

日本医療研究開発機構 創薬基盤推進事業 事後報告書

I 基本情報

研究開発課題名：胆汁からのヒト腫瘍細胞3次元培養技術の確立

Development of 3-D culture technique for tumor cells in bile juice

研究開発実施期間：平成29年5月1日～令和2年3月31日

研究開発代表者 氏名：筆宝 義隆

Yoshitaka Hippo

研究開発代表者 所属機関・部署・役職：

千葉県がんセンター 研究所 発がん制御研究部 部長

Head, Division of Molecular Carcinogenesis, Chiba Cancer Center Research Institute

II 研究開発の概要

背景と目的

胆道・膵臓のがんは最も予後不良であり、革新的な治療法開発が喫緊の課題である。オルガノイドは「ミニ臓器」とも呼ばれ、生体内と同様の条件で長期間増殖可能であることから疾患モデルとして近年注目を集めている。しかし、胆膵がんにおいて手術適応は早期の症例に限られるため、全体の半数以上を占める手術不能例からのオルガノイド樹立は不可能だった。一方、我々は進行胆膵がんに伴う胆管閉塞に対する内視鏡処置の際に得られる胆汁の残余検体からオルガノイド培養が可能であることを予備検討で見出していた。そこで、検体処理・培養法の最適化と得られたオルガノイドの多面的評価とを並行して進めることにより、癌細胞純度の高い胆膵がん由来オルガノイドを安定的に樹立する方法の確立が可能か検討した。

研究成果

1) がん患者胆汁検体の採取および3次元培養：進行胆膵がん患者の胆管閉塞に対する内視鏡治療時に得られる胆汁検体を採取し、我々が開発したマトリゲル二層法 (Maru et al, *Cancer Sci.* 110:858-866, 2019) に従いオルガノイド培養を行った。培養メディウムは婦人科腫瘍の手術検体からオルガノイド培養に用いたものと同様の組成とした (Maru et al, *Gynecol. Oncology.* 154: 189-198, 2019)。初期検討の結果、検体回収後 15 分以内に培養のための検体処理を開始することを徹底することとした。胆管閉塞時には細菌性胆管炎の合併が頻発するが、冷 PBS を用いて強めの洗浄を繰り返すことでほとんどの場合問題なく培養できること確認した。ただし、重度感染のために胆汁中上皮細胞が完全に死滅していることが見鏡で確認された場合には不適症例として研究から除外した。同一患者から得られた胆管がん切除検体の培養や複数回採取した胆汁検体からの培養についても、複数症例において成功するなど種々の比較解析が可能であることも確認した。培養成功の定義を1ヶ月以上の維持かつ2回以上の継代とした場合、成功率は90%に達した。成功例は累計で膵がん59例、胆道がん51例、結石18例、その他(転移等)18例で合計146症例となった。

2) 胆汁由来オルガノイドの病理組織学的解析：得られたオルガノイド中のがん細胞含有率や原発巣との類似性について、病理学的な観点から評価を行った。顕微鏡下では癌患者胆汁由来オルガノイドは充実性、出芽を伴う厚い嚢胞、小さい嚢胞の融合など、がん特有の形状を呈するものも見られたが、薄い嚢胞状のものが多数を占め、結石患者胆汁由来オルガノイドの典型例と明確に区別することは困難だった。H&E 染色では癌切除組織に特有とされる篩状構造や充実性の所見が癌患者胆汁由来オルガノイドに特異的に認められるのに対し、結石患者由来オルガノイドはすべて嚢胞状だった。がんおよび正常のオルガノイドの特徴を強く示す検体をそれぞれ陽性対照として病理医2名が評価し直したところ、明確にがんの特徴を有するオルガノイドのみで占められる症例は1/4から1/3に過ぎず、逆に正常と区別がつかない症例やがんと正常の混合または中間の形状を示すと考えられるオルガノイドが大多数を占めた。これらの結果からは、当初の培養条件下では形態のみでもがんと推定可能なオルガノイドは存在するものあくまで少数例と考えられた。確かに胆管内には正常胆管上皮が常に存在し、また膵がんは壁外性に胆管を圧排するものの胆管内に浸潤していない症例もありうるため、正常細胞が優位となる症例も当然想定された。そこで、オルガノイド中の癌細胞陽性率を digital droplet PCR を用いて推定した。KRAS 遺伝子変異頻度は膵がんで90%、胆道がんで30%程度とされる。オルガノイド中の KRAS 変異細胞の有無を調べたところ、胆道がんでは予想通り 1/3 程度の症例で検出されたのに対し、膵がんでは 1/4 程度の症例と有意に低率だった。胆汁細胞診でも同様の傾向が見られ、オルガノイド中に癌細胞が存在する症例は胆道がんと比較して膵がんで有意に低いことが示唆された。

