

膵癌患者由来オルガノイドを用いた新たな サブタイプ分類と臨床応用

九州大学病院 肝臓・膵臓・胆道内科

藤 森 尚

I 要 旨

膵癌の予後は極めて不良であり、早期診断法や新規治療法の開発が不可欠である。がんゲノム医療が注目されているが、膵癌においては治療標的になる遺伝子変異の検出頻度が低く、解析結果のフィードバックに要する猶予期間 (turn-around time) も長いため、個別化医療の実現には課題が多い。近年、膵癌の分子遺伝学解析により、比較的予後の良い Classical サブタイプと予後不良な Basal-like サブタイプのサブタイプ分類が報告されたが、両サブタイプとも不均一な細胞集団より構成されており、臨床応用に向けたバイオマーカーや治療標的も同定されていない。

本研究では診断時に施行した超音波内視鏡下穿刺吸引法 (EUS-FNA) により得られる組織検体を用いて、生体内の腫瘍細胞多様性が維持される膵癌患者由来オルガノイド (PDO) の樹立を行った。更に膵癌 PDO ライブラリーを作成し、サブタイプ分類の臨床応用を推進することを目的とした。当院倫理委員会の承認を得た後、患者登録とサンプル集積を開始し、2020 年 4 月から 2023 年 3 月の期間に 49 サンプルを採取し 35 の PDO を樹立した。PDO の形態評価から腺管様構造を呈する GL type と内部に密に増殖する DP type に分類でき、RNA-seq の結果と併せてこの形態分類が分子サブタイプと相関することを明らかにした。この形態分類はサンプリング後早期に判定でき (=turn-around time が短い)、臨床予後や治療反応性と相関し

ていた。本研究結果が、サブタイプ分類の臨床応用に向けて重要な役割を持つと考えている。

II 目 的

切除不能膵癌の標準治療はゲムシタピン (GEM)・ナブパクリタキセル併用 (GnP) 療法や modified FOLFIRINOX (mFFX) 療法であるが、これらの化学療法の治療効果を事前に予測することは難しく、患者背景などを考慮して治療薬を選択しているのが実情であり、個別化医療の実現には課題が山積している。近年の分子遺伝学解析により、膵癌は比較的予後の良い「Classical」と予後不良な「Basal-like」の 2 つのサブタイプに分類され、同一腫瘍内に異なるサブタイプが混在し Classical から Basal-like へと進展することが報告された (*Nat. Genet* 2015¹⁾・2020²⁾)。このサブタイプ分類は臨床予後と相関し (*Clin. Cancer Res* 2020³⁾)、膵癌治療の発展、個別化医療の糸口になることが期待されているが、実臨床ではサブタイプの判別自体が困難である。臨床応用にはより簡便なツールが必要であり、生体内の腫瘍性質を維持したオルガノイドが突破口になり得る。我々は切除不能膵癌の患者サンプル (EUS-FNA 検体や肝転移検体) を用いたオルガノイド樹立に成功し、ライブラリー構築を進めている。その過程で、形態学的特徴から、オルガノイドを 2 つのタイプに分類でき、その分類は上述のサブタイプ分類を反映していることを見出した (図 1、GL=Classical, DP=Basal-like)。本研究で

は、オルガノイドの形態分類を応用した膵癌至適治療戦略の構築を目的とする。

Ⅲ 方 法

1) サンプル採取～PDO 樹立・ライブラリー作成 (図2)：本研究計画について当院倫理審査委員会の承認後(許可番号 2019-592)、2020年4月よりサンプル採取を開始した。具体的には、診断時のEUS-FNA、肝転移巣の経皮生検、外科切除、ERCP、腹水穿刺から得られたサンプルを利用し、洗浄、酵素処理、赤血球除去しシングルセル化を行い、生細胞数をカウント後 Matrigel で包埋し、幹細胞性維持、細胞生存・増殖に必

