

患者由来膵管腺がんオルガノイドにおける
細胞内シグナル活性の定量的ライブイメージングと
シグナル伝達経路を標的とした阻害剤の薬効評価

塚本 祥子

目次

要旨	5
略語一覧	6
序論	7
1. 膵管腺がん	7
2. オルガノイド研究	7
3. がんの不均一性	8
4. がんの不均一性と薬剤応答を理解するための実験手法	9
5. シグナル伝達を可視化するための FRET バイオセンサー	10
6. ERK シグナル伝達経路を標的とした治療戦略	11
7. AMPK-オートファジーシグナル伝達経路を標的とした治療戦略	12
方法	13
細胞・試薬	13
ヒト膵がんオルガノイドの培養	13
ヒト膵がんオルガノイドの凍結と融解	14
バイオセンサー発現オルガノイドの樹立	14
位相差顕微鏡を用いたオルガノイド撮影	15
インキュベーター型二光子励起顕微鏡を用いた蛍光ライブイメージング	15
共焦点顕微鏡を用いた蛍光ライブイメージング	16
Booster-AMPK の作製	17
Booster-AMPK の観察	17
ゲル全体観察	18
ストレイナー実験	18
オルガノイドピックアップ	18
オルガノイドへの薬剤添加実験	18
死細胞染色	18
画像解析と定量的解析	19
統計解析	19
結果	20
1. 患者由来膵管腺がんオルガノイドのイメージング戦略	20
1-1. 患者由来膵管腺がんオルガノイドの培養	20
1-2. 二光子顕微鏡を用いたオルガノイド観察	21
1-3. FRET バイオセンサーのオルガノイドへの導入と観察	21
1-4. Booster-AMPK の開発と評価	23
1-5. ゲル全体観察の概要と解析手法	24

1-6. 空間的アーチファクトの評価	25
2. オルガノイドにおける空間的成長パターンの不均一性	27
2-1. 空間的成長パターンは患者間において不均一である	27
2-2. 大多数の細胞はオルガノイドを形成できない.....	29
2-3. PDAC のマトリゲル内での成長パターンを 4 つの指標で定量化した.....	29
2-4. オルガノイドは不均一に成長する	30
2-5. 「勝者」オルガノイドの細胞は継代後も大型オルガノイドを形成する	32
3. オルガノイドにおける ERK 活性の不均一性.....	34
3-1. 患者間、オルガノイド間、単一オルガノイド内の細胞間における ERK 活性の不 均一性を解析した.....	34
3-2. 10 個のオルガノイドにおける ERK 活性と ERK 活性の不均一性が定量化された	35
3-3. 大型オルガノイドは低い ERK 活性を示す	36
3-4. EGF 枯渇下では過半数のオルガノイドが増殖抑制を示すが ERK 活性は維持さ れる	38
4. オルガノイドにおける AMPK 活性の不均一性.....	40
4-1. AMPK 活性の患者間、オルガノイド間、単一オルガノイド内の細胞間における 不均一性を解析した.....	40
4-2. 大型オルガノイドは高い AMPK 活性を示す	42
4-3. ERK 活性と AMPK 活性は逆相関を示す.....	44
5. ERK シグナル伝達経路を標的とした薬剤治療.....	45
5-1. MEK 阻害剤の増殖抑制効果は患者によって異なる	45
5-2. MEK 阻害剤存在下において薬剤耐性細胞が生じる	48
5-3. MEK 阻害剤処理細胞は増殖能を保持している	50
6. オートファジー経路を標的とした薬剤治療.....	51
6-1. ヒドロキシクロロキンはすべての患者で増殖抑制効果を示す	51
6-2. ヒドロキシクロロキンは AMPK 活性を抑制する	54
6-3. ヒドロキシクロロキンは ERK 活性を上昇させる	56
7. ERK シグナル伝達経路とオートファジー経路の同時阻害.....	57
7-1. MEK 阻害剤とヒドロキシクロロキンの併用療法は 2 つのオルガノイド株で高い 細胞増殖抑制効果を示した	57
7-2. 併用療法は細胞死を誘導する	60
7-3. 併用療法において AMPK 活性の抑制効果が減弱する	62
考察.....	63
不均一性を理解するシングルセルイメージングの包括的解析.....	63
PDAC オルガノイドにおける ERK と AMPK の不均一性	63

PDAC における ERK シグナル伝達経路と AMPK-オートファジーシグナル伝達経路の併 用療法	64
ERK と AMPK のクロストークに基づいた併用療法の評価	64
謝辞	66
参考文献	67

要旨

膵管腺がん（Pancreatic Ductal Adenocarcinoma; PDAC）は、空間的および時間的な不均一性を示す難治性のがんである。この不均一性は薬剤治療の発展における大きな課題となっており、効果的な治療法の確立には、がん細胞集団の不均一性を包括的に理解することが求められている。がん細胞の挙動制御において中心的な役割を果たすシグナル伝達経路は広く研究されているものの、その活性の不均一性については十分な理解が得られていない。そこで本研究では、主要なシグナル伝達分子である ERK と AMPK に着目した。ERK は、Raf-Ras-MEK-ERK シグナル伝達経路において各分子の連続的なリン酸化により活性化され、AMPK は代謝のマスターレギュレーターとしてオートファジーなどの下流シグナルを制御する。近年、患者由来のがん細胞を培養したオルガノイドが *in vitro* で臨床のがん細胞を模倣する有用なモデルとして注目されており、不均一性の理解に重要な役割を果たすと期待されている。しかしながら、がん細胞集団の不均一性を時空間的に捉える手法として有用なライブイメージングは、低スループットという技術的な制約が存在している。

そこで本研究では、10 人の患者由来 PDAC オルガノイドを用いて包括的な広視野ライブイメージング手法を確立し、細胞内シグナル活性の不均一性の定量的解析を行った。その結果、空間的成長パターン、ERK 活性、AMPK 活性において、患者間・オルガノイド間・細胞間の多階層にわたる不均一性を見出した。特筆すべき点として、平均 ERK 活性と平均 AMPK 活性が負の相関を示し、オルガノイドサイズとシグナル活性の関係においても、両活性は対照的な挙動を示した。具体的には、ERK 依存性は細胞増殖の初期段階で上昇し、AMPK 依存性は後期段階で増加する傾向が確認された。この知見に基づき、ERK シグナル伝達経路とオートファジー経路を標的とした併用療法の有効性を検証した。MEK 阻害剤とオートファジー阻害剤（Hydroxychloroquine; HCQ）の単剤治療では薬剤耐性オルガノイドが出現した。併用療法では 2 つのオルガノイド株において優れた増殖抑制効果を示した。

以上のように本研究では、包括的なライブイメージングにより 10 人の患者由来 PDAC オルガノイド株における細胞内シグナル活性の多層的不均一性を包括的に解明し、その特性を考慮した治療戦略の有効性を実証した。この成果は、不均一性を考慮した分子標的薬治療の新たな展開につながることを期待される。

略語一覽

2-DG: 2-Deoxy-D-glucose

AMPK: AMP-activated protein kinase

ATP: Adenosine triphosphate

CFP: Cyan fluorescent protein

DMSO: Dimethyl sulfoxide

EGF: Epidermal growth factor

EGFR: Epidermal growth factor receptor

ERK: Extracellular signal-regulated kinase

FRET: Förster resonance energy transfer

HCQ: Hydroxychloroquine

mKate2: Monomeric Kate2

MEKi: MEK inhibitor

mKOk: Monomeric Kusabira-Orange kappa

OCBM: Organoid culture basal media

OCCM: Organoid culture complete medium

PDAC: Pancreatic Ductal Adenocarcinoma

PKA: Protein kinase A

SP: short pass

YFP: Yellow fluorescent protein

序論

1. 膵管腺がん

膵管腺がん (Pancreatic Ductal Adenocarcinoma; PDAC) は最も予後不良のがんの一つであり、先進国におけるがん関連死の第2位になると予測されている[1]。その5年生存率は12%と極めて低い[2]。現在のPDAC治療は、FOLFIRINOX療法やGemcitabine、Nab-paclitaxelなどのDNA複製を標的とした化学療法が第一選択となっている[3, 4]。分子標的薬の開発は依然として模索段階にあり、上皮成長因子受容体 (Epidermal growth factor receptor; EGFR) 阻害剤であるErlotinibは、アメリカ食品医薬品局から唯一承認されているものの、その治療効果は著しく限定的である。薬剤治療の進展を妨げる主な要因として、遺伝子改変動物モデルなどの基礎研究モデルと実際のPDAC患者における遺伝的背景や薬剤応答の不一致が報告されている[3, 5, 6]。このため、患者の臨床情報を忠実に反映する前臨床モデルでの薬剤応答検証が急務となっている。近年、患者由来のがん細胞を用いたオルガノイド培養技術が、*in vitro*において臨床のがん細胞を模倣する新たなモデルとして高く評価されている[7-10]。

2. オルガノイド研究

3次元培養オルガノイドを用いたがん研究が注目されている。「オルガノイド」は「臓器」(organ)と「～のようなもの」(-oid)を組み合わせた造語で、*in vitro*の3次元培養により形成される細胞塊を指す。その利用方法は主に2種類に大別される。1つ目は、*in vitro*で作製するミニチュア臓器モデル、2つ目は患者由来摘出標本から作製し、異常細胞の薬剤応答と特性を解析するモデルである。がん患者由来3次元オルガノイドは、臨床上的のがんの薬剤感受性や予後を高精度で予測できることが示されている[11-13]。さらに、オルガノイドにおける薬剤感受性と転移の評価が臨床結果と相関を示すことも明らかになっている[14]。こうした知見から、患者由来オルガノイドを活用した薬剤スクリーニングが活発に進められている[8, 12, 13, 15-18]。がん研究におけるモデルとして、患者腫瘍組織移植モデル (PDXモデル) が広く用いられている。PDXモデルおよび患者由来オルガノイドは、従来の二次元培養細胞株と比較して、患者腫瘍組織におけるドライバー遺伝子変異がより忠実に維持できることが報告されている[19]。しかしながら、PDXモデルは腫瘍のサブクローナルな不均一性を十分に反映できないことが明らかとなっており、個別化医療への応用には制限があることが指摘されている[20]。

現状のオルガノイド研究では、ATP検出による細胞生存率アッセイが広く採用され、細胞集団レベルで薬剤の有効性が評価されている[12, 21, 22]。しかし、この手法には重大な限界があり、個々のオルガノイドにおける薬剤応答の詳細な評価が困難であることが課題である。

3. がんの不均一性

がんの不均一性は、がん治療における最も重要な課題の一つである[23]。個々の腫瘍は、その発生過程と薬剤応答において、組織学、ゲノム、トランスクリプトームの各レベルで顕著な不均一性を示す[23]。特に PDAC 患者の微小環境では、腫瘍内不均一性が著しく動的に変化する[24]。PDAC における不均一性の具体例として、PDAC 細胞は遺伝子発現の差異に基づき「古典的」と「基底様」の 2 つのサブタイプに分類される。「古典的」サブタイプは E-cadherin や KRT19（ケラチン 19）などの上皮マーカーを発現している一方、「基底様」サブタイプは KRT5（ケラチン 5）などの基底細胞マーカーや、Vimentin や N-cadherin などの上皮-間葉転換関連遺伝子の発現が確認されている。「古典的」患者の 1 年生存率は 70%であるのに対し、「基底様」患者では 44%にとどまる[25]。腫瘍内には増殖能および遊走能が異なる多様なサブタイプが存在し、その構成は患者間で大きく異なる[26]。また、PDAC 細胞は複数の詳細なサブタイプに分類可能である[27-30]。

PDAC の微小環境では、トランスクリプトームプロファイルが空間的に不均一であることが明らかになっている[31]。例えば、腫瘍周辺部のがん細胞では、運動性関連遺伝子が活性化される一方で、腫瘍中心部ではストレスおよび代謝関連遺伝子が優位に発現する。さらに、単一細胞の RNA トランスクリプトームは時間的に変化し、PDAC の進行に伴い、がん進行関連遺伝子の発現が動的に変化することが示されている[32]。このように、がんの不均一性は空間的および時間的に変動する。

薬剤治療においては、不均一ながん細胞集団のすべてを制御することが求められる。しかし現行の PDAC 治療では、この不均一性に十分対応できておらず、治療抵抗性、再発、転移といった深刻な課題が存在する。薬剤投与時には、細胞死を誘導される細胞集団と、生存し得る細胞集団が共存し、さらに一部の細胞集団では薬剤耐性が誘導される（図 1）。このような背景から、がんの不均一性を包括的に理解することが求められており、患者由来オルガノイドを用いた実験モデルが重要な役割を果たすと期待されている [28]。例えば、患者由来オルガノイドを用いることで、がんの不均一性を観察したり不均一な薬剤応答を評価したりすることが可能となる。今後は、シングルセルレベルでの定量的アプローチと包括的評価手法の確立が不可欠である。

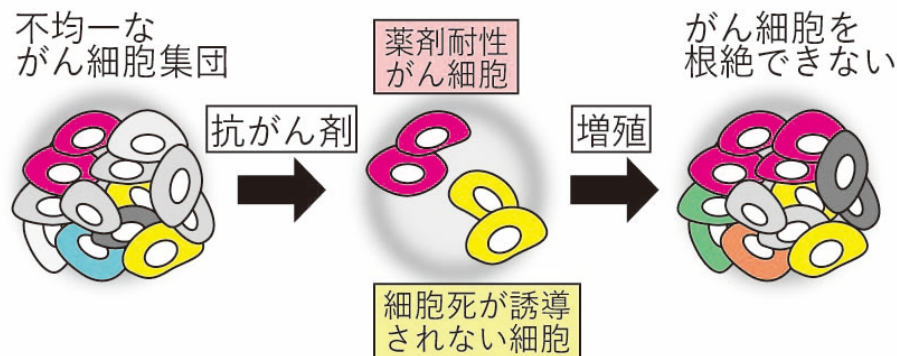


図 1. 治療の弊害となるがん細胞の不均一性

不均一ながん細胞集団に抗がん剤を投与すると、殺傷されるがん細胞（左図：灰色・青色）と殺傷されないがん細胞（中央図：赤色・黄色）が生じる。生き残ったがん細胞は増殖可能である。よって、抗がん剤投与時に生き残るがん細胞が存在すると、がん細胞を根絶できない。

4. がんの不均一性と薬剤応答を理解するための実験手法

シングルセル RNA-seq とライブイメージングは、がんの時空間的ダイナミクスをシングルセルレベルで解明するための二大アプローチとして注目されている。シングルセル RNA-seq はがん研究において広く活用され、ヒト PDAC の不均一な特性を明らかにしてきた[26, 32-34]。しかし、この手法は薬剤応答の経時的变化を追跡することが困難である。経時的变化を観察する手法としてライブイメージングが存在するものの、オルガノイドへの応用は依然として限定的である[35, 36]。現行のオルガノイドイメージング技術では、NAD(P)H や FAD の代謝イメージングが薬剤応答の検出に用いられているが[37, 38]、これらは細胞生存率アッセイと同様に、細胞の生存率のみを評価するシステムにとどまっている。

不均一ながん細胞集団における分子標的薬の効果を包括的に評価するためには、細胞数の変化だけでなく、標的とするシグナル分子の活性を同時に解析することが必要である。しかしながら、既存のオルガノイドにおけるシグナル活性のライブイメージング研究では、観察対象のオルガノイドの数が限られており、がん細胞の持つ不均一性を十分に捉えることができていない[36]。オルガノイドを選択して観察する手法では、個々のオルガノイド内部の不均一性は評価できるものの、オルガノイド間に存在する不均一性を包括的に評価することは困難である。さらに、観察対象の選択にバイアスが生じやすく、特徴的なオルガノイドが優先的に選ばれる傾向があるため、全体の不均一性や不均一な薬剤応答を客観的に評価することができない。

不均一な PDAC オルガノイドにおけるシグナル活性と薬剤応答を適切に評価するに

は、包括的かつ高精度なイメージングシステムの構築が喫緊の課題となっている。さらに、ライブイメージングの低いスループットは、がん細胞の不均一な特性を理解する上で大きな制約となっている。結果として、がん患者由来オルガノイドにおける分子動態、特に EGFR-Ras-ERK シグナル伝達経路などの主要な薬剤標的については、ほとんど解明されていないのが現状である。

5. シグナル伝達を可視化するための FRET バイオセンサー

細胞内シグナル分子の活性を可視化する手段として、フェルスター共鳴エネルギー移動 (Förster resonance energy transfer; FRET) の原理に基づくバイオセンサー (FRET バイオセンサー) が報告されている。FRET は、励起されたドナー分子から近接するアクセプター分子へのエネルギー移動現象を指す[39]。FRET バイオセンサーは、ドナー分子とアクセプター分子に蛍光タンパク質を用いており、アクセプターよりも励起・蛍光波長の短い蛍光タンパク質がドナーとして用いられる。従来の FRET バイオセンサーは、ドナーに青緑色蛍光タンパク質 (Cyan fluorescent protein; CFP)、アクセプターに黄色蛍光タンパク質 (Yellow fluorescent protein; YFP)を用いてきた。近年では、ダイナミックレンジの拡大[40]や、従来型 FRET バイオセンサーとの同時観察が可能な長波長 FRET バイオセンサー[41]など、さらなる技術革新が進んでいる。

FRET バイオセンサーは、細胞内シグナルの活性や濃度変化を可視化する極めて有力な手法として広く活用されている[42, 43]。FRET バイオセンサーには、分子間 FRET バイオセンサーと 1 分子型 FRET バイオセンサーの 2 種類が存在する。本研究で使用した 1 分子型 FRET バイオセンサーは、ドナーとアクセプターの蛍光タンパク質、センサー領域、リガンド領域、およびこれらを繋ぐリンカーで構成される。特定の細胞内シグナルが活性化 (リン酸化) すると、センサー領域がリン酸化される。リガンド領域はこのセンサードメインのリン酸化を特異的に認識し結合する。その結果、ドナーとアクセプターの蛍光タンパク質が近接し、FRET が生じる (図 2)。

