的ないくつかの変異遺伝子が同定されたが、原発腫瘍の変異遺伝子と一部でのみ一致していた。

全エクソーム解析の結果からドライバー遺伝子変異を抽出し、その標的療法の効果をオルガノイドで検証した。その結果、オルガノイドは protein kinase A (PKA) inhibitor によって、阻害剤の濃度と相関して増殖が抑えられていた (図 2)。さらに、特異的阻害剤によって、粘液分泌も抑制されることが示唆された。

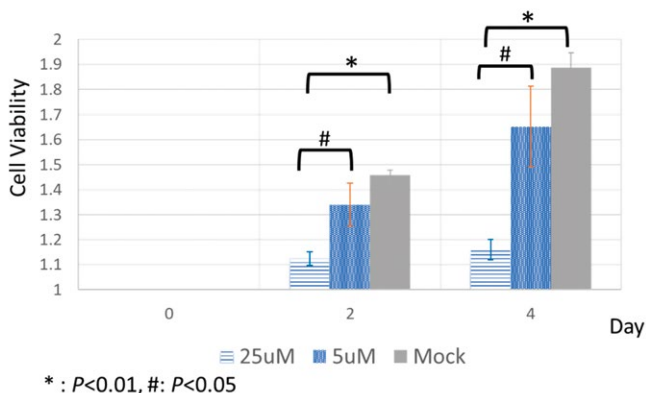


図 2 PKAinhibitorによるオルガノイドの増殖アッセイ濃度に相関して増殖が抑えられている

続いて、同一症例から得られた患者由来膵管癌オルガノイドと IPMC オルガノイドの RNA を抽出し transcriptome 解析を行い、2 者の比較をした。その結果、IPMC オルガノイドで 33 倍の発現を認めたドライバー遺伝子 geneX を抽出した。geneX の特異的阻害剤を用いた機能解析実験を現在施行中である。

V 考 察

本研究の成果により、患者由来 IPMN オルガノイドとゲノム解析を用いて、IPMN の増殖形態、粘液分泌機構の一部を解明することが出来た。しかし以下の様な課題点が考えられる。

- ・ IPMN 腫瘍の遺伝的 heterogeneity

全エクソーム解析の結果から、腫瘍の一部から培養したオルガノイドは、腫瘍全体の遺伝的特徴を網羅しているわけではないことが考えられた。過去の報告でも同様のことが示唆されている。

- ・ 継代による遺伝子発現の変化

培養に成功したオルガノイドの中には、長期培養が可能であったものの他に、数ヶ月で増殖速度が衰えるものがあった。継代によるオルガノイドの形態、遺伝子発現の変化が考えられる。継代ごとに single cell sequence などを行うことで、長期生存や増殖に必要なドライバー遺伝子変異が同定でき、治療薬の開発につながると考える。今後研究を予定している。

VI 結 語

外科切除腫瘍検体を用いたオルガノイド培養と、遺伝子解析を用いて IPMN の増殖形態の一部を解明することができた。さらなる解析を加えて治療薬の開発や個別化医療の臨床応用を実現化させたい。