要な種々のニッチ因子を調整した medium で培養を行った。

- 2) RNA-seq：PDO から RNA を抽出後、total RNA (500 ng) からリボソーム RNA を除去し、NEBNext Ultra RNA Library Prep Kit for Illumina を使用してライブラリーを作成、バイオアナライザーを使用してサイズ分布と濃度を決定し、ペアエンド 36 塩基を使用して NextSeq 500 (イルミナ社) で配列決定した。リードをヒト参照ゲノム hg19 にマッピングし、DEGs の抽出、GO 解析、GSEA など各種解析を行った。
- 3) 薬剤感受性試験：臨床応用を実現するために、膵癌 PDO の抗癌剤に対する薬剤感受性について、IC50 値を用いて評価した。PDO

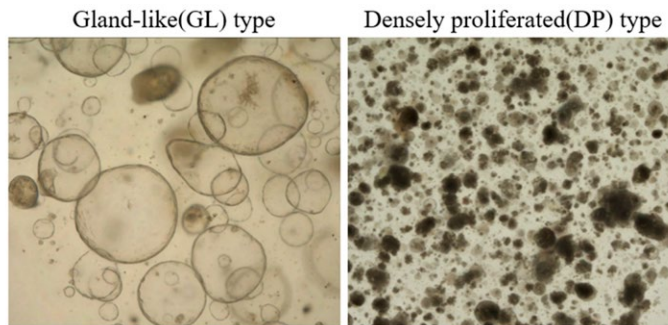


図1 オルガノイドの形態分類

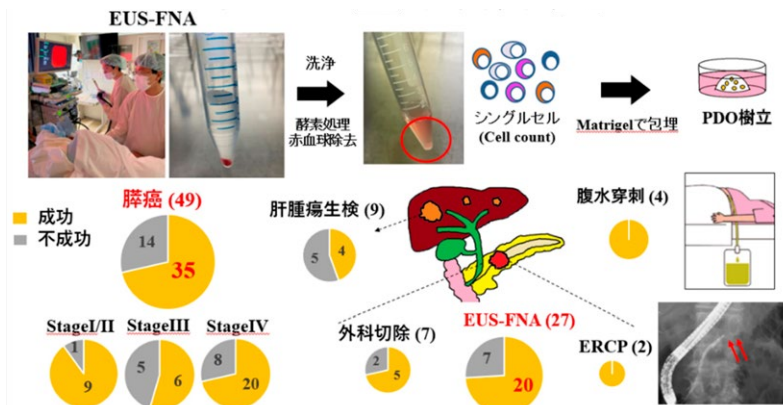


図2 PDO樹立方法、成績

をシングルセル化した後、1000 個の生細胞をマトリゲルと完全培地を含む 96 ウェルプレート (B&W IsoPlate-96 TC; PerkinElmer) に播種した。治療薬として GEM を添加し、5 日後 CellTiter-Glo 2.0 キットを使用して細胞生存率を定量した。

IV 結 果

1) 膵癌 PDO 樹立成功因子の検討

49 サンプル中 35 の PDO (32 症例) を樹立し (71.4%)、切除可能性分類に基づく内訳は R+BR/UR-LA/UR-M : 9/6/17 であった。膵癌 PDO 樹立にはシングルセル化した段階での生細胞数が樹立効率に有意に影響した (生細胞数 10 万以上 vs 未満 : 84% vs 38% ($p < 0.01$))、図 3)。EUS-FNA からの樹立成績は良好であり、幅広い病期の膵癌患者から PDO 樹立が可能であった。

2) PDO 形態分類と RNA-seq

PDO の形態評価から腺管様構造を呈する GL type と内部に密に増殖する DP type に分類でき、RNA-seq の結果と併せてこの形態分類が分子サブタイプと相関することを明らかにした。両群間で明らかなゲノム変異の差は確認されなかった。GL、DP でそれぞれ