FRET バイオセンサーを用いた細胞内シグナル活性の測定法には、2 つのアプローチがある。1 つ目は、ドナー蛍光タンパク質の蛍光寿命検出法である[44]。蛍光寿命とは、蛍光分子が励起状態から基底状態に戻るまでの時間を指す。蛍光タンパク質はそれぞれ固有の蛍光寿命を有す。しかし FRET が生じると、ドナー蛍光タンパク質の蛍光寿命が短縮する。この原理を利用して、FRET が生じた FRET バイオセンサーの割合を定量化する。蛍光分子濃度の影響を受けにくい利点があるが、特殊な測定装置を要する。測定方法 2 つ目は蛍光強度比計算法である[45]。ドナーとアクセプターの蛍光強度比を算出することで、細胞内シグナル活性を定量する。1 分子型 FRET バイオセンサーではドナーとアクセプターの分子数が等しいため、この簡便な方法が広く採用されている。本研究においても、蛍

光強度比によるシグナル伝達分子の活性検出を採用した。

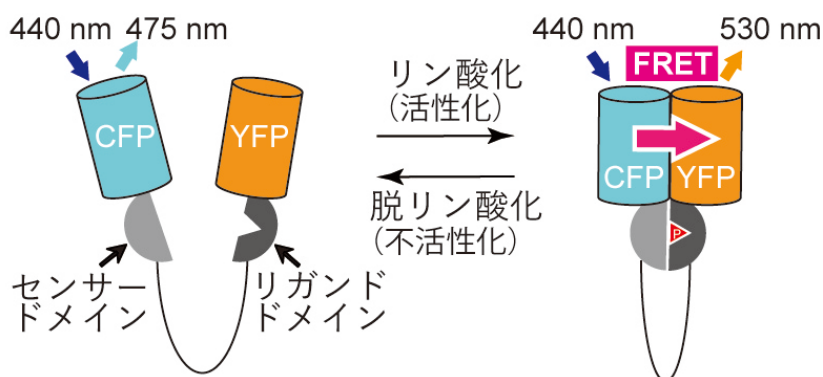


図 2. FRET バイオセンサーの仕組み

FRET バイオセンサーは、目的の細胞内シグナルの活性により構造が変化する。不活性化状態 (左) と活性化状態 (右) を示す。不活性化状態において、ドナー蛍光タンパク質 CFP とアクセプター蛍光タンパク質 YFP は近接していない。よって、CFP の励起波長 440 nm で FRET バイオセンサーを励起すると、CFP が 475 nm の蛍光を発す。目的の細胞内シグナルが活性化するとセンサードメインがリン酸化される。リガンドドメインと結合し、FRET バイオセンサーの構造が変化する。活性化状態では CFP と YFP が近接し、CFP から YFP への FRET が生じる。その結果、CFP の励起波長 440 nm で FRET バイオセンサーを励起すると、YFP が 530 nm の蛍光を発す。

6. ERK シグナル伝達経路を標的とした治療戦略

PDAC において KRAS 遺伝子変異が 90% 以上の高頻度で生じており [28]、EGFR-Ras-ERK 経路 (ERK: Extracellular signal-regulated kinase) は主要な薬剤標的となっている [46]。また PDAC において、EGFR は組織レベルで過剰発現していることが確認されている [47]。しかし、Gemcitabine と Erlotinib の併用療法に関する第 III 相試験では、Gemcitabine 単剤療法と比較して全生存期間が約 10 日間延長するにとどまり、その治療効果は限定的であった [48]。従来、RAS を治療標的とすることは困難とされてきたが、近年、特定の Ras 変異を対象とした分子標的薬の開発が進展している。例えば、MRTX1133 は KRAS G12D 阻害剤として [49]、ARS-853、ARS-1620、AMG510、MRTX849 は KRAS G12C 阻害剤として [50-52] 開発された。KRAS G12C 阻害剤は非小細胞肺癌で上市され、PDAC では臨床試験が開始されている。KRAS G12D 阻害剤は現在、第一相臨床試験が進行中である。

EGFR-Ras-ERK 経路を標的とする阻害剤は精力的に研究されてきたものの [48, 50, 53-61]、既に上市されている Trametinib を除き、多くが臨床試験で期待する成果を得られて

いない。SOS 阻害剤である BI1701963 は、KRAS と SOS1 の相互作用を阻害する新規薬剤として第 I 相臨床試験の段階にある [62]。一方、KRAS と RAF キナーゼの相互作用を阻害する分子標的薬は、いまだ同定されていない [63]。また、MEK 阻害剤の臨床試験結果は芳しくない。CI-1040 では完全奏効または部分奏効を示した患者はおらず、Selumetinib では無増悪生存期間に有意差が認められず、Pimasertib でもプラセボと比較して全生存期間の延長に至らなかった [56, 64, 65]。Trametinib は上市されているものの、患者の 31% に有害事象が報告されている [66]。さらに ERK 阻害剤は KRAS 変異腫瘍に対しての効果が限定的である [67]。現在、ERK シグナル伝達経路の阻害剤を用いた併用療法の可能性が積極的に探索されている。

7. AMPK-オートファジーシグナル伝達経路を標的とした治療戦略

近年、PDAC において AMPK-オートファジーシグナル伝達経路を標的とする治療が注目を集めている。PDAC 細胞の増殖はオートファジーに依存しており、特に KRAS 変異 PDAC ではオートファジーが活性化している [68]。興味深いことに、PDAC におけるオートファジーの活性化は、無病生存期間の短縮と相関していることが明らかになっている [69]。オートファジー阻害剤であるヒドロキシクロロキン (Hydroxychloroquine; HCQ) は、PDAC マウスモデルにおける腫瘍増殖を抑制することが示されているが [70]、臨床試験では、HCQ 単剤療法の奏効率は 2 ヶ月の無増悪生存率で 10% と極めて限定的である [71]。オートファジーは、AMP 活性化プロテインキナーゼ (AMPK: AMP-activated protein kinase) の活性化によって誘導される [72-74]。AMPK は、がんにおける代謝およびエネルギーストレスの緩和に重要な役割を果たしている [75]。PDAC の解糖系において AMPK が関与していることから [76]、近年その制御が積極的に試みられている。AMPK 活性化剤であるメトホルミンは、*in vitro* および *in vivo* の両モデルで腫瘍抑制効果を示している [77, 78]。しかし、臨床試験においては全生存期間の有意な延長には至っていない [79, 80]。対照的に、AMPK 阻害剤は PDAC 細胞株における細胞増殖と遊走を抑制することが示されている [81]。これらの知見から、AMPK-オートファジー経路と ERK シグナル伝達経路を標的とした薬物治療は、今後有望なアプローチとして期待されている。特に最近では、オートファジーと ERK シグナル伝達経路を標的とした併用療法の可能性が注目されている [82-85]。

方法

細胞・試薬

本研究で使用したヒト膵がんオルガノイドは、京都大学臨床研究審査委員会ならびに医の倫理委員会の承認を受け、京都大学で膵がんの摘出手術を受けた患者の臨床検体から樹立された。プロジェクト番号 G0738。

ヒト膵がんオルガノイドは、100% Matrigel GFR PhenolRF Mouse (Corning, NY, USA) に懸濁して播種し、DMEM/F12 no phenol red (Thermo Fisher Scientific, MA, USA)、10 mM HEPES (Thermo Fisher Scientific, MA, USA)、500 μ M Sodium Pyruvate (Thermo Fisher Scientific, MA, USA)、Penicillin-Streptomycin (Penicillin: 100 Unit/mL, Streptomycin: 100 μ g/mL) (ナカライテスク、京都、日本)、2 mM GlutaMax (Thermo Fisher Scientific, MA, USA)、100 ng/mL Wnt-3a (R&D Systems, MN, USA)、500 ng/mL R-spondin 1 (R&D Systems, MN, USA)、100 ng/mL Noggin (R&D Systems, MN, USA)、100 ng/mL FGF-10 (Pepro Tech, NJ, USA)、50 ng/mL EGF (Pepro Tech, NJ, USA)、10 nM Gastrin I human (Sigma-Aldrich, MO, USA)、500 nM A-83-01 (富士フイルム和光純薬株式会社、大阪、日本)、1x B-27™ Supplement (Thermo Fisher Scientific, MA, USA)、10 mM Nicotinamide (Sigma-Aldrich, MO, USA)、1 mM N-acetyl-L-cysteine (Sigma-Aldrich, MO, USA) から成るオルガノイド培養完全培地 (Organoid culture complete medium; OCCM) にて培養した。

Booster-AMPK の評価実験では、PKA バイオセンサーの活性剤として Forskolin (Alomone Labs, Jerusalem, Israel)、AMPK バイオセンサーの活性剤として 2-デオキシ-D-グルコース (2-Deoxy-D-glucose; 2-DG) (Sigma-Aldrich, MO, USA)を用いた (PKA: Protein kinase A)。

薬剤添加実験では、MEK 阻害剤 PD0325901 (富士フイルム和光純薬株式会社、大阪、日本)およびオートファジー阻害剤 HCQ (Selleck, HOU, USA)を使用した。

ヒト膵がんオルガノイドの培養

培養には、48 ウェル浮遊細胞用プレート (秋田住友ベーク株式会社、秋田、日本)を使用した。継代前に温度制御用アルミプレート (イナ・オブティカ、大阪、日本)の上にプレートを置き、CO₂ インキュベーター内で温めた。継代時には、オルガノイドの付着を抑制する ART チップ (Thermo Fisher Scientific, MA, USA)を使用した。氷を準備し、上にクーリングチューブラック (アズワン、大阪、日本)を設置した。恒温槽は 37°C に設定し、遠心機は 4°C で予冷した。OCCM をアスピレーターで吸った後、1 ウェルあたり PBS 500

μL でゲルを洗浄した。オルガノイドの継代において、一般的にシングルセル処理よりも細胞塊の状態が成長に有利であるため、トリプシンよりも穏やかな代替試薬である CTS TrypLE Select Enzyme (Thermo Fisher Scientific, MA, USA) を 300 μL 加え、オルガノイドを含むマトリゲルをピペティングにて物理的に破碎した。マトリゲル-オルガノイド-TrypLE の混合液をステムフル 15 mL 遠沈管 (秋田住友ベーク株式会社、秋田、日本) に回収し、37°C 恒温槽で 5 分間反応させた。10 回のタッピングによりオルガノイドを破碎した。15 mL チューブに PBS 10 ml を加え、TrypLE を失活させた。4°C、1500 rpm、5 分間の遠心後、上清を吸引した。PBS 500 μL を加えて細胞を懸濁し、プロテオセーブ SS 1.5 mL チューブ (秋田住友ベーク株式会社、秋田、日本) に回収した。再度 15 mL チューブに PBS 500 μL を加え、1.5 mL チューブに回収した。4°C、1500 rpm、5 分間の遠心後、上清を吸引した。マトリゲルと懸濁する際、マトリゲルの急速な凝固を防ぐため、1.5 mL チューブは氷上のクーリングチューブラックに置いた。マトリゲルのチューブも氷上のクーリングチューブラックに置いた。細胞の播種には、予め 4°C で冷やした ART チップを使用した。マトリゲルを ART チップで取り、細胞と懸濁させ、48 ウェルプレートに 25 μL/ウェルで播種した。10 分~20 分間プレートを CO₂ インキュベーターに入れ、マトリゲルを固化させた。その後、OCCM を 250 μL/ウェルで加え、37°C、5% CO₂ 下で培養した。培地交換は 3 日に 1 回、継代は 7 日に 1 回を目安とした。

ヒト膀胱がんオルガノイドの凍結と融解

オルガノイドの凍結は、プロテオセーブ SS 1.5 mL チューブにオルガノイドを回収する手順まで継代と同じ方法で行った。その後、Cell Reservoir One (ナカライテスク、京都、日本) を凍結するウェル 1 ウェルにつき 250 μL で懸濁し、クライオチューブに 250 μL ずつ分注した。まず -80°C で一晩凍結させ、その後に液体窒素タンクに移動させた。オルガノイドの融解は、プロテオセーブ SS 1.5 mL チューブに PBS 500 μL を入れることから開始した。37°C 恒温槽で融解したオルガノイド懸濁液と 1.5 mL チューブ内の PBS を懸濁した。4°C、1500 rpm、5 分間の遠心後、上清を吸引した。PBS 500 μL を入れ、再度遠心を行った。上清を吸引した後、継代と同様の手順で 48 ウェルプレートに播種した。融解時の培地は、5 μM Y27632 (Selleck, HOU, USA) 含有 OCCM を入れ、3 日後の培地交換から通常の OCCM に切り替えた。

バイオセンサー発現オルガノイドの樹立

ERK バイオセンサー EKAREN5[36] を改変し、mTurquoise2 を mTurquoise-GL [86] に、YPet をコドン変異体にそれぞれ置換した新規 ERK バイオセンサー、EKAREN5-gl-NLS を使用した。この改良により、ドナーおよびアクセプター蛍光タンパク質の DNA 配列の相同性を低減し、レンチウイルスベクターによる遺伝子導入時の相同組み換えに起因する蛍光消失のリスクを抑えることを目的とした。本研究で使用した AMPK バイオセン

サーは所属研究室（生体制御学分野、博士2年まで在籍）で作製されたものであり既に報告されている[87]。

オルガノイドへのバイオセンサーの導入には、レンチウイルスベクターを用いた。まず、レンチウイルス作製のため、70~90%コンフルエントの Lenti-X 293T 細胞を用意した。各 pCSII プラスミドを Opti-MEM (Thermo Fisher Scientific, MA, USA)、PEI_{max} (Polyscience, PA, USA)、pCMV-VSV-G-RSV-Rev (RIKEN、神戸、日本)、psPAX2 (Addgene, NY, USA)を使用して細胞にトランスフェクションした。CO₂ インキュベーター内で2日間培養した後 40 μm フィルター（クラボウ、大阪、日本）とシリンジ（テルモ、京都、日本）を用いてウイルスを回収した。ウイルスを濃縮するために、4x PEG 溶液（PEG6000 から研究室にて作製）をウイルスに添加し、チューブを転倒混和した。4℃で一晩保存した後、室温、2600 g、30 分間で遠心した。上清を除去し、再度遠心（室温、2600 g、5 分間）を行った。上清を除去した後、ペレットを Opti-MEM で懸濁した。作製した高濃度ウイルスは、使用まで-80℃の冷凍庫で保存した。

オルガノイドへの感染は、スピノフェクション法で行った。オルガノイドは継代と同様の手順で、TrypLE 処理、失活化、遠心を行った。上清を吸引後、10 μM Y27632 と 1x polybrene（ナカライテスク、京都、日本）を含む OCCM に懸濁し、96 ウェル浮遊細胞用プレート（秋田住友ベーク株式会社、秋田、日本）の中央付近のウェルに入れた。このウェルにウイルスを 1:1 の割合で添加し、懸濁した。プレートを室温、600 g、60 分間で遠心した。その後 CO₂ インキュベーターで6時間培養した。細胞をプロテオセーブ SS 1.5 mL チューブに回収して遠心し、マトリゲルと懸濁し播種した。マトリゲルを固化させた後に OCCM を添加して培養した。感染から2日後、UPlanFL N 4x/0.13 PhL レンズ（オリンパス、東京、日本）と CPlanN 10x/0.25 RC1（オリンパス、東京、日本）を搭載した蛍光顕微鏡 CKX41（オリンパス、東京、日本）を用いて蛍光を観察した。

位相差顕微鏡を用いたオルガノイド撮影

継代後のオルガノイドの観察には、位相差顕微鏡 Axiovert25（Carl Zeiss, Oberkochen, German）を使用した。対物レンズは 10x×/0.25 NA dry objective lens（Carl Zeiss, Oberkochen, German）、20x×/0.30 NA dry objective lens（Carl Zeiss, Oberkochen, German）を使用した。画像の取得には、デジタル一眼レフカメラ D5100（Nikon, 東京、日本）を使用した。

インキュベーター型二光子励起顕微鏡を用いた蛍光ライブイメージング

オルガノイドとマトリゲルの懸濁液を 10 μL/ウェル、OCCM を 200 μL/ウェルでガラスボトム 96 ウェルプレート EZVIEW Culture Plate LB（AGC テクノグラス株式会社、静

岡、日本)に播種し、観察した。蛍光ライブイメージングには、顕微鏡ソフトウェア Fluoview FV10-ASW (オリンパス、東京、日本)および水補給ソフト Water Supply (オリンパス、東京、日本)を搭載したインキュベーター型二光子顕微鏡 LCV110-MP (オリンパス、東京、日本)を用いた。レーザーは InSight DeepSee (Spectra Physics、東京、日本)が搭載されていた。

対物レンズは 25x/1.05 NA water objective lens (XLPLN25XWMP2; オリンパス、東京、日本)を使用した。透過像に加えて、以下の蛍光フィルターセットを用いて蛍光画像を取得した。CFP は IR Cut Filter 32BA750RIF (AW3361)、ダイクロイックミラー SDM505、RDM445XL、Emission filter 32BA460-500 を用いた。YFP は IR Cut Filter 32BA750RIF (AW3361)、ダイクロイックミラー SDM505、SDM570、Emission filter 32BA520-560 を用いた。水補給は、4 分間隔、給水時間 1 秒で行った。

スキャン速度は 1 ピクセルあたり 4 μ s で統一した。検出器は RXD1、RXD2、GaAsP1、GaAsP2 の 4 種類あり、RXD1 と RXD2 に対して GaAsP1 と GaAsP2 は高感度である。そのため、撮影には GaAsP1 (CFP)と GaAsP2 (FRET)を用いた。検出器の電圧はバイオセンサーごとに決定し、すべての実験を通して固定した。ERK バイオセンサー発現オルガノイドの観察では、GaAsP1 は Gain 0、Offset 0、Voltage 615 V、GaAsP2 は Gain 0、Offset 0、Voltage 550 V で撮影した。AMPK バイオセンサー発現オルガノイドの観察では、GaAsP1 は Gain 0、Offset 0、Voltage 515 V、GaAsP2 は Gain 0、Offset 0、Voltage 500 V で撮影した。励起波長は 840 nm を使用した。レーザーの出力はバイオセンサーの明るさに応じて調整した。Z スタック画像の間隔は 3 μ m とした。