3) 胆汁由来オルガノイドからのゼノグラフト作成：ヌードマウス皮下に接種した時に皮下腫瘍が誘導されれば、元のオルガノイド中に癌細胞が存在したことが間接的に証明される。そこで、過去の報告では胆膵腫瘍手術検体組織片を用いた成功率は30-40%と低かったが、胆汁由来オルガノイドからの系統的な皮下腫瘍作成を試みた。オルガノイドが得られていた膵がん28例、胆道がん34例、結石3例の連続症例に対して、培養開始後約4週間でヌードマウス皮下への移植を行った。3-5ヶ月間の観察期間の間にはがん患者由来オルガノイドからはそれぞれ54%および58%の症例で皮下腫瘍が形成され、オルガノイド中に癌細胞を含む症例が十分多いことが示唆された。充実性のものと嚢胞主体のものが約半数ずつだったが、我々はマウス肝臓・胆のうオルガノイドを用いた発がんモデルにおいて、腫瘍原性が弱い際に嚢胞性皮下腫瘍の形成を認めることを報告しており(Ochiai et al, *Carcinogenesis*. 40;1142-1152. 2019)、またヒト良性腫瘍は皮下腫瘍を形成しないことも考慮して嚢胞性病変も腫瘍として認定した。なお、膵がんおよび胆道がんの両方において、腫瘍形成能とオルガノイド中 KRAS 変異の有無や細胞診の所見は有意な相関を認めなかった。癌細胞の存在が確定的とは言えない細胞診 class3a 以下の胆汁検体由来のオルガノイドからも PDX 形成例があることから、オルガノイド培養は細胞診で課題とされる低い検出感度を補完する意義を有することが示唆された。進行がん患者胆汁由来オルガノイドのヌードマウス皮下移植により得られた腫瘍(Organoid-derived Xenograft, ODX)に対しては35例全例について病理学的解析を行ったところ、切除可能症例においては ODX と切除病変はミクロおよびマクロの所見において組織学的に類似性が高いことを確認した。一部の症例に関しては ODX から再びオルガノイド培養を行った上で ODX 作成を行った。いずれの場合も、初回と類似もしくはやや進行した組織像を呈した。初回は嚢胞主体の病変でも再培養を経て移植後に形成された皮下腫瘍が充実性に変化している症例も見られ、嚢胞性病変でも腫瘍と判定することの正当性が確認された。また、充実性の病変に関しては、2回目の ODX 作成においても腫瘍原性は基本的に維持されていた。

4) 胆汁中胆膵腫瘍細胞の3次元培養条件最適化：膵がん症例において胆汁由来オルガノイド中 KRAS 変異陽性症例の率が低かったことから、胆管内腔への浸潤を伴わない症例が多い可能性以外にも、KRAS 変異細胞が培養中に排除される可能性を想定した。我々は同様の現象をマウス膵臓オルガノイド発がんモデルにおいて以前観察しており、ヌードマウス皮下へのオルガノイド移植または培養中の EGF 除去により Kras 変異陽性

細胞の濃縮が可能なことや p53 欠失を伴う場合には Kras 変異細胞に正の選択圧が強くなることなども見出ししていた (Matsuura et al, *Carcinogenesis*, in press)。そこで、KRAS 変異が陽性胆汁検体症例について培養後オルガノイドでも追跡したところ、p53 野生型の症例では陰性に変化していたが、p53 変異症例では逆に濃縮し PDX では変異アレル頻度が 50%となっていた。KRAS 変異は通常ヘテロであるためこの症例では 100%癌細胞で構成されていると考えられた。KRAS 変異細胞を濃縮するために EGF 除去で培養を開始したが、オルガノイドの増殖が全般的に低下したため癌細胞の選択的培養に至らなかった。膵がんオルガノイド培養においては手術検体を用いた場合でも正常細胞が優勢になってしまうことが現在問題となっており、本課題でもその解決に向けた検討が必要と考えられた。