DEGs を抽出し、解析を進めている (詳細については論文公表後に報告予定)。

3) 薬剤感受性試験

in vitro での検証において、DP では GEM への感受性が有意に低下していた。今後オキサリプラチンやイリノテカン、パクリタキセル、5-FU など膵癌に対する既存薬への感受性を評価する。また、治療抵抗性の DP type に対する combination therapy など、新規治療法の可能性を探索する。

4) PDO 形態分類と臨床経過との比較検討

切除不能症例における検討で、PDO の形態分類は臨床予後や治療反応性と有意に相関していた (詳細については論文公表後に報告予定)。

V 考 査

がんゲノム医療の進歩に伴い、EUS-FNA サンプルは診断のみでなく治療選択においても重要な意味を持つようになった。しかしパネル検査に利用できる十分な組織量を採取するには、19G といった太い針を使用し複数回穿刺を行う必要があり、出血などの重篤な合併症を引き起こす可能性が懸念されている。今回我々は切除可能症例から進行期まで含めた幅広い病期の膵癌症例で主に EUS-FNA サンプルから PDO を樹立することに成功し、生細胞数 10 万というカットオフを満たすのに 22G 針での 1 回穿刺で十分であることを明らかにした。現在研究ベースで有用性が多数報告されている PDO は今後個別化医療における臨床応用も期待されており、今回の知見の有用性は高いと考える。

また、PDO は元サンプルの特性を再現しており、PDO の形態分類が従来の分子遺伝学的なサブタイプ分類に対応することを明らかとした。PDO は少量の組織サンプルから樹立でき、かつ早期にサブタイプを推定できることは、臨床現場での適切な治療法の選択に役立つ可能性

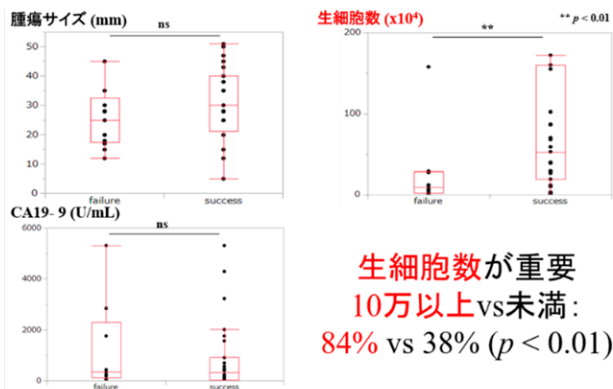


図 3 PDO 樹立成功因子の検討

がある。最終的には、がんゲノム医療における課題であるサンプリングエラーや長い turn-around time を克服する一つの選択肢となりうる。

この形態評価を活用することで迅速かつ容易にサブタイプモデルを構築でき、膵癌の本態解明にも寄与できると考えられる。DP では非常に高い悪性形質を獲得していた。今回新たな治療ターゲット候補の関与も示唆され、今後さらに詳細に解析を進めていき、悪性度の高い DP への新規治療戦略を検討する。

VI 結 論

膵癌 PDO 樹立には EUS-FNA をはじめ多くのサンプリング法が有用で、幅広い病期の PDO 樹立が可能であった。PDO が臨床と研究をつなぐ新たなプラットフォームを構築し、膵癌の本態解明や個別化医療へと応用されることが期待される。

参考文献

- 1) Moffitt RA, Marayati R, Flate EL, *et al.* Virtual microdissection identifies distinct tumor- and stroma-specific subtypes of pancreatic ductal adenocarcinoma. *Nat Genet* **2015**; 47: 1168-78.
- 2) Chan-Seng-Yue M, Kim JC, Wilson GW, *et al.* Transcription phenotypes of pancreatic cancer are driven by genomic events during tumor evolution. *Nat Genet* **2020**; 52: 231-40.
- 3) O'Kane, G. M., *et al.* GATA6 Expression Distinguishes Classical and Basal-like Subtypes in Advanced Pancreatic Cancer. *Clinical Cancer Research* **2020**; 26(18): 4901-10.