共焦点顕微鏡を用いた蛍光ライブイメージング

オルガノイドとマトリゲルの懸濁液を 10 μ L/ウェル、OCCM を 200 μ L/ウェルでガラスボトム 96 ウェルプレートに播種し、観察した。蛍光ライブイメージングには、共焦点レーザー顕微鏡 TCS SP8 X FALCON (Leica Microsystems, Wetzlar, Germany)を用いた。画像取得は、顕微鏡ソフトウェア Leica Application Suite X (Leica Microsystems, Wetzlar, Germany)を用いて行われた。ステージトップインキュベーター (東海ヒット、静岡、日本)を用いて観察した。レーザーは 440 nm ps pulsed diode laser (PDL 800-D; PicoQuant, Berlin, Germany)、検出器は a Lecia HyD detector (Leica Microsystems, Wetzlar, Germany)、対物レンズは HC PL APO 20 $\times$ /0.75 NA CS2 (Leica Microsystems, Wetzlar, Germany)を用いた。CFP の検出波長は 459~487 nm、FRET の検出波長は 512~534 nm に設定した。観察前に、プレートとレンズを 30 分温めてから使用した。

Booster-AMPK の作製

橙色蛍光タンパク質 Monomeric Kusabira-Orange kappa (mKOk)と遠赤色蛍光タンパク質 Monomeric Kate2 (mKate2)を使用した AMPK の FRET バイオセンサーBooster-AMPK は、所属する研究室で開発された PKA バイオセンサーBooster-PKA の骨格を使用して作成した。まず、Booster-PKA のプラスミドに制限酵素処理を行い、PKA 基質ドメインを含まない DNA 断片をベクターとして用意した。続いて、PCR を用いて AMPK 基質特異的なフォワードプライマーとリバースプライマーのアニーリングを行い、目的のインサートの DNA 断片を得た。ベクターとインサートのライゲーションを行った後、トランスフォーメーションを行った。大腸菌からプラスミド DNA を精製した。制限酵素処理にて AMPK 基質の導入を確認したプラスミドを実験に使用した。

Booster-AMPK の観察

HeLa 細胞を 2×10^4 細胞/ウェルでガラスボトム 96 ウェルプレートに播種し、Opti-MEM (Thermo Fisher Scientific, MA, USA)および 293Fectin (Thermo Fisher Scientific, MA, USA)を用いて、Booster-AMPK のトランスフェクションを行った。Booster-AMPK の DNA は $0.5 \mu\text{g}$ /ウェルとした。トランスフェクションの 3 時間後に培地を DMEM 培地 (Thermo Fisher Scientific, MA, USA)に変更した。翌日、ステージトップインキュベーター (東海ヒット, 静岡, 日本)搭載の倒立顕微鏡 NikonTi2 (Nikon, 東京, 日本)を使用し観察した。CFP と YFP から成る AMPK バイオセンサーの励起には、励起フィルター426~446 nm、ダイクロックミラー455SP (short pass; SP)を用いた。CFP は 460~500 nm、FRET は 510~560 nm の蛍光フィルターで検出した。mKOk と mKate2 から成る Booster-PKA と Booster-AMPK の観察には、励起フィルター460~500 nm、ダイクロックミラー 510SP を用いた。mKOk は 575~615 nm、mKate2 は 633 nm 以上を通す蛍光フィルターで検出した。対物レンズは 20x/0.7 NA S PlanFluor LWD ADM Ph2 (Nikon, 東京, 日本)を用いた。

バイオセンサーの機能を評価するため、それぞれ異なる活性化剤で刺激を行った。PKA バイオセンサーは Forskolin $50 \mu\text{M}$ 、AMPK バイオセンサーは 2-DG 10 mM で刺激した (2-DG: 2-Deoxy-D-glucose)。活性化剤含有培地は、アルミブロック恒温槽 DTU-1B (TAITEC, 東京, 日本)にて 37°C に温めてから細胞に添加した。解析は無償配布されている画像解析ソフト ImageJ を用いて行い、各実験条件において 7~13 細胞の細胞質の蛍光強度を測定した。FRET のドナーとアクセプターの蛍光強度比 (FRET 比) を算出し、刺激剤添加前後で比較した。撮影開始時の FRET 比を 1 として、各タイムポイントの FRET 比を算出した。活性化剤添加後 15 分における相対 FRET 比の平均を、各条件の FRET 比増加度とした。

ゲル全体観察

ガラスボトム 96 ウェルプレート EZVIEW Culture Plate LB に 1000 細胞を播種し、ERK バイオセンサー発現オルガノイドは 7 日目に、AMPK バイオセンサー発現オルガノイドは 13 日目に観察した。ゲル全体観察にはインキュベーター型二光子顕微鏡 LCV110-MP を用いた。画像取得は、3 μm ずつの Z スタックで 400~500 枚の撮影を行い、49 視野 (7 $\times$ 7 視野) または 64 視野 (8 $\times$ 8 視野)のタイリング画像を取得した。

ストレイナー実験

オルガノイドの継代の手順に従い、プロテオセーブ SS 1.5 mL チューブに細胞を回収した後、20 μm ストレイナー (フナコシ、東京、日本)を通す群と通さない群を用意した。ストレイナー処理後に細胞数を計測し、ガラスボトム 96 ウェルプレート EZVIEW Culture Plate LB に細胞を播種した。

オルガノイドピックアップ

3.5 cm プラスチックボトムディッシュ (Thermo Fisher Scientific, MA, USA)にオルガノイドを播種した。ピックアップ前に、プロテオセーブ SS 1.5 mL チューブに 500 μL の PBS を準備した。10x/0.25 NA dry objective lens を搭載した位相差顕微鏡 Axiovert25 で観察しながら、ピペットマンを用いてオルガノイドを回収した。チューブを 4°C、1300 rpm、5 分間で遠心した。上清を除去した後、TrypLE を添加し 37°Cの恒温槽で 5 分間、反応させた。PBS で洗浄して TrypLE を失活させた後、再度遠心した。上清を除去し、細胞をガラスボトム 96 ウェルプレート EZVIEW Culture Plate LB に播種して観察を実施した。

オルガノイドへの薬剤添加実験

既報を参考に、PD0325901 200 nM、HCQ 50 μM の OCCM を使用した (PD0325901[35]、HCQ [1, 88, 89])。PD0325901 の溶媒として Dimethyl sulfoxide (DMSO)、HCQ の溶媒としてミリ Q 水を使用した。コンビネーション実験では、それぞれ単剤療法と同様の濃度に設定し、PD0325901 200 nM、HCQ 50 μM となる OCCM を使用した。PD0325901 と HCQ の長期間添加実験にはインキュベーター型二光子顕微鏡 LCV110-MP を、コンビネーション実験には共焦点レーザー顕微鏡 TCS SP8 X FALCON を用いた。画像取得は 3 μm ずつの Z スタックで 63 枚撮影し、25 視野 (5 $\times$ 5 視野)のタイリング画像を取得した。

死細胞染色

死細胞染色には、SYTOX AAdvanced (Thermo Fisher Scientific, MA, USA)を使用した。SYTOX AAdvanced の最終濃度は 1 μM とし、観察の 45 分前に培地に添加した。死細

胞染色の観察には、共焦点レーザー顕微鏡 TCS SP8 X FALCON を使用した。波長可変レーザーである White Light Laser (Leica Microsystems, Wetzlar, Germany) を用いて 561 nm で励起し、570~627 nm で検出した。

画像解析と定量的解析

ERK バイオセンサーと AMPK バイオセンサーを発現する PDAC オルガノイドの 3D 画像解析には、Image J のプラグインである Trackmate [90]および Cellpose [91]を使用し、シングルセル情報を取得した。MATLAB ソフトウェア (Mathworks, MA, USA)を使用してクラスター解析を行い、ユークリッド距離が 20 μm 以内の細胞群を単一クラスターとして認識した。定量的解析では、10 個以上の細胞から構成されるクラスターをオルガノイドと定義した。オルガノイド形成効率は、10 個未満の細胞から成るクラスターを含むすべてのクラスター数に対するオルガノイド数の割合として算出した。細胞の空間マッピングも Matlab ソフトウェアによって実施された。

統計解析

2 群の平均値の比較には Excel ソフトウェアを用い、t 検定を実施した。エラーバーはすべて平均値 $\pm$ 標準誤差で示した。

結果

1. 患者由来膵臓がんオルガノイドのイメージング戦略

1-1. 患者由来膵臓がんオルガノイドの培養

本研究では、10 種類の異なる患者由来 PDAC オルガノイドを使用した。オルガノイドの培養には、マトリゲルを用いた 3 次元培養システムを採用した。マトリゲルは、細胞外基質が豊富な Engelbreth-Holm-Swarm マウス肉腫細胞から単離された再構成基底膜であり、3 次元培養において広く利用されている。がん細胞は正常細胞と比較して、シグナル伝達経路を恒常的に活性化させることで成長しやすくなっていることから、成長因子の含有量が少ないマトリゲルを選択した。マトリゲルの物理的特性を活用し、4°C で液体状態のマトリゲルを 37°C で 10~20 分間加温することで固化させた。具体的には、細胞とマトリゲルの懸濁液をウェルに分注し、固化後に周囲に培地を添加する培養方法を採用した(図 3A)。培地は、DMEM/F12 培地をベースとし、特定の成長因子を添加した OCCM を使用した。

培地の長期保存による成長因子等の分解を防ぐために、成長因子等を添加していないオルガノイド培養基礎培地(Organoid culture basal media; OCBM)を作成し、保管した。

OCBM は、DMEM/F12 no phenol red、緩衝材である HEPES、細胞のエネルギー源となる Sodium Pyruvate、抗菌剤である Penicillin-Streptomycin、L-グルタミンの細胞培養サプリメント GlutaMax から構成される。

OCCM は、さらに 10 種類の成長因子等を添加したものであり、調整後 2 週間以内に使用することとした。Wnt 経路を活性化する Wnt-3a と R-spondin 1、骨形成タンパク質 BMP4 を阻害する Noggin、Notch 経路を活性化する FGF-10、ERK 経路を活性化する EGF、膵臓腺房細胞を刺激する膵臓の成長因子 Gastrin I、TGF- β 経路を阻害する A-83-01、レチノイン酸を活性化する B-27™ Supplement、細胞死を抑制する Nicotinamide、酸化防止剤の N-acetyl-L-cysteine を OCBM 培地に添加し、OCCM を作製した。

本研究では、遺伝的背景の異なる 10 種類の患者由来オルガノイド株 KYK001、KYK002、KYK006、KYK011、KYK027、KYK036、KYK041、KYK054、KYK069、KYK077 を使用した(図 3B、図 3C)。既報と同様に、これらの PDAC オルガノイドは球状の三次元構造を形成した[92, 93]。

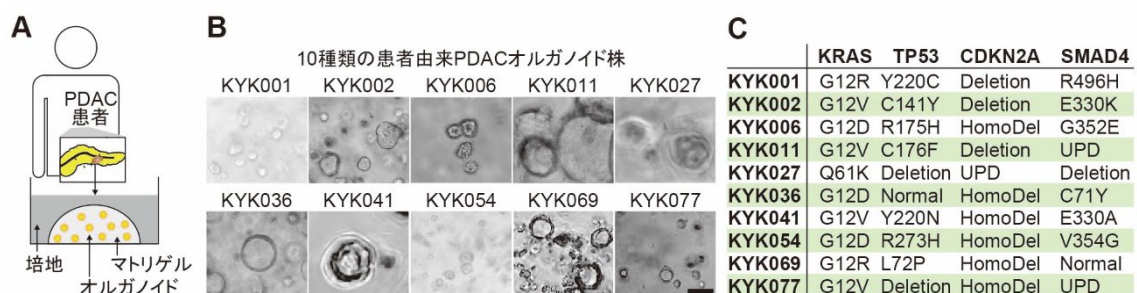


図 3. 患者由来 PDAC オルガノイド

- (A) 患者由来 PDAC オルガノイドの培養方法。
- (B) 10 種類の患者由来 PDAC オルガノイド株の明視野画像。スケールバー: 50 μm 。
- (C) 各オルガノイド株における、Big4 と呼ばれる膵がんの主なドライバー遺伝子についての遺伝情報。

1-2. 二光子顕微鏡を用いたオルガノイド観察

オルガノイド観察を実施するための顕微鏡を検討した。共焦点顕微鏡は比較的簡便な設備で観察可能であり、通常の蛍光顕微鏡と比較して高輝度かつ高感度な画像取得が可能である。しかし、細胞へのダメージが大きく蛍光の退色や光毒性のリスクが高い。対照的に、二光子顕微鏡は大規模な設備を要するものの、焦点面のみを選択的に励起し、長波長の蛍光レーザーを使用することで、細胞ダメージを最小限に抑え、蛍光の退色を遅延させることができる。さらに、二光子顕微鏡で使用される長波長の光は細胞や生体内を通過しやすいため、深部観察に適している。対物レンズの作動距離の違いを考慮しても、二光子顕微鏡の方が深部まで観察可能である（共焦点顕微鏡 20x dry レンズ: 作動距離 620 μm 、二光子顕微鏡 25x dry レンズ: 作動距離 1.8 mm）。これらの特性から、マトリゲル深部の観察には二光子顕微鏡がより適していると結論づけた。本研究で用いた二光子顕微鏡はインキュベーターを備えており（図 4）、従来のステージトップインキュベーターと比較して、より安定した細胞培養環境を提供できる。これにより、長時間にわたるライブセルイメージングが可能となった。

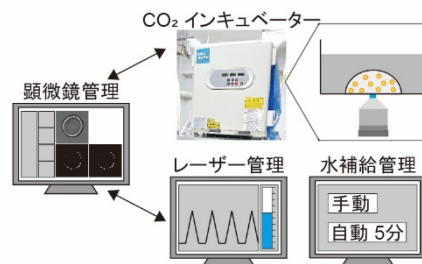


図 4. 二光子顕微鏡の管理システム

二光子顕微鏡の管理システムの説明。インキュベーターの中に倒立の水浸レンズがあり、水を補給することにより観察が可能となる。

1-3. FRET バイオセンサーのオルガノイドへの導入と観察

EGFR-Ras-ERK シグナル伝達経路などの主要な薬剤標的に関するがん患者由来オルガノイドにおける分子動態については、ほとんど解明されていない。そこで本研究では、ERK および AMPK の FRET バイオセンサーをオルガノイドに発現させ、シングルセルレ

ベルでのシグナル活性を観察した。ERK 活性の可視化には、核内局在型の FRET バイオセンサー EKAREN5[36]を改良した EKAREN5-gl-NLS を使用した (図 5A)。EKAREN5-gl-NLS は、相同組み換えをおこす 2 つの蛍光タンパク質配列間のホモロジーを減少させた改変型である。一方、AMPK 活性の観察には、細胞質型 FRET バイオセンサー AMPKAR-EV を使用した[87] (図 5B)。

遺伝子導入には、レンチウイルスベクターを採用した。従来、レトロウイルスを用いたオルガノイドへの遺伝子導入が報告されていたが、レトロウイルスは増殖期でない細胞への遺伝子導入が困難であった[94]。本研究では、この制限を克服するためにレンチウイルスベクターを選択し、遺伝子導入を行った。ウイルス感染効率は 80%から 90%と高い効率を示した。バイオセンサーの機能を確認するため、ERK の上流因子 MEK の阻害剤と、解糖系阻害剤 2-DG をそれぞれのバイオセンサー発現オルガノイドに添加した。2-DG は解糖系を阻害することにより、AMPK の活性化を誘導することが期待される。その結果、薬剤添加後の活性変化が観察され、両バイオセンサーの妥当性が確認された (図 5C、図 5D)。二光子顕微鏡観察の結果、オルガノイドの 3 次元構造が可視化された (図 5E)。さらに、ERK 活性と AMPK 活性のシングルセルレベルでの可視化に成功した。興味深いことに、これらの活性はオルガノイド内で不均一な分布を示した(図 5F、図 5G)。

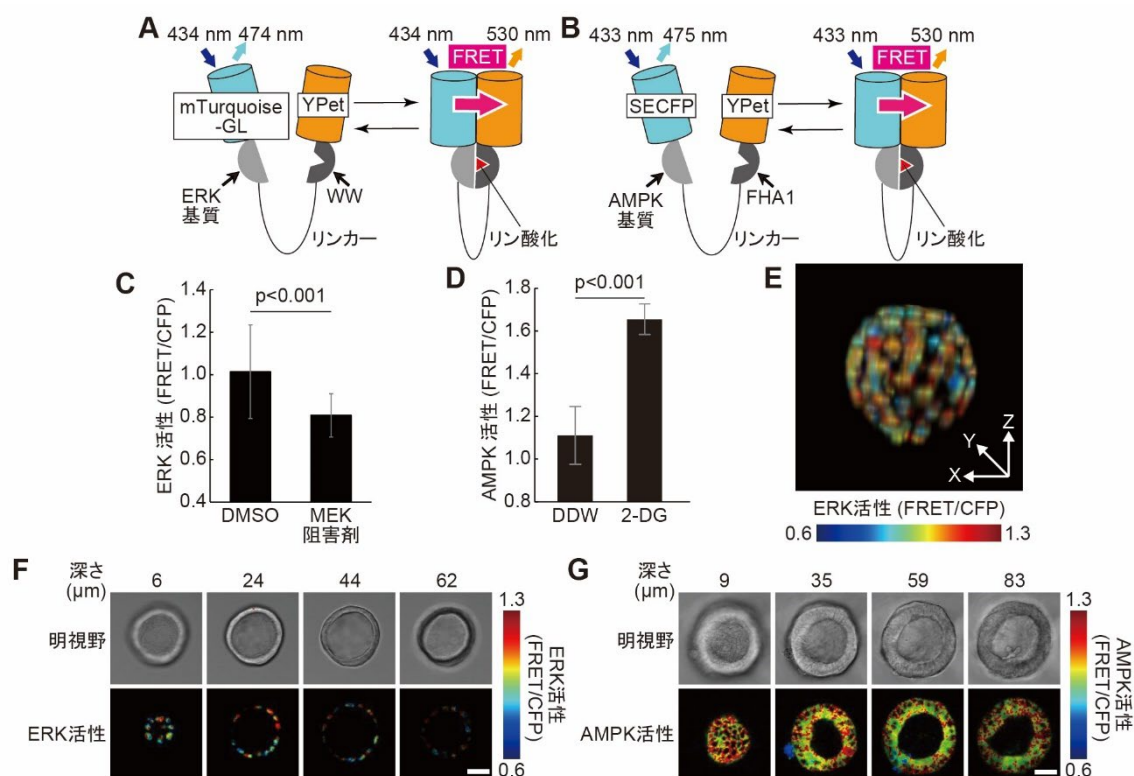


図 5. FRET バイオセンサー発現オルガノイドのイメージング

- (A) ERK 活性を検出するための FRET バイオセンサーの模式図。
- (B) AMPK 活性を検出するための FRET バイオセンサーの模式図。
- (C) ERK バイオセンサーの応答確認 (KYK001)。MEK 阻害剤: 200 nM。 (DMSO: n = 132, MEK 阻害剤: n = 122)
- (D) AMPK バイオセンサーの応答確認 (KYK001)。2-DG: 100 mM。 (DDW: n = 35, 2-DG: n = 24)
- (E) KYK001 の ERK 活性の Ratio 画像の 3D 表示。色は ERK 活性を示している。赤いと ERK 活性が高く、青いと ERK 活性が低い。
- (F) ERK バイオセンサー発現オルガノイド (KYK001) の明視野と ERK 活性の Ratio 画像。色は ERK 活性を示している。赤いと ERK 活性が高く、青いと ERK 活性が低い。スケールバー: 30 μm 。
- (G) AMPK バイオセンサー発現オルガノイド (KYK001) の明視野と AMPK 活性の Ratio 画像。色は AMPK 活性を示している。赤いと AMPK 活性が高く、青いと AMPK 活性が低い。スケールバー: 30 μm 。