5) 胆汁由来オルガノイド薬剤感受性試験：胆汁由来オルガノイドのうち、PDX 形成を経ない段階でも形態学的に明らかな癌細胞のみで構成される胆道・膵臓がん 4 症例ずつに関して、実際の治療効果と in vitro での薬剤感受性を比較した。胆道がんの場合、化学療法が有効だった症例では事前に樹立していたオルガノイドは概ね薬剤感受性が良好だった。一方、膵がんでは化学療法有効症例でもオルガノイドでは Gem+PTX に対する感受性を認めず、S-1 に対する耐性のみオルガノイド再現されていた、また、Gem がある程度奏功した症例では薬剤感受性がオルガノイドで再現されていた。全体として化学療法の効果に関してオルガノイドでの効果と大きな乖離はないと考えられ現在症例の上積みを行っている。胆道がんでは現在分子標的薬の適応はないが HER2 抗体の臨床試験が進行中である。HER2 陽性率は胆道がんの約 2 割とされるが試験に参加するには生検での HER2 陽性確認が必須である。一方、腫瘍形成性ではない症例では生検は技術的に難易度が高く、侵襲も伴うため 2 割の陽性率では患者が前向きに参加するコンパニオン診断ではなかった。そこで胆汁由来オルガノイドの免疫染色を行ったところ、20 例中 4 例で HER2 陽性となり、非侵襲的な分子標的薬コンパニオン診断の材料としての有用性が示唆された。

今後の課題と方向性

本研究課題においては、KRAS・TP53 二重変異陽性例など 1-2 割の症例では通常の培養条件でも形態学的に明らかな異型を示す癌細胞のみを選択的に増幅可能なことを確認した。また、正常とがんが混在しているオルガノイドや、細胞診で Class2-3a 程度のがんの存在が必ずしも明らかでない胆汁由来のオルガノイドでも、約半数ではゼノグラフト形成を認めオルガノイド中の癌細胞の存在が事後的に示された。さらに、ODX の再培養により純粋な癌細胞のオルガノイドが濃縮可能なことを確認した。進行癌患者の胆汁から培養条件の工夫のみで純度の高い癌オルガノイドを樹立する手法の確立には今後も最適化が必要だが、現状でも上記の二つの手法を組み合わせることで多くの進行がんオルガノイドの樹立が可能となっており、創薬に資する前臨床モデルの有用なリソースとなりうる。実際に我々は新規治療法の適応拡大を目指す企業との共同研究を開始している。精密医療の観点では、治療前の薬剤効果判定による治療法選択への応用を視野に当初検討を予定していたが、純粋な癌細胞のみから構成されるオルガノイドの症例数が現状では限定的なことから、この課題の追求はいったん棚上げとした。一方で、非腫瘍形成性病変をとまなうことが多い肝臓外胆管癌症例では生検が困難なことからゲノム医療の枠組みに参入が困難なことが現在問題となっている。残余胆汁由来オルガノイドは非侵襲的に得られることから、そうした症例においてもゲノム解析材料としての利用や、標準治療後の分子標的薬コンパニオン診断での活用などに有用な可能性がある。

Background Cancer of the biliary tract and pancreas has the poorest prognosis, and the development of innovative therapies is an urgent issue. Organoids, also called "mini-organs," have recently attracted much attention as a disease model because they can grow in culture for a long period of time under the same conditions as in vivo. However, the indication for surgery is limited to the cases in the early stage, making it impossible to establish organoids from inoperable cases, which account for more than half of the total cases. On the other hand, we have found that organoid culture can be performed from bile residue samples obtained during endoscopic procedures to relieve bile duct stenosis associated with advanced cancers. Therefore, we here investigated whether it is possible to establish a method to stably propagate organoids from bile with high cancer cell purity.

Results

1) Collection of bile samples from cancer patients for 3D culture. Bile samples obtained during endoscopic treatment for bile duct obstruction in patients with advanced cancers were collected and organoid cultures were performed according to our Matrigel bilayer method. The culture mediums were similar in composition to those used for organoid cultures from surgical specimens of gynecological tumors. We ensured that specimen processing for culture should be started within 15 minutes after specimen collection. Although bacterial cholangitis frequently occurs in the case of bile duct obstruction, it can be cultured without any problem in most cases by repeated strong washing with cold PBS. If the definition of culture success is set at culture for more than one month and two or more passages, the success rate reached 90%. The total number of successful cases was 146, including 59 cases of pancreatic cancer, 51 cases of biliary tract cancer, 18 cases of stones, and 18 cases of other diseases.

2) Histopathological analysis of bile-derived organoids. Under the microscope, some cancer patient bile-derived organoids showed cancer-specific shapes such as fullness, thick cysts with budding, and fusion of small cysts, but the thin cystic form was dominant and difficult to distinguish from the typical case of the stone patient bile-derived organoids. H&E staining showed that only one-quarter to one-third of the cases were composed of organoids with distinctly cancerous features. The cancer cell-positive rate in organoids was estimated using digital droplet PCR (ddPCR). Whereas the KRAS gene mutation frequency is generally postulated to be about 90% in pancreatic cancer and 30% in biliary tract cancer, respectively, organoids contained KRAS-mutant cells in about one-third of the cases of biliary cancer as expected, while only in one-quarter of the cases of pancreatic cancer.

3) Xenograft formation from bile-derived organoids. To gain insights into to what extent organoids contain cancer cells, we systematically generated organoid-derived xenograft (ODX) in nude mice. After the 3-5 month observation period, ODX was formed in about 50% tested, suggesting that the organoids contain a sufficient number of cancer cells. In both pancreatic and biliary cancers, there was no significant correlation between the presence of KRAS mutations in organoids and cytology findings in patients with ODX. The fact that ODX was formed even from organoids derived from bile specimens of cytology class 3a or lower, which is not definitive for the presence of cancer cells, suggests that organoid culture may complement the low detection sensitivity in cytology. Pathological analysis of all 35 cases of tumors obtained by subcutaneous transplantation of ODX confirmed the high histological similarity between ODX and resected lesions for resectable cases.

4) Optimization of 3-dimensional culture conditions for cholangiopancreatic tumor cells in bile

Given the low rate of KRAS mutation positivity in bile-derived organoids in pancreatic cancer cases, we hypothesized that KRAS mutant cells could be eliminated in culture. We had previously observed a similar phenomenon in a mouse

pancreatic organoid carcinogenesis model, finding that transplantation into nude mice or EGF removal during organoid culture can enrich Kras mutation-positive cells and that positive selection pressure is strongly exerted on Kras mutant cells when accompanied by a p53 deletion. Thus, the KRAS mutation-positive bile specimens were followed up in organoids. While KRAS-mutant cells turned negative in the p53 wild-type cases, they remained positive and enriched in the p53 mutant cases. This notion is largely consistent with the concern currently shared by the research community of pancreatic cancer organoid culture, and thereby to be addressed in the future.

5) Bile-derived organoid drug sensitivity test. For 4 cases, we compared between the drug responses in patients and corresponding organoids, which consist only of morphologically evident cancer cells without ODX formation. For biliary tract cancer, organoids were generally drug-sensitive in cases where chemotherapy was effective. On the other hand, in pancreatic cancer, the organoid did not show any sensitivity to Gem+PTX even in chemotherapy-responsive cases, and only resistance to S-1 was reproduced by the organoid. Overall, the effect of chemotherapy was not significantly different from the effect of organoids, and we are currently adding cases. A clinical trial of HER2 antibody is now underway in biliary tract cancer, which has a HER2-positive rate of about 20%. As biopsy is technically challenging and invasive in non-massive cases, it is not a companion diagnosis in which the patient would willingly participate. We performed immunostaining for bile-derived organoids and found HER2 positivity in 4 out of 20 cases, suggesting its usefulness as a material for non-invasive molecularly targeted drug companion diagnosis.

Future Directions

In this study, we confirmed that about half of the organoids showed xenograft formation in immunodeficient mice, although they were not necessarily pure population of cancer cells in terms of morphology and cytology. With an exception of KRAS/TP53 double mutation cases, cancer cells tended to be negatively selected during the culture. The establishment of a method to establish highly pure cancer organoids from the bile of patients with advanced cancer only by devising the culture conditions is still in need of optimization. However, once xenograft is formed, pure cancer cell organoids can be enriched. In fact, we are beginning to collaborate with companies to expand the indications for new therapies with these ODX. Another way of application is organoid-based precision medicine. Because bile-derived organoids can be obtained non-invasively, they may be useful as genomic analysis materials and for companion diagnostics for molecular targeted therapy, both of which could have been impossible without organoids.