1-4. Booster-AMPK の開発と評価

細胞内シグナル伝達経路は、相互に複雑に関連して機能している。そのため、複数の細胞内シグナル伝達経路を同時に観察することで、オルガノイドにおける細胞内シグナルネットワークの包括的理解が可能になると考えた。そこで、本研究で着目した ERK 活性と AMPK 活性の同時観察を計画した。本研究で使用した二光子顕微鏡は 4 つの蛍光検出器を備えており、最大 4 色の蛍光イメージングが可能である。しかし、既存の ERK バイオセンサーと AMPK バイオセンサー (4031NES) はどちらも CFP と YFP を使用しているため、同時観察は技術的に困難であった。この課題を解決するため、橙色蛍光タンパク質 mKOk と遠赤色蛍光タンパク質 mKate2 から成る PKA バイオセンサー (Booster-PKA: 4493NES) [41] の骨格を利用し、新規 AMPK バイオセンサー (Booster-AMPK) を作成した (図 6A)。具体的には、4493NES の PKA 基質を 4031NES の AMPK 基質に置換した。

1 分子型 FRET バイオセンサーの FRET 効率は、蛍光タンパク質間の距離と角度に依存する [39]。したがって、各ドメインの配列長とアミノ酸の組成が FRET 効率に大きく影響する。4031NES の AMPK 基質は、4493NES で用いた PKA 基質の 2 倍以上の長さであるため、最適な AMPK 基質配列探索が必要であった。この目的のため、異なる長さの AMPK 基質配列を持つ種類のバリエーション (4601NES、4603NES、4604NES、4605NES、4608NES) を作成した (図 6B)。

次に、Booster-AMPK を HeLa 細胞に導入し機能評価を行った。mKOk と mKate2 を観

察するための光学的コントロールとして 4493NES、AMPK 刺激のコントロールとして 4031NES を用意した。評価の結果、1.3 以上の FRET 比増加度を示した 4493NES と 4031NES に対して、Booster-AMPK の FRET 比増加度は 1.13 にとどまった (図 6C)。さらに、4601NES は細胞質型として検出されず、FRET 比増加度も他の Booster-AMPK バリエーションより低かった。配列解析の結果、4601NES では NES 配列が欠失していることが判明した。

多色同時観察における重大な技術的課題は、YFP と mKO の蛍光波長が近接しており、相互の検出器への蛍光の漏れ込みが生じることであった。漏れ込み度合いの正確な計算には高い FRET 比増加率が必要となる。しかし、Booster-AMPK の FRET 比増加率 1.13 は、FRET バイオセンサーとしては不十分であり、精密な漏れ込みの計算が困難である。結論として、ERK バイオセンサーと AMPK バイオセンサーの同時観察は技術的制約により中断を余儀なくされた。

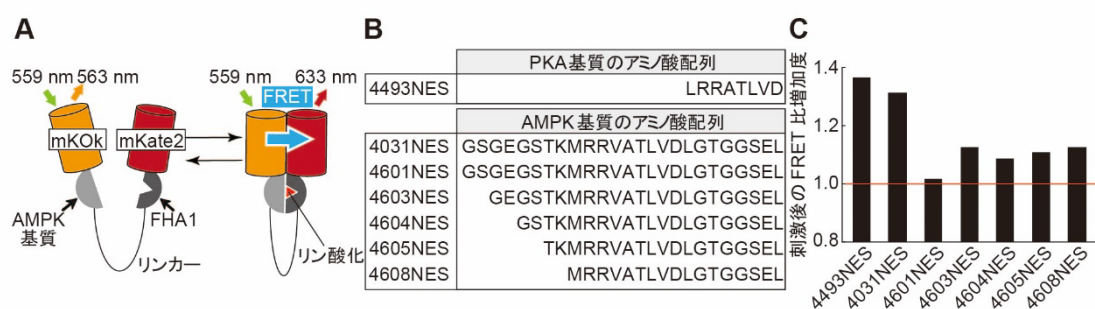


図 6. 長波長蛍光タンパク質を用いた AMPK バイオセンサー

- (A) 長波長蛍光タンパク質を用いた AMPK バイオセンサーの模式図。
 (B) 作成したバイオセンサーにおける基質のアミノ酸配列。
 (C) 各バイオセンサーにおける刺激後の応答確認。(4493NES: $n = 9$, 4031NES: $n = 13$, 4601NES: $n = 7$, 4603NES: $n = 10$, 4604NES: $n = 13$, 4605NES: $n = 10$, 4608NES: $n = 10$)

1-5. ゲル全体観察の概要と解析手法

マトリゲル内には、シングルセルから大きなオルガノイドまで、多様な細胞数をもつ細胞クラスターが共存している。これらの不均一な PDAC 細胞集団を包括的に評価するため、PDAC 細胞を包埋するゲル全体の三次元観察を行った。二光子顕微鏡に付属するソフトウェアのタイリング設定を活用することで、マトリゲルのほぼ全域を観察することが可能となった (図 7A)。マトリゲルの厚みが対物レンズの作動距離を超える場合は、プレートの底面から観察可能な最大範囲まで観察を行った。本研究では基本的に 1 回のみ実験を行ったが、広範囲を撮影しているため統計解析に十分な n 数の細胞を観察できていると考

える。

ゲル全体観察のデータは膨大であり、効率的な解析のためにプログラムを用いた解析パイプラインの開発が必要不可欠であった。大阪国際がんセンターの平塚徹先生の協力により、シングルセルレベルでのゲル全体観察の解析が実現した。核シグナルのセグメンテーションは、Fiji のプラグイン Trackmate を用いて行われた。細胞質シグナルのセグメンテーションには、Cellpose が活用された。細胞クラスターの認識は、MATLAB 関数の pcsegdist を用いて実施された。細胞間のユークリッド距離に基づいたクラスター化がなされ、20 pixel 以内の細胞を同一クラスターとした(図 7B)。この解析アプローチにより、マトリゲル内の不均一な細胞集団の詳細な空間的特性を明らかにすることが可能になった。

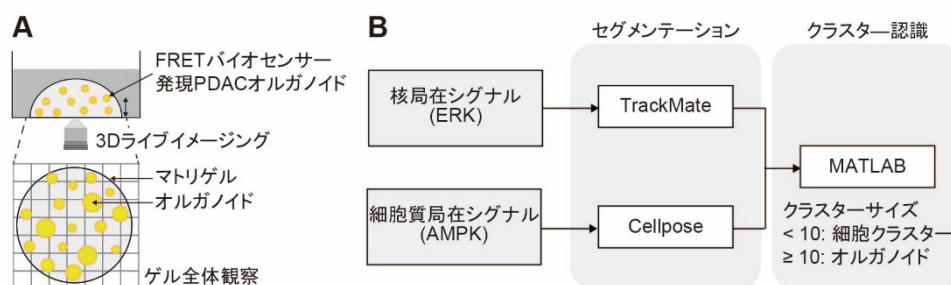


図 7. ゲル全体観察の概要と解析手法

- (A) ゲル全体観察の概要図。顕微鏡のソフトウェアに付属しているタイリングのプログラムを用い、7 視野×7 視野または 8 視野×8 視野の広範囲での撮影を行った。
- (B) 解析パイプラインの概要図。

1-6. 空間的アーチファクトの評価

空間的なアーチファクトを確認するために、ネガティブコントロールバイオセンサー EKAREN5-gl-NLS-TA を用いて、ゲルの全体観察を実施した。ネガティブバイオセンサーは ERK のリン酸化部位に位置するトレオニンがアラニンに置換されており、FRET を誘導しない特性をもつ。したがって、光学的なアーチファクトの検証に最適なツールである。観察の結果、FRET 比の空間的な不均一性は観察されなかった(図 8)。

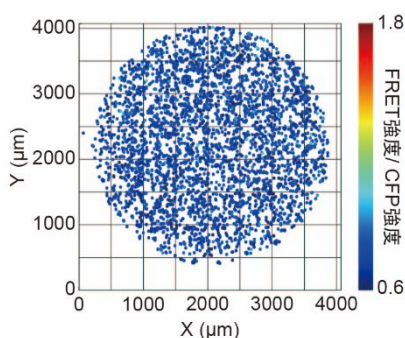


図 8. ネガティブバイオセンサーを用いたゲル全体観察

ネガティブバイオセンサー発現オルガノイド（KYK001）を用いて、ゲル全体観察を行ったときの細胞の XY 分布図。一つひとつの点はシングルセルを示している。点が集まった部分がオルガノイドとなる。点の色は細胞の FRET/CFP の比を示している。(n = 1)

2. オルガノイドにおける空間的成長パターンの不均一性

2-1. 空間的成長パターンは患者間において不均一である

ゲル全体観察による包括的なライブイメージングを 10 種類のオルガノイド株に対して実施し、それぞれの空間的成長パターンを評価した。ゲル全体観察により、シングルセル、数細胞のクラスターや大きく成長したオルガノイドを偏りなく可視化することが可能となった。観察の結果、オルガノイド株間での空間的成長パターンの多様性が明らかとなった（図 9）。KYK011 や KYK036 は少数の大きなオルガノイドを形成しており、オルガノイドサイズの大きなばらつきがみられた。KYK002 や KYK006 は小さなオルガノイドを数多く形成した。KYK001、KYK054、KYK069 は小さいオルガノイドが比較的細胞密度が低く存在した。KYK027、KYK041、KYK077 は中程度の大きさのオルガノイドと小さいオルガノイドが混在していた。これらの観察結果は、各オルガノイド株の多様性を示唆している。

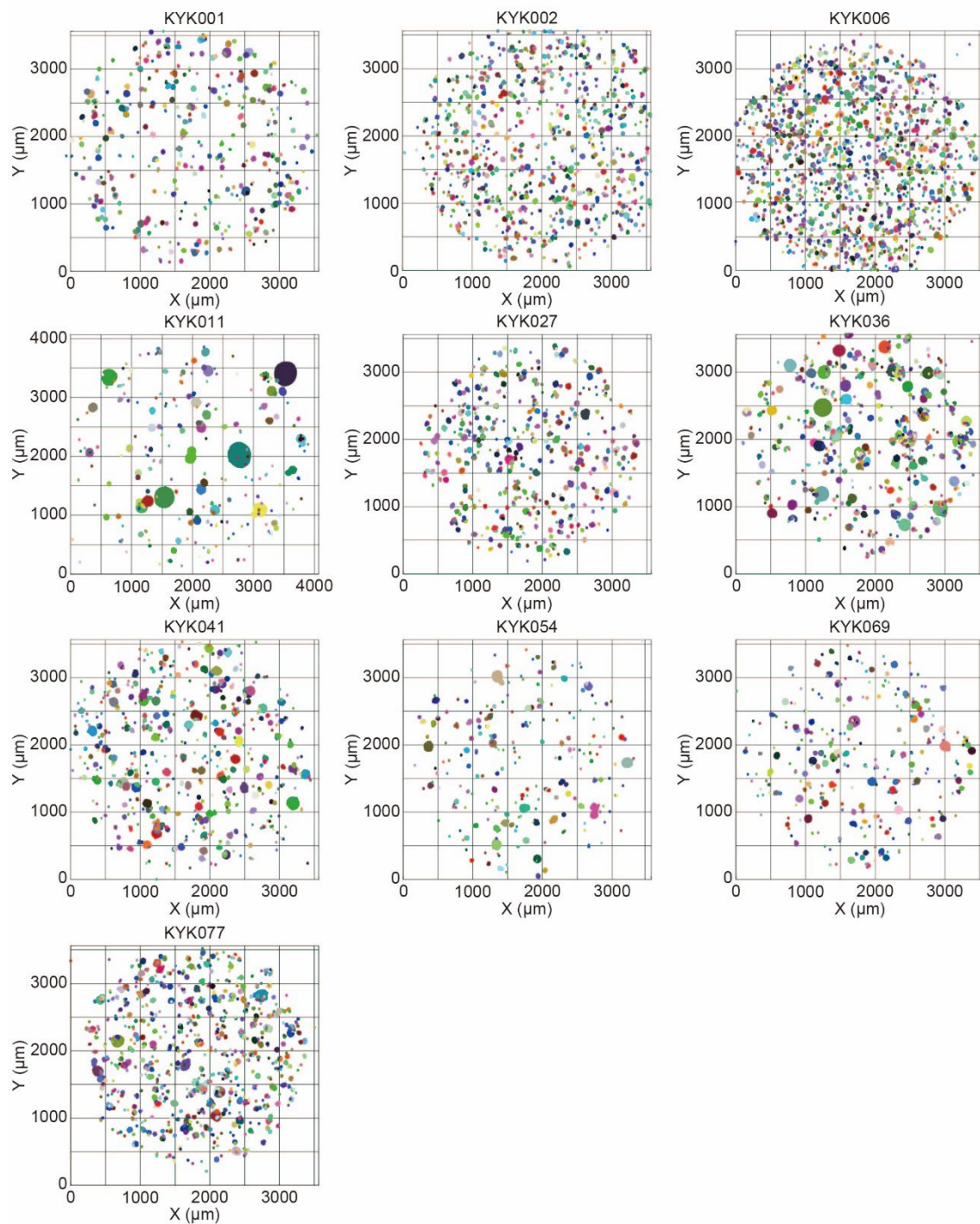


図 9. ゲル全体観察におけるクラスターのXY 分布

1 細胞や数細胞の塊、大きく成長したオルガノイドまですべての細胞をそれぞれクラスターに分けるクラスター解析を行った (図 7B)。クラスター解析により得られたクラスターのXY 分布を示した。色はクラスターごとにランダムに割り当てられている。(n = 1)

2-2. 大多数の細胞はオルガノイドを形成できない

本研究における画像解析では、10 個以上の細胞が閾値距離内に集合している細胞クラスターをオルガノイドとして定義する（図 10A）。一方、シングルセルやオルガノイドも含むすべての細胞集団を「細胞クラスター」と定義する。閾値距離の計算は 3 次元で行った。既報と一致して、オルガノイドを形成可能な細胞は非常に限られており、大多数の細胞は 10 個未満の細胞クラスターの状態にとどまった（図 9）[95]。解析したオルガノイド株におけるオルガノイド形成効率（オルガノイドを形成した細胞クラスターの割合）（図 10B）は、13%から 40%を示した（図 10C）。

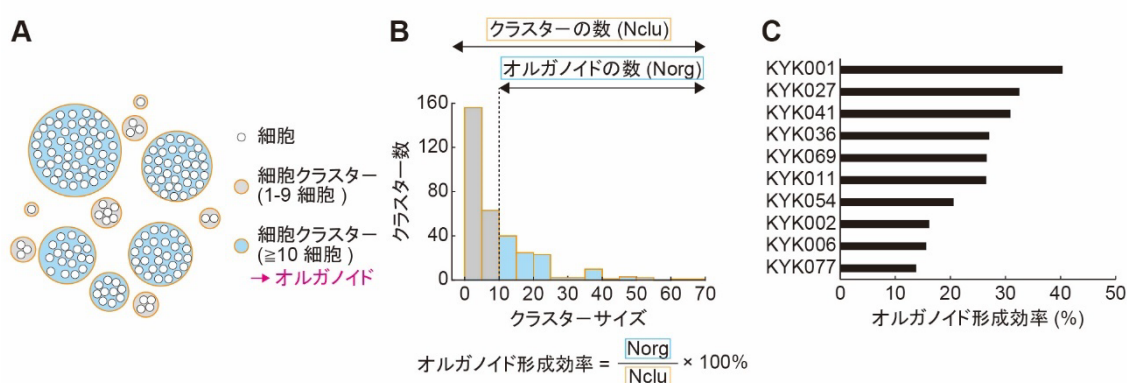


図 10. オルガノイド形成効率

- (A) オルガノイドの定義。図では 2 次元で表示しているが、実際は 3 次元である。
 (B) オルガノイド形成効率の計算方法。
 (C) 10 種類のオルガノイド株におけるオルガノイド形成効率。(KYK001: n = 4658, KYK002: n = 5288, KYK006: n = 8297, KYK011: n = 9334, KYK027: n = 4434, KYK036: n = 9676, KYK041: n = 8029, KYK054: n = 2748, KYK069: n = 3577, KYK077: n = 4720)

2-3. PDAC のマトリゲル内での成長パターンを 4 つの指標で定量化した

同一の細胞数をマトリゲル内に播種した PDAC の増殖特性は、同一時系列における (1) 全細胞数、(2) 平均オルガノイドサイズ、(3) 最大オルガノイドサイズ、(4) オルガノイド形成効率の 4 つの指標を用いて定量化された。オルガノイドサイズは、オルガノイド内の細胞数で示される。全細胞数と平均オルガノイドサイズ、最大オルガノイドサイズの比較では弱い正の相関がみられ、一方で全細胞数とオルガノイド形成効率の間には相関がみられなかった（図 11A-C）。これら 4 つの指標を用いて、10 種類のオルガノイド株のマトリゲル内での増殖能を多面的に評価した（図 10C、図 11D-F）。例えば、KYK036 は最も細胞数が多いが、最も高いオルガノイド形成効率を示したのは KYK001 の 40%だった。KYK011 は中程度のオルガノイド形成効率を示しながら、1,000 細胞以上から構成される大型オルガノイドを形成した。対照的に、KYK002 は大型オルガノイドを形成しな

ったものの、同等の細胞数のオルガノイドを均一に形成した。偏りのないゲル全体観察により、シングルセルからシングルオルガノイドに至るまで、各オルガノイド株の多様な細胞ダイナミクスが様々な角度から明らかにされた。

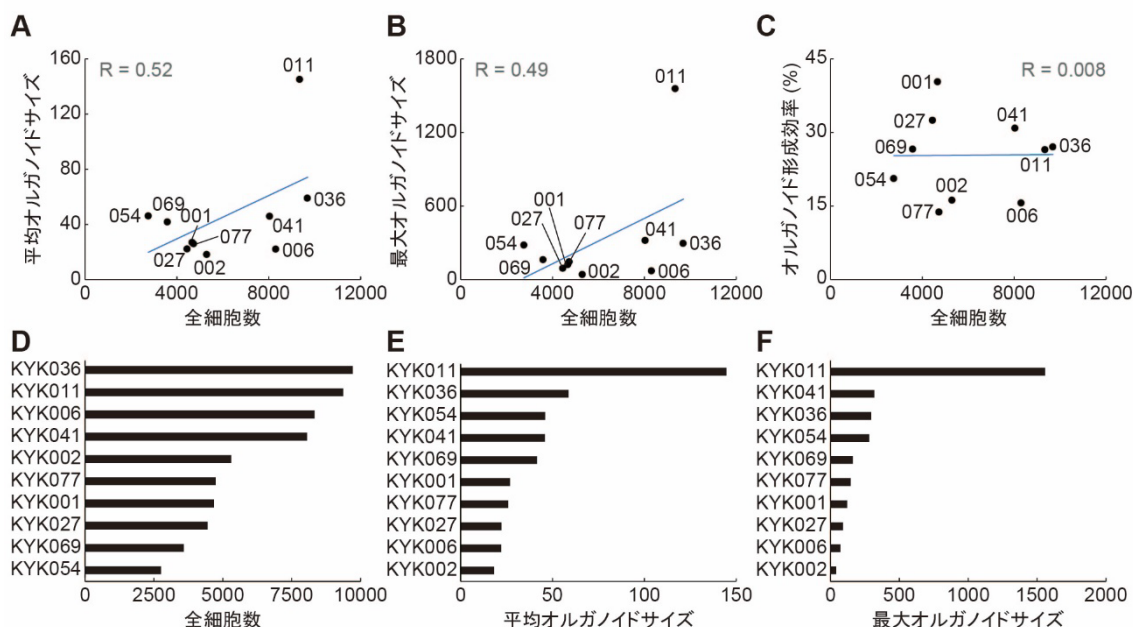


図 11. オルガノイドの空間的成長パターンの評価

(A-F) オルガノイドの空間的成長パターンの評価。(KYK001: $n = 4658$, KYK002: $n = 5288$, KYK006: $n = 8297$, KYK011: $n = 9334$, KYK027: $n = 4434$, KYK036: $n = 9676$, KYK041: $n = 8029$, KYK054: $n = 2748$, KYK069: $n = 3577$, KYK077: $n = 4720$)

(A) 10 種類のオルガノイド株における全細胞数と平均オルガノイドサイズ。

(B) 10 種類のオルガノイド株における全細胞数と最大オルガノイドサイズ。

(C) 10 種類のオルガノイド株における全細胞数とオルガノイド形成効率。

(D) 10 種類のオルガノイド株における全細胞数の定量結果。

(E) 10 種類のオルガノイド株における平均オルガノイドサイズの定量結果。

(F) 10 種類のオルガノイド株における最大オルガノイドサイズの定量結果。

2-4. オルガノイドは不均一に成長する

オルガノイドサイズの不均一性の原因を探るため、KYK001 を用いて細胞数の偏りを検証する実験を行った。20 μm のストレイナーを用いて細胞をほぼシングルセルまで分散させたのち、播種後の空間的成長パターンの均一性を調査した。20 μm のストレイナーを通した群と通していない群を用意し、播種後 0 日目と 9 日目にゲル全体観察を行った。当初、ストレイナーによってシングルセルへの分離を期待したが、ストレイナーの有無に関わらず、播種時点で既に 80% 程度の細胞がシングルセル状態であることが明らかになった。

(図 12A)。なお、本予備実験においては、手技の問題で播種後のストレイナーありの細胞数はストレイナーなしの約 2 倍となってしまう（図 12B）。空間分布においても細胞数の違いは明らかであり、ストレイナーありにおいてより高い細胞密度が観察された（図 12C）。播種後 9 日目にゲル全体観察を行った結果、ストレイナーの処理にかかわらず、不均一な空間成長パターンが観察された（図 12D）。これらの知見から、当初想定していた播種時の細胞数の偏りが不均一性の直接的な原因ではないことが示された。むしろ、シングルセルの状態から不均一な空間パターンが生じることが明らかとなり、オルガノイド形成における新たな知見が得られた。

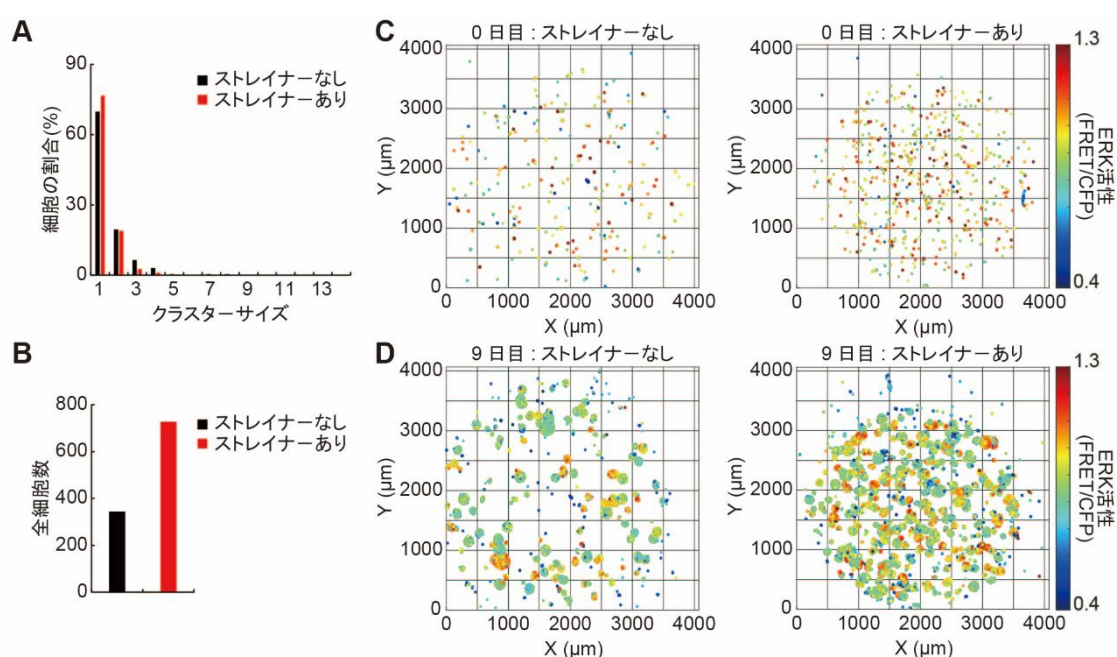


図 12. ストレイナーを使用した播種のオルガノイド増殖への影響

- (A) 0 日目（播種日）におけるクラスターサイズの比較。（ストレイナーなし: $n = 344$, ストレイナーあり: $n = 727$ ）
- (B) 0 日目（播種日）における全細胞数の比較。（ストレイナーなし: $n = 344$, ストレイナーあり: $n = 727$ ）
- (C) 0 日目（播種日）におけるゲル全体の XY 細胞分布。一つひとつの点はシングルセルを示している。点が集まった部分がオルガノイドとなる。点の色は細胞の ERK 活性を示している。赤いと ERK 活性が高く、青いと ERK 活性が低い。ストレイナーなし（左）、ストレイナーあり（右）。($n = 1$)
- (D) 9 日目におけるゲル全体の XY 細胞分布。一つひとつの点はシングルセルを示している。点が集まった部分がオルガノイドとなる。点の色は細胞の ERK 活性を示している。赤いと ERK 活性が高く、青いと ERK 活性が低い。ストレイナーなし（左）、ストレイナーあり（右）。($n = 1$)

2-5. 「勝者」オルガノイドの細胞は継代後も大型オルガノイドを形成する

ではオルガノイドを形成する細胞群とオルガノイドを形成しない細胞群はどのように決定されるのか？大きなオルガノイドの形成能は娘細胞に伝搬されるのか？これらの問題を検証するため、(1) ゲル内の最大オルガノイド（勝者オルガノイド）と (2) 小さなオルガノイド群（敗者オルガノイド）をピックアップし、実験を行った（図 13A）。実験には KYK011 を用いた。ピックアップしたオルガノイドを TrypLE で分散させて継代し、0 日目と 9 日目にゲル全体の観察を行った。0 日目において勝者オルガノイドは敗者オルガノイドよりも播種細胞数が多く、この傾向は 9 日目も同様に維持された（図 13B）。0 日目の平均オルガノイドサイズは同程度であったにもかかわらず、9 日目には勝者オルガノイドの方が高い平均オルガノイドサイズを示した（図 13C）。これは、勝者オルガノイドの細胞が継代後も大型のオルガノイドを形成する能力を持つことを示唆している。一方、オルガノイド形成効率では 9 日目の観察において、敗者オルガノイドの形成効率が勝者オルガノイドを上回った（図 13D）。つまり、オルガノイド形成効率は低い、大型のオルガノイドを形成する細胞集団と、高いオルガノイド形成効率を示すが、大きくはならないオルガノイドの細胞集団という特徴づけができる。この現象は、大型オルガノイドを形成する KYK011 や、多数の小型オルガノイドを生成する KYK006 のパターンと類似していた。この結果は、勝者オルガノイドはパラクライン依存性細胞群であり、ある程度大きくなると加速度的に大きくなる可能性を示唆する。

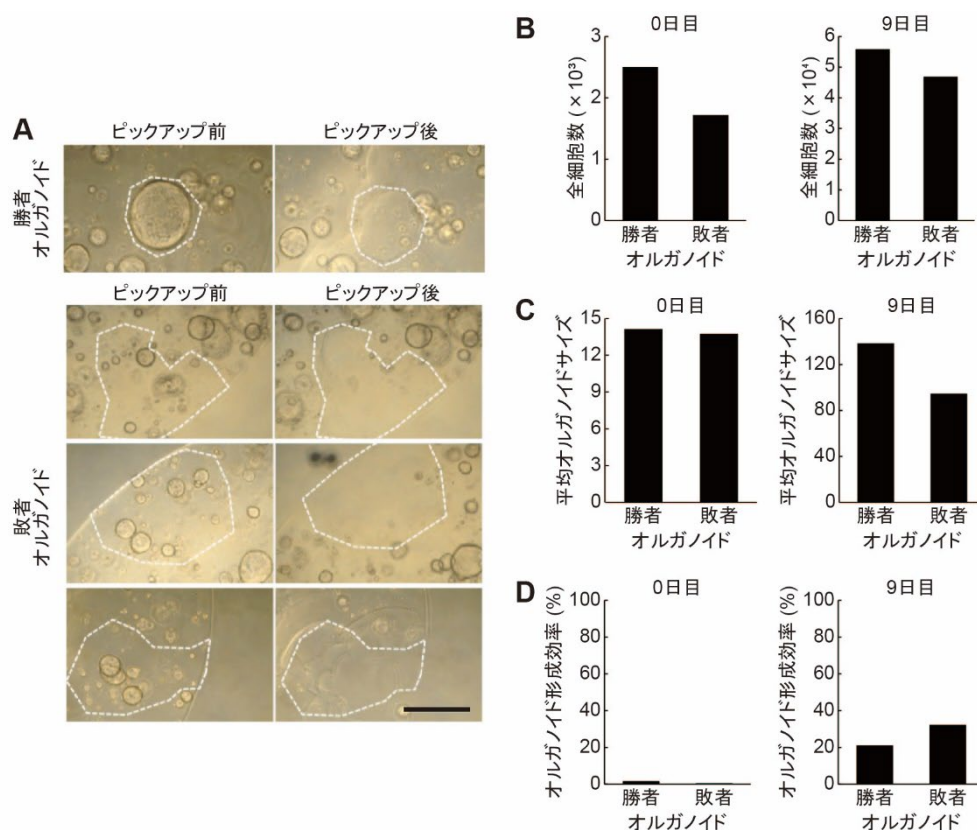


図 13. ピックアップしたオルガノイドの増殖

- (A) ピックアップ前後の明視野画像。大きく成長した勝者オルガノイド（上）、小さなオルガノイド群（下）。スケールバー: 150 μm 。
- (B-D) ピックアップしたオルガノイドの増殖評価。(0 日目勝者オルガノイド: $n = 2501$, 0 日目敗者オルガノイド: $n = 1718$, 9 日目勝者オルガノイド: $n = 55802$, 9 日目敗者オルガノイド: $n = 46858$)
- (B) 全細胞数の比較。0 日目（左）、9 日目（右）。
- (C) 平均オルガノイドサイズの比較。0 日目（左）、9 日目（右）。
- (D) オルガノイド形成効率の比較。0 日目（左）、9 日目（右）。

3. オルガノイドにおける ERK 活性の不均一性

3-1. 患者間、オルガノイド間、単一オルガノイド内の細胞間における ERK 活性の不均一性を解析した

シングルセルレベルの FRET 解析を通じて、不均一な細胞増殖能と ERK MAPK シグナル活性の関連性を検討した。そのためにまず、10 種類の患者由来オルガノイド株における ERK 活性の空間分布をマッピングし、患者間（オルガノイド株間）、各マトリゲル内のオルガノイド間、オルガノイドの個々の細胞間での不均一性を解析した（図 14A、図 14B）。

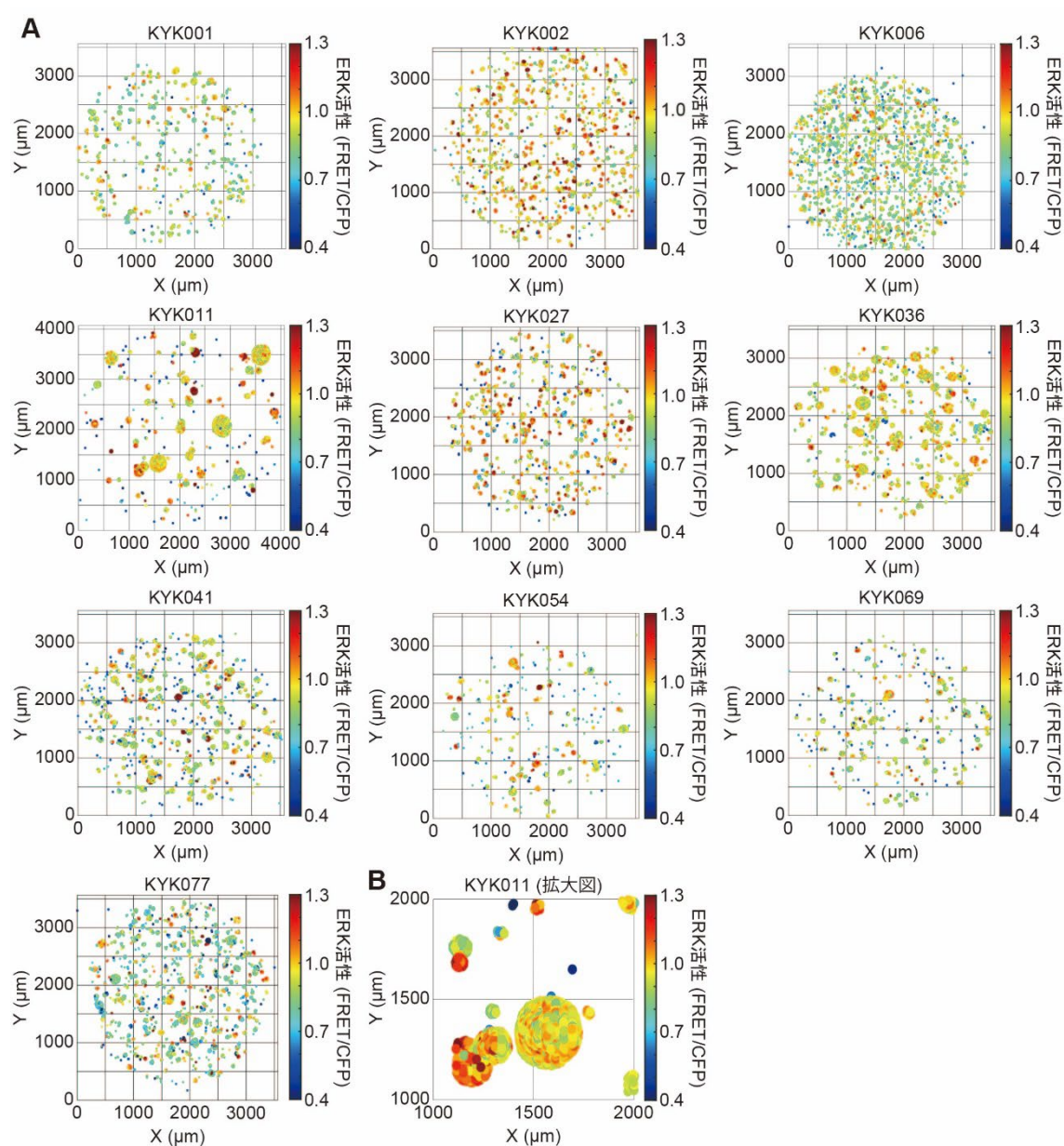


図 14. ゲル全体観察における ERK 活性の XY 空間分布

- (A) ERK バイオセンサー発現オルガノイドのゲル全体観察から得られた、10 種類のオルガノイド株における ERK 活性の XY 空間分布。一つひとつの点はシングルセルを示している。点が集まった部分がオルガノイドとなる。点の色は細胞の ERK 活性を示している。赤いと ERK 活性が高く、青いと ERK 活性が低い。(n = 1)
- (B) KYK011 の一部の拡大図。一つひとつの点はシングルセルを示している。点が集まった部分がオルガノイドとなる。点の色は細胞の ERK 活性を示している。赤いと ERK 活性が高く、青いと ERK 活性が低い。

3-2. 10 個のオルガノイドにおける ERK 活性と ERK 活性の不均一性が定量化された

10 株のオルガノイドを比較したところ、全体的な平均 ERK 活性だけでなく、FRET/CFP 値の標準偏差で示される ERK 活性の不均一性においても、大きなばらつきが観察された(図 15A)。例えば、KYK011 は最も高い平均 ERK 活性を示す一方、KYK001 は最も低い平均 ERK 活性を示した。KYK011 と KYK002 を比較すると、平均 ERK 活性は同程度であったが、ERK 活性の不均一性のレベルには明確な差異が認められた。統計学解析において、平均 ERK 活性、ERK 活性の標準偏差とオルガノイド形成効率との間に相関は見出されなかった(図 15B)。一方、平均 ERK 活性、ERK 活性の標準偏差と平均オルガノイドサイズは正の相関を示した(図 15C)。個々のオルガノイドを詳細に観察することで、ERK 活性と増殖能との関係を多面的に評価することが可能となった。また本研究では、広視野を観察したため基本的に 1 回のみの実験としている。実験の再現性に関しては ERK バイオセンサー発現 KYK001 のゲル全体観察で確認しており、オルガノイドのサイズや ERK 活性のばらつきは小さかったが、オルガノイド形成効率は大きく異なっていた。

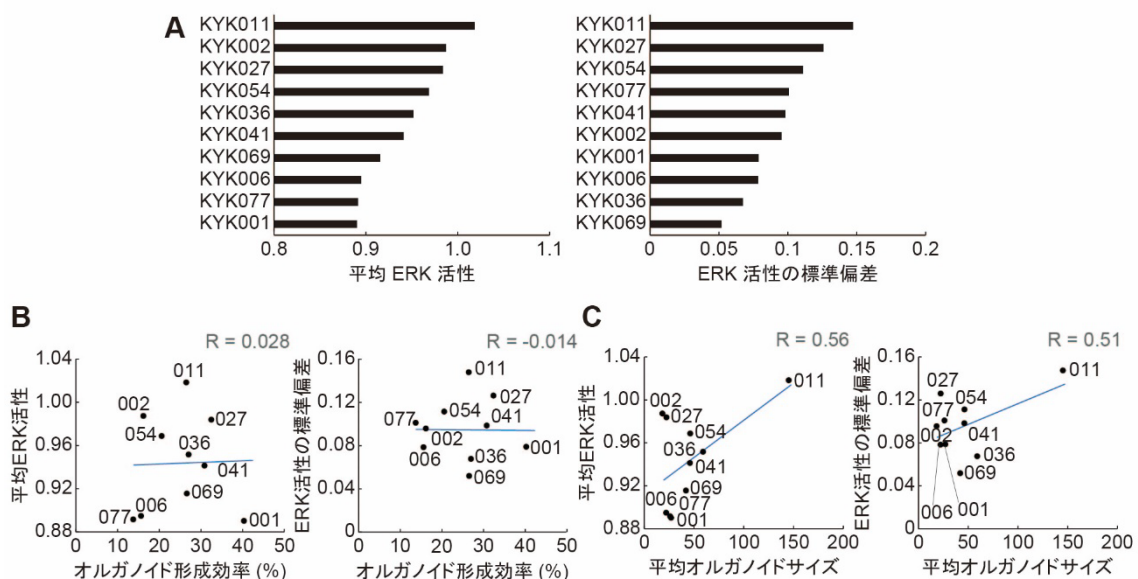


図 15. オルガノイドの増殖と ERK 活性

(A-C) オルガノイドの増殖と ERK 活性の定量評価。(KYK001: n = 4658, KYK002: n = 5288, KYK006: n = 8297, KYK011: n = 9334, KYK027: n = 4434, KYK036: n = 9676, KYK041: n = 8029, KYK054: n = 2748, KYK069: n = 3577, KYK077: n = 4720)

(A) 10 種類のオルガノイド株における ERK 活性に関する指標の定量結果。平均 ERK 活性 (左)、ERK 活性の標準偏差 (右)。

(B) 10 種類のオルガノイド株におけるオルガノイド形成効率と、ERK 活性に関する指標。平均 ERK 活性 (左)、ERK 活性の標準偏差 (右)。

(C) 10 種類のオルガノイド株における平均オルガノイドサイズと、ERK 活性に関する指標。平均 ERK 活性 (左)、ERK 活性の標準偏差 (右)。

3-3. 大型オルガノイドは低い ERK 活性を示す

細胞クラスター解析から、オルガノイドサイズと ERK 活性の興味深い関係が明らかになった。図 16 では細胞数が 10 以上のオルガノイド内を赤色の点で、9 以下のオルガノイドを灰色の点で示している。赤色の点の分布は、横軸を底辺とし、縦軸を高さとする直角三角形の形に類似する。すなわち、オルガノイドサイズが小さいうちは ERK 活性は低～高の分布を示すが、クラスターサイズが大きくなるにつれ、ERK 活性が低い方に収束する傾向が認められた。KYK002 や KYK027 のように、その傾向が判然としないものもあるが、オルガノイド株の大部分でこの傾向が広く認められた。10 細胞未満の小さな細胞集団は、活発に増殖している細胞と死滅した細胞が混在する、非常にばらつきのある ERK 活性を示した (図 16)。細胞クラスター内の細胞数の増加に伴う ERK 活性の全体的な低下傾向は、オルガノイド増殖の初期段階における ERK の重要な役割を示唆している。

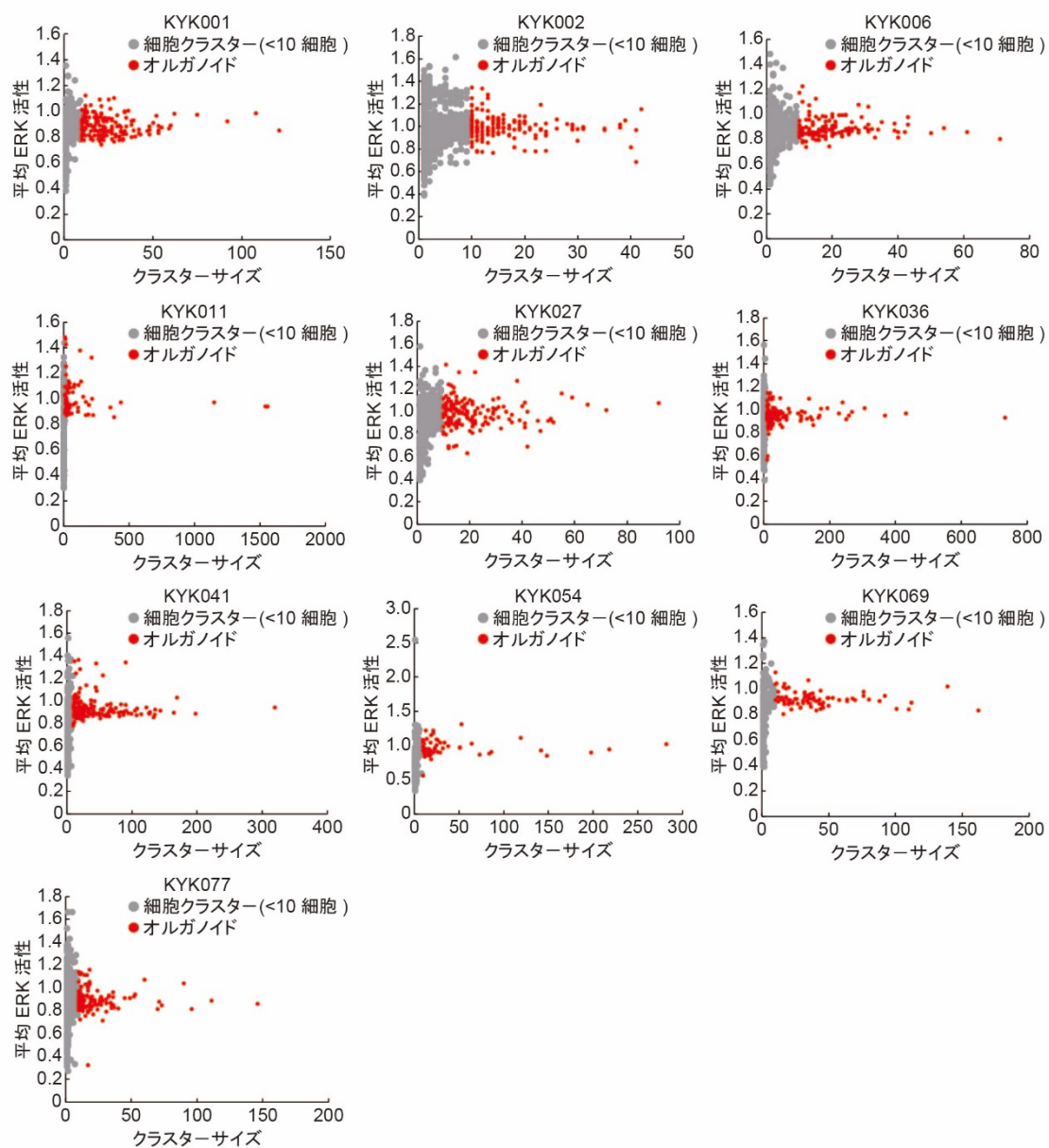


図 16. クラスターサイズと平均 ERK 活性

各オルガノイド株で検出されたすべてのクラスターに対し、クラスターサイズとそのクラスターにおける平均ERK活性をプロットした。9細胞以下から成る細胞クラスター(灰色)、10細胞以上から成るオルガノイド(赤色)。(KYK001: n = 357, KYK002: n = 865, KYK006: n = 1428, KYK011: n = 234, KYK027: n = 462, KYK036: n = 540, KYK041: n = 512, KYK054: n = 238, KYK069: n = 282, KYK077: n = 800)

3-4. EGF 枯渇下では過半数のオルガノイドが増殖抑制を示すが ERK 活性は維持される

EGF の枯渇実験により、ERK シグナル伝達経路と細胞増殖の関係をさらに詳細に検証した。通常培地と EGF 枯渇培地でオルガノイドを培養した結果、EGF 枯渇下で細胞増殖が抑制される EGF 枯渇感受性オルガノイド株 (KYK001 や KYK036) と、細胞増殖への影響が少ない EGF 枯渇抵抗性オルガノイド株 (KYK002 や KYK069) に分かれた (図 17A)。驚くべきことに、EGF 枯渇が ERK 活性に与える影響は限定的であった (図 17B)。また一部のオルガノイド株では、EGF 枯渇培地の ERK 活性が常にコントロールよりも低く維持される一方で、他の株では培養中に ERK 活性が上昇する現象が観察された。これらの結果は、EGF を起点とする ERK シグナル伝達経路と細胞増殖の動態が、患者間で異なることを示唆している。

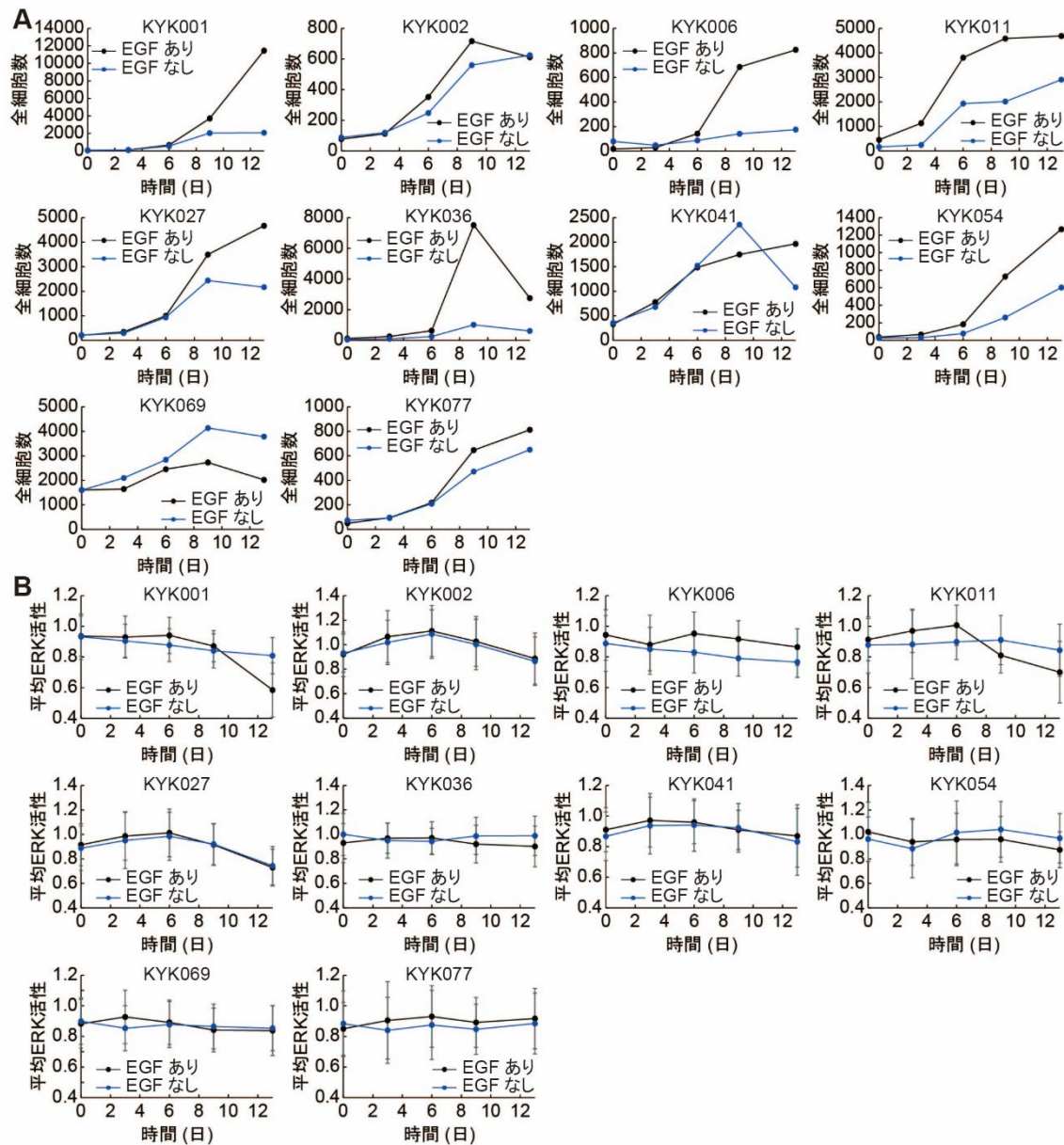


図 17. EGF 枯渇時の細胞増殖と ERK 活性

- (A) 通常の培地または EGF 枯渇培地で 13 日間培養したオルガノイドの全細胞数。0 日目 (播種日)、3 日目、6 日目、9 日目、13 日目に観察を行った。EGF あり (黒色)、EGF なし (青色)。(n = 1)
- (B) 通常の培地または EGF 枯渇培地で 13 日間培養したオルガノイドの平均 ERK 活性。0 日目 (播種日)、3 日目、6 日目、9 日目、13 日目に観察を行った。EGF あり (黒色)、EGF なし (青色)。(n = 1)

4. オルガノイドにおける AMPK 活性の不均一性

4-1. AMPK 活性の患者間、オルガノイド間、単一オルガノイド内の細胞間における不均一性を解析した

AMPK の FRET バイオセンサー AMPKAR-EV を発現する PDAC 細胞にシングルセル FRET イメージング戦略を適用することで、AMPK 活性と PDAC オルガノイドの成長の関係を解析した。ERK 活性と同様に、AMPK 活性は個々の細胞、細胞クラスター、および患者間（オルガノイド株間）で著しく不均一であることが明らかになった（図 18A、図 18B）。平均 AMPK 活性は KYK077 で高く、KYK027 では中程度、KYK036 では低いことが観察された（図 19A）。AMPK 活性の不均一性（FRET/CFP 値の標準偏差）は KYK041 で高く、KYK069 で低かった（図 19A）。オルガノイド形成効率は、AMPK 活性とわずかに正の相関を示したものの、AMPK 活性の不均一性とは相関しなかった（図 19B）。興味深いことに、平均オルガノイドサイズは AMPK 活性と負の相関を示し、これは ERK 活性で観察された正の相関とは対照的な結果となった（図 19C）。また平均オルガノイドサイズと AMPK 活性の不均一性は相関していなかった。マトリゲルの中心部では培地へのアクセスが少なく AMPK 活性が高くなるという直感に反し、マトリゲルの周辺部に位置するオルガノイドは、中心部に位置するオルガノイドよりも高い AMPK 活性を示した（図 18A）。マトリゲル辺縁部でよりオルガノイドが大きく成長することから、辺縁部でより細胞密度が高くなり栄養が枯渇すると考えられる。

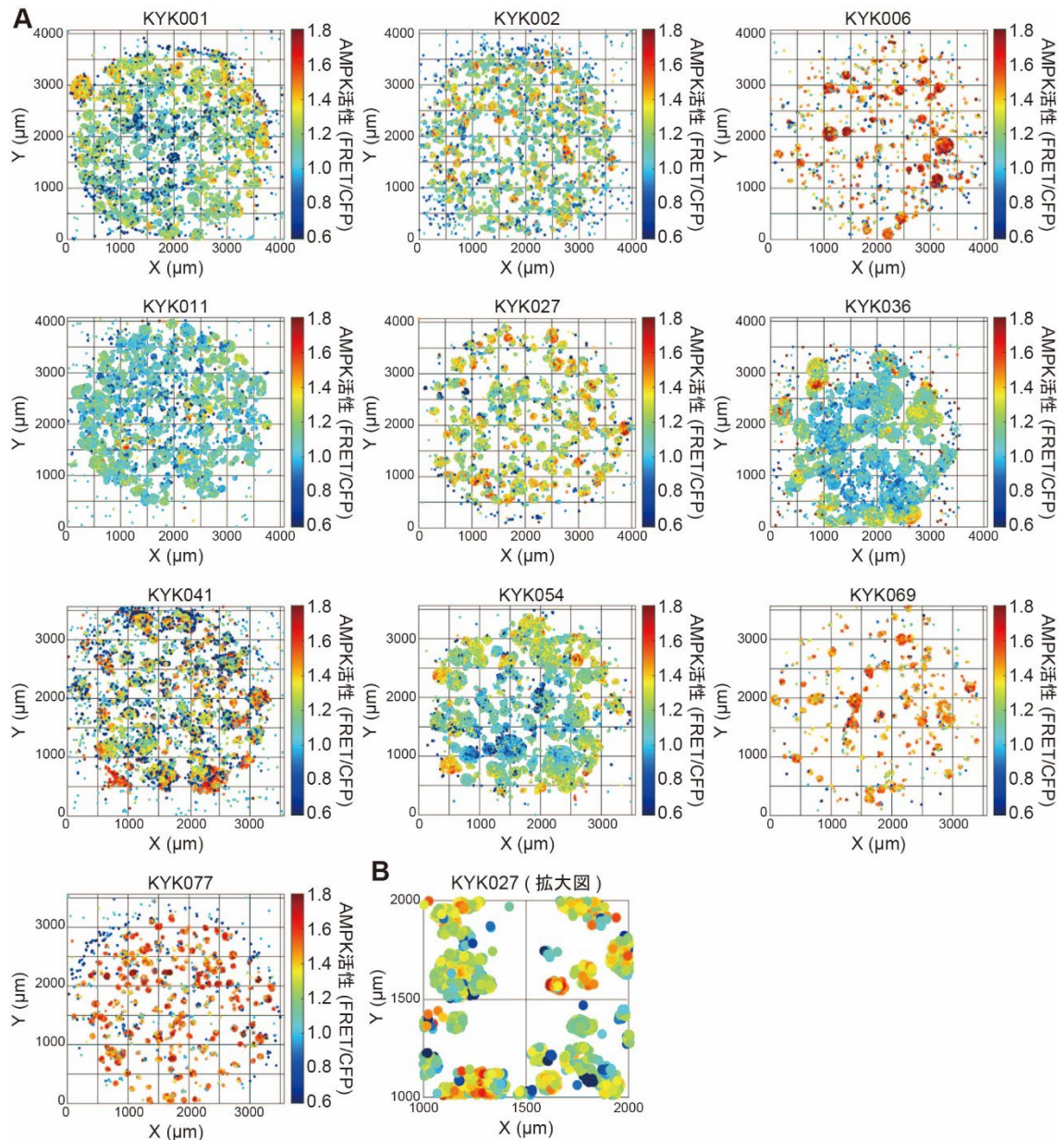


図 18. ゲル全体観察における AMPK 活性の XY 空間分布

- (A) AMPK バイオセンサー発現オルガノイドのゲル全体観察から得られた、10 種類のオルガノイド株における AMPK 活性の XY 空間分布。一つひとつの点はシングルセルを示している。点が集まった部分がオルガノイドとなる。点の色は細胞の AMPK 活性を示している。赤いと AMPK 活性が高く、青いと AMPK 活性が低い。(n = 1)
- (B) KYK011 の一部の拡大図。一つひとつの点はシングルセルを示している。点が集まった部分がオルガノイドとなる。点の色は細胞の AMPK 活性を示している。赤いと AMPK 活性が高く、青いと AMPK 活性が低い。

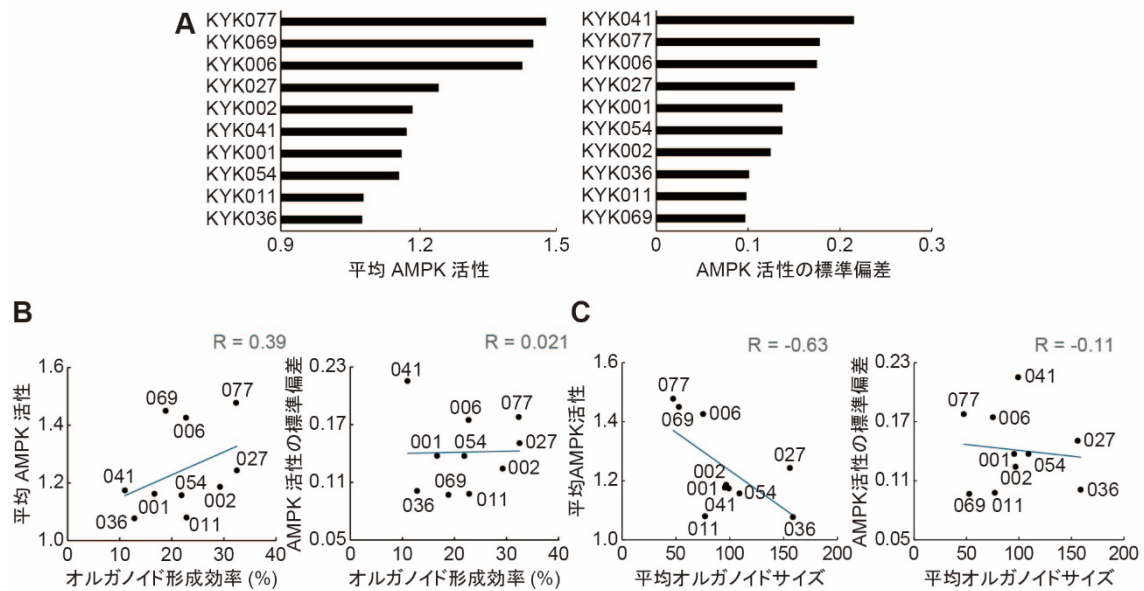


図 19. オルガノイドの増殖と AMPK 活性

(A-C) オルガノイドの増殖と AMPK 活性の定量結果。(KYK001: n = 44053, KYK002: n = 48227, KYK006: n = 14128, KYK011: n = 44225, KYK027: n = 45775, KYK036: n = 47358, KYK041: n = 25472, KYK054: n = 39498, KYK069: n = 6459, KYK077: n = 11490)

(A) 10 種類のオルガノイド株における AMPK 活性に関する指標の定量結果。平均 AMPK 活性 (左)、AMPK 活性の標準偏差 (右)。

(B) 10 種類のオルガノイド株におけるオルガノイド形成効率と、AMPK 活性に関する指標。平均 AMPK 活性 (左)、AMPK 活性の標準偏差 (右)。

(C) 10 種類のオルガノイド株における平均オルガノイドサイズと、AMPK 活性に関する指標。平均 AMPK 活性 (左)、AMPK 活性の標準偏差 (右)。

4-2. 大型オルガノイドは高い AMPK 活性を示す

細胞クラスターレベルでの AMPK 活性の解析の結果、大型オルガノイドで AMPK 活性が高いことが明らかになり (図 20)、これは ERK 活性で観察された傾向 (図 16) とは対照的であった。この結果は、オルガノイド成長の後期段階においての AMPK が重要な役割を果たす可能性を示唆している。オルガノイドを形成していない細胞クラスターにおける AMPK 活性は、ERK 活性と同様に非常にばらつきが大きく、成長中の細胞と死滅した細胞の共存を示唆する結果となった。

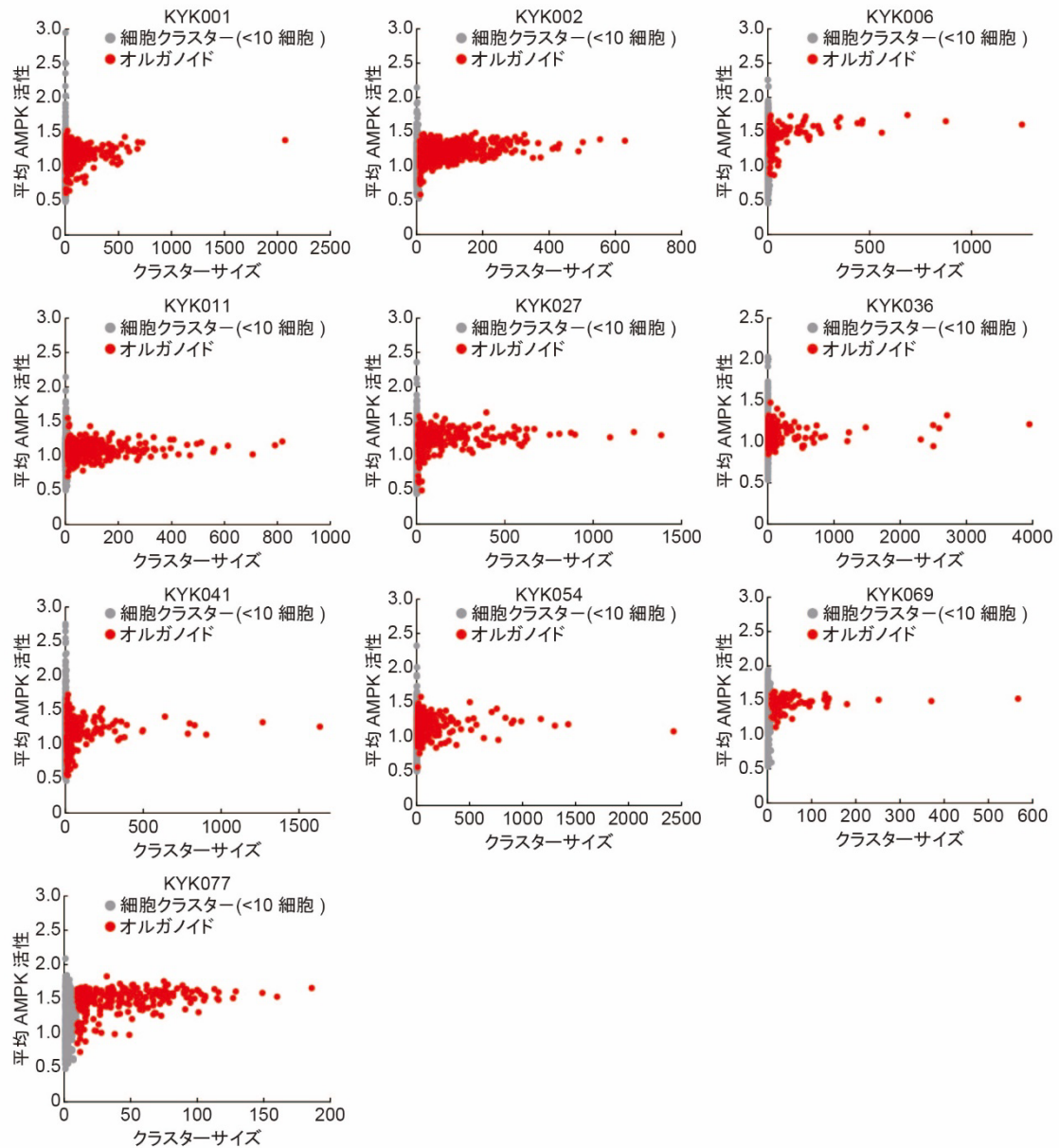


図 20. クラスターサイズと平均 AMPK 活性

各オルガノイド株で検出されたすべてのクラスターに対し、クラスターサイズとそのクラスターにおける平均 AMPK 活性をプロットした。9 細胞以下から成る細胞クラスター（灰色）、10 細胞以上から成るオルガノイド（赤色）。(KYK001: n = 2496, KYK002: n = 1610, KYK006: n = 722, KYK011: n = 2270, KYK027: n = 874, KYK036: n = 2105, KYK041: n = 1967, KYK054: n = 1526, KYK069: n = 531, KYK077: n = 671)

4-3. ERK 活性と AMPK 活性は逆相関を示す

平均オルガノイドサイズと ERK 活性、AMPK 活性の相反する相関パターンと（図 15C、図 19C）、大型オルガノイドにおける ERK 活性の低下と AMPK 活性の上昇（図 16、図 20）は、これら二つのシグナル伝達経路の相互作用を示唆している。解析の結果、各オルガノイド株の平均 ERK 活性と平均 AMPK 活性が負の相関を示すことが明らかになった（図 21）。これらの知見は、ERK と AMPK が補完的に機能する可能性を示唆している。

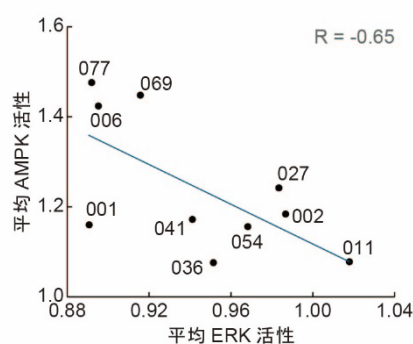


図 21. ERK 活性と AMPK 活性

10 種類のオルガノイド株における平均 ERK 活性と AMPK 活性をプロットした。(n = 1)

5. ERK シグナル伝達経路を標的とした薬剤治療

5-1. MEK 阻害剤の増殖抑制効果は患者によって異なる

ゲル全体観察によって明らかになった ERK と AMPK の活性動態の違いを受けて、各経路の阻害剤がオルガノイド増殖に与える影響を調査した。まず、ERK シグナル伝達経路阻害の効果を 10 種類のオルガノイド株で検討した。ERK バイオセンサー発現 PDAC 細胞を播種した日から 13 日間、MEK 阻害剤 (MEKi) 含有培地、もしくは DMSO を添加したコントロール培地で培養した。MEKi は PD0325901 を本研究に使用した。0 日目、3 日目、6 日目、9 日目、13 日目の計 5 回、二光子顕微鏡で観察した (図 22A)。二光子顕微鏡観察では、顕微鏡ソフトウェアのタイリング設定を用い、合計 25 視野 (5×5 視野) を撮影した。

まず、エンドポイントである 13 日目において、オルガノイドの成長に対しての薬剤効果を評価した。評価には (1) 全細胞数 (図 22B)、(2) オルガノイドの数 (図 22C)、(3) 最大オルガノイドサイズ (図 22D) を用いた。これまでオルガノイド形成効率や平均オルガノイドサイズを指標として用いていたが、これらの指標は薬剤環境下で生存した細胞集団のみを反映するため、本研究では当該指標を評価基準から除外した。3 つの指標に加えて、細胞の空間分布を可視化することで薬剤効果を評価した (図 23)。その結果、PD0325901 の効果はオルガノイド株によって大きく異なることが判明した (図 22B-D)。KYK001、KYK006、KYK027 および KYK054 では増殖がほぼ完全に阻害された。KYK002 の増殖はわずかに阻害された。対照的に、KYK036 と KYK041 は、PD0325901 存在下でもコントロールのオルガノイドに匹敵する大型オルガノイドが残存した。さらに興味深いことに、KYK011 と KYK069、KYK077 では PD0325901 存在下においても細胞増殖が促進された。

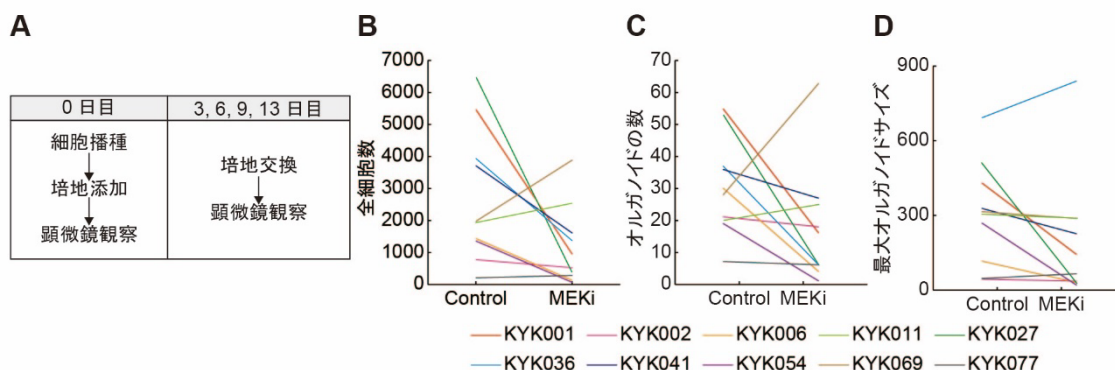


図 22. MEK 阻害剤添加時のオルガノイド増殖

- (A) MEK 阻害剤実験の概要図。
- (B) 薬剤添加後 13 日目における全細胞数の比較。(n = 1)
- (C) 薬剤添加後 13 日目におけるオルガノイドの数の比較。(n = 1)
- (D) 薬剤添加後 13 日目における最大オルガノイドサイズの比較。(n = 1)

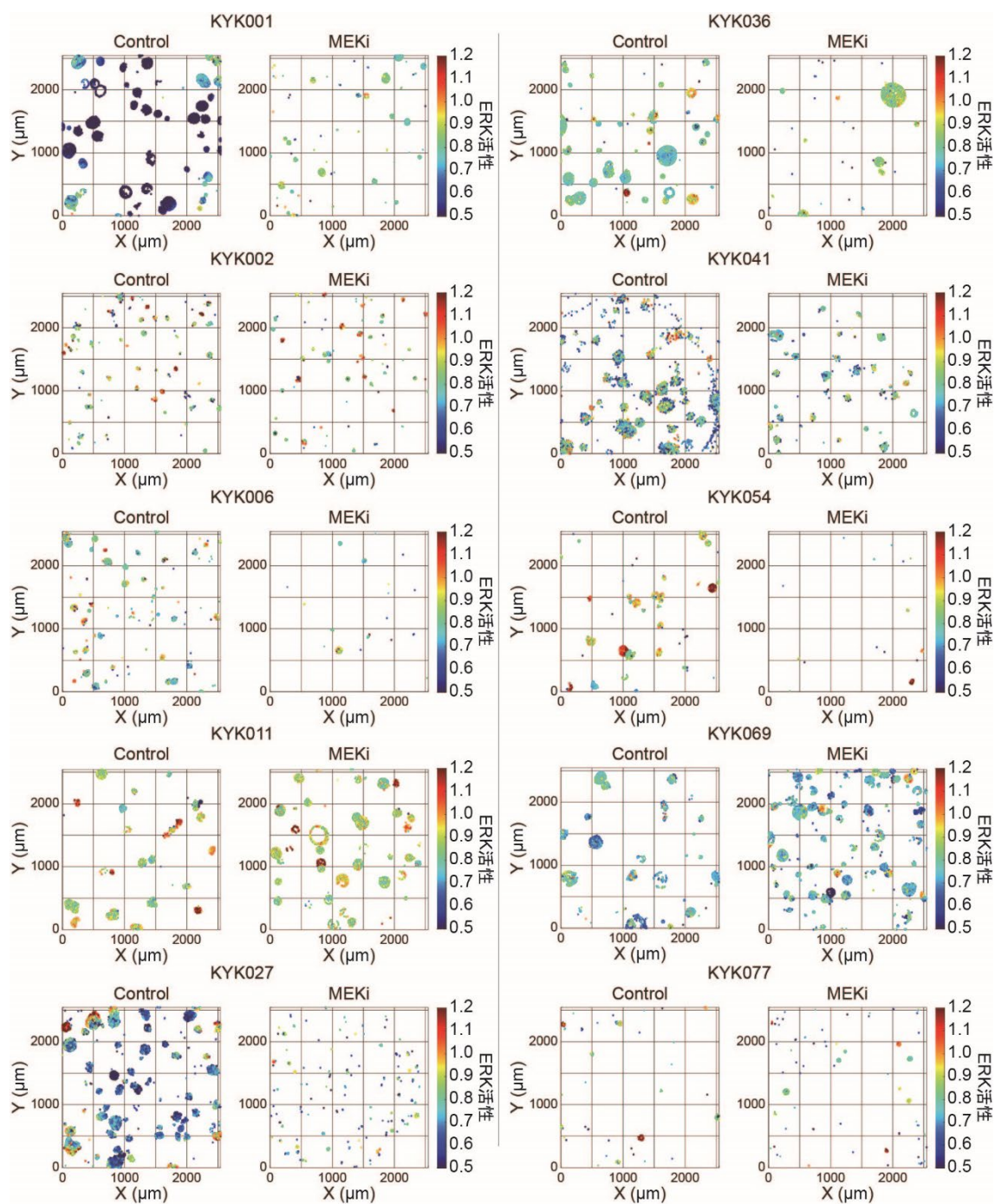


図 23. MEK 阻害剤添加時の細胞の空間分布と ERK 活性

薬剤添加後 13 日目における細胞の空間分布と ERK 活性。5 視野×5 視野で撮影した。一つひとつの点はシングルセルを示している。点が集まった部分がオルガノイドとなる。点の色は細胞の ERK 活性を示している。赤いと ERK 活性が高く、青いと ERK 活性が低い。各オルガノイドについて、コントロール（左）、MEK 阻害剤（右）。(n = 1)

時系列データに基づく薬剤応答の評価から、PD0325901 に対するオルガノイド株の経時的な応答が明らかになった（図 24）。13 日目の評価と共通して、KYK001、KYK006、KYK027 および KYK054 は 13 日間にわたって細胞増殖が強く抑制されたにもかかわらず、細胞数は緩やかに増加し続けた。KYK002 は部分的な増殖抑制を受け、コントロールの半分程度の増殖能を維持した。KYK036 と KYK041 は、細胞数の観点からは強く増殖抑制されたように見えるが、実際には大型オルガノイドが残存していた。この観察から、薬剤効果をイメージングで評価することの利点が示された。KYK011 は KYK002 と類似の傾向を示し、コントロールの半分程度の増殖能で 13 日間推移した。KYK069 と KYK077 はコントロールとほぼ同等の増殖能を示した。このように、PD0325901 存在下における各オルガノイド株の多様な応答パターンは、PD0325901 の単独療法における限界を示唆している。

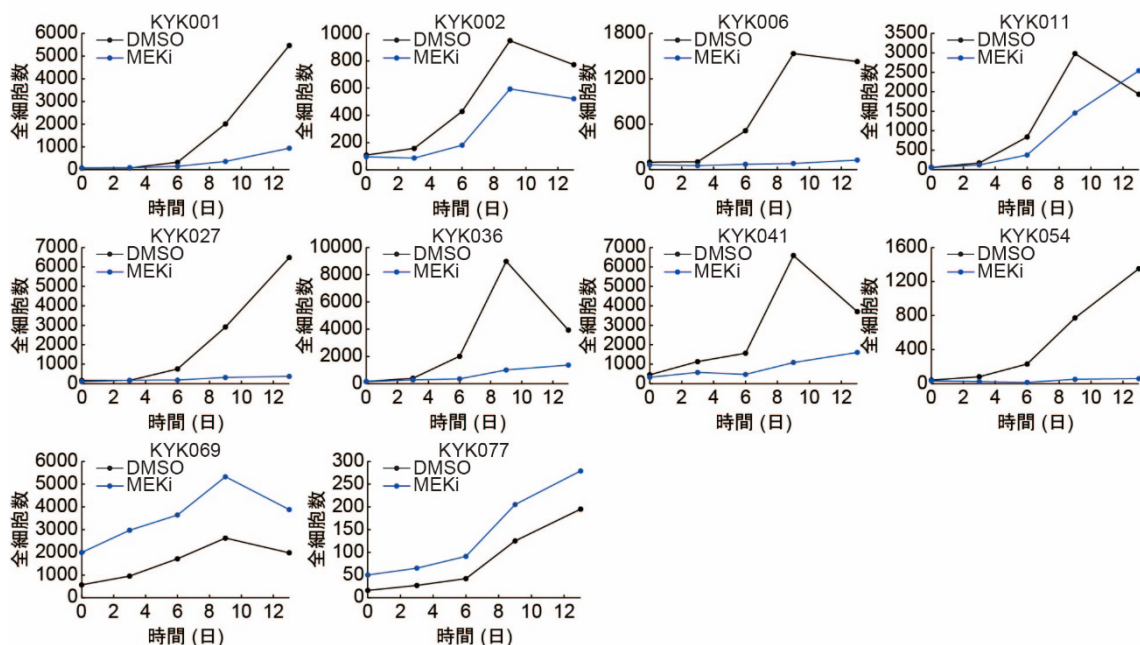


図 24. MEK 阻害剤添加時の細胞増殖

DMSO 添加培地または MEK 阻害剤添加培地で 13 日間培養したオルガノイドの全細胞数。0 日目（播種日）、3 日目、6 日目、9 日目、13 日目に観察を行った。DMSO 添加培地（黒色）、MEK 阻害剤添加培地（青色）。（n = 1）

5-2. MEK 阻害剤存在下において薬剤耐性細胞が生じる

PD0325901 添加時の ERK 活性も興味深い結果を示した。添加 45 分後には、ほぼすべてのオルガノイド株で ERK 活性の低下が観察された（図 25A）。しかし 13 日目には過半数のオルガノイド株でコントロールと同等か、それ以上の ERK 活性が認められた（図 25B）。次に、ERK 活性の時系列データを評価した（図 26A）。コントロールと PD0325901 の ERK 活性が逆転したオルガノイド株のうち、KYK001 と KYK027 はコントロールの ERK 活性が急激に減少しており、これが 13 日目の ERK 活性の評価に影響を与えていることが判明した。前述の空間マッピング（図 23）を考慮すると、KYK001 と KYK027 ではオルガノイドが過度に成長し、オルガノイド内の細胞密度の上昇が増殖と ERK 活性の抑制を誘導したと考えられる。コントロールと PD0325901 の ERK 活性が逆転したもう 1 つのオルガノイド株、KYK054 では 9 日目以降、急激に ERK 活性が上昇した（図 26A）。オルガノイドレベルでも 9 日目と 13 日目でコントロールより高い ERK 活性を示した（図 26B）。空間マッピングにおいては、大きなオルガノイドが高い ERK 活性を示した（図 23）。これらの結果は、少なくとも KYK054 においては PD0325901 の長期間添加による薬剤耐性オルガノイドの誘導を示唆している。イメージングによる詳細な評価により、単純な細胞数の測定では見逃される活性変化や薬剤耐性の兆候を捉えることができた。

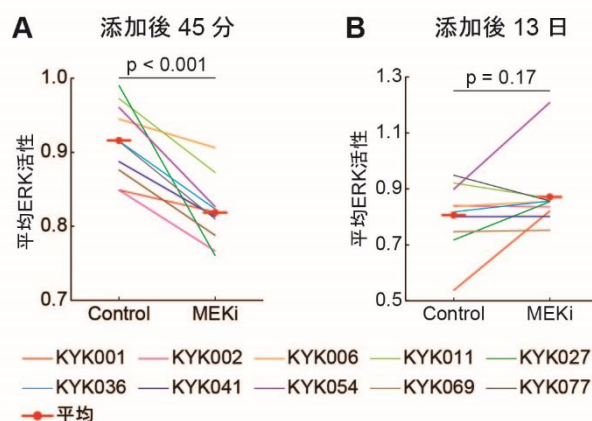


図 25. MEK 阻害剤添加時の ERK 活性

(A) 10 種類のオルガノイド株における薬剤添加後 45 分の平均 ERK 活性。（n = 1）

(B) 10 種類のオルガノイド株における薬剤添加後 13 日の平均 ERK 活性。（n = 1）

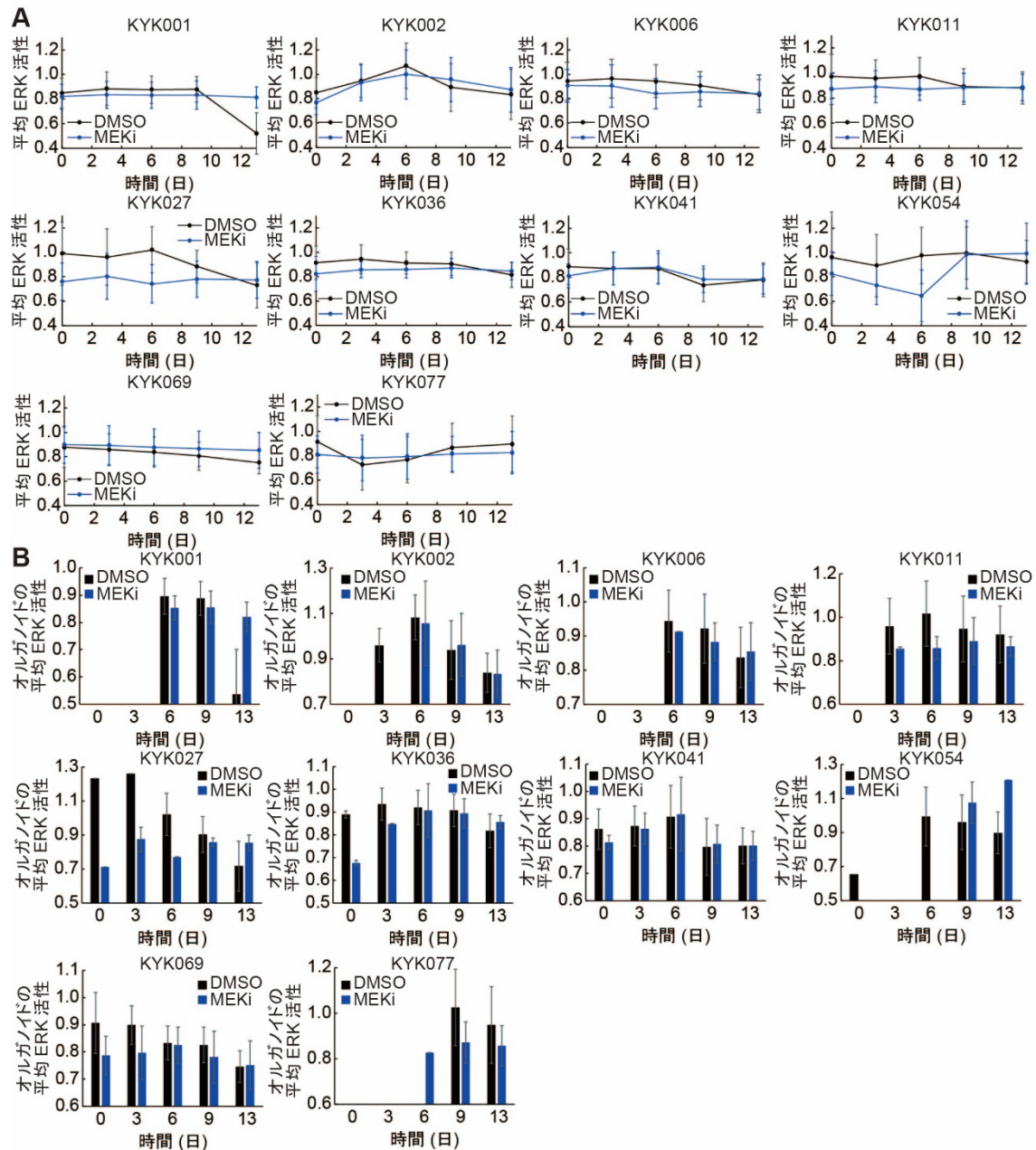


図 26. MEK 阻害剤添加時の時系列情報を含んだ ERK 活性

- (A) DMSO 添加培地または MEK 阻害剤添加培地で 13 日間培養したオルガノイドの全細胞における平均 ERK 活性。0 日目（播種日）、3 日目、6 日目、9 日目、13 日目に観察を行った。DMSO 添加培地（黒色）、MEK 阻害剤添加培地（青色）。(n = 1)
- (B) DMSO 添加培地または MEK 阻害剤添加培地で 13 日間培養したオルガノイドの全オルガノイドにおける平均 ERK 活性。0 日目（播種日）、3 日目、6 日目、9 日目、13 日目に観察を行った。DMSO 添加培地（黒色）、MEK 阻害剤添加培地（青色）。(n = 1)

5-3. MEK 阻害剤処理細胞は増殖能を保持している

PD0325901 で処理した細胞の増殖能を調べた。この実験には KYK001 を用いた。異なる時点（播種後 0 日目、2 日目、4 日目、7 日目）から PD0325901 含有培地、またはコントロール培地で 3 日間処理し、その後、薬剤を含まない培地に変更して 5 日間培養した。それぞれの条件について、薬剤添加前、3 日間薬剤処理後、5 日間薬剤除去後の 3 回、二光子顕微鏡による撮影を実施した（図 27A）。すべての薬剤添加開始日に共通して、3 日間の PD0325901 処理において細胞増殖が抑制された。しかし、薬剤除去後に細胞増殖が回復した（図 27B）。この結果から、PD0325901 処理細胞が依然として増殖能を保持していることが判明した。

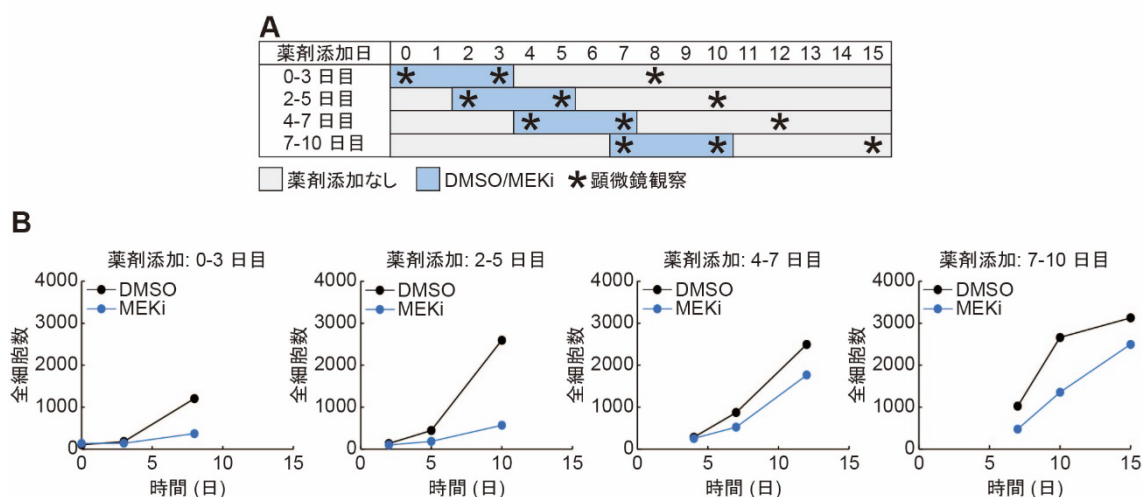


図 27. MEK 阻害剤処理後のオルガノイドの再増殖

- (A) MEK 阻害剤処理後のオルガノイドの再増殖について調べるため、薬剤添加タイミングをずらした条件を 4 つ用意し実験を行った。青色で示した 3 日間で薬剤添加を行い、灰色で示した期間は通常の培地でオルガノイドを培養した。アスタリスクを記載したタイミング（薬剤添加前、3 日間薬剤処理後、5 日間薬剤除去後の 3 回）で顕微鏡観察を行った。
- (B) 5×5 視野で撮影を行った時に得られた全細胞数。左から、薬剤添加が 0-3 日目、2-5 日目、4-7 日目、7-10 日目。DMSO 添加培地（黒色）、MEK 阻害剤添加培地（青色）。(n = 1)

6. オートファジー経路を標的とした薬剤治療

6-1. ヒドロキシクロロキンはすべての患者で増殖抑制効果を示す

オートファジー阻害剤ヒドロキシクロロキン (HCQ) を用いて、オートファジー経路の阻害効果を検証した。本実験では、AMPK バイオセンサーを発現する PDAC 細胞を使用した。MEK 阻害剤添加実験と同様の観察スケジュールを計画していたが、顕微鏡の予約の都合上、実験デザインを調整せざるを得なかった。具体的には、1 種類のオルガノイド株に対して 5 日程度で実験を実施する必要があったため、0 日目と 3 日目を同一ウェル、6 日目と 9 日目を同一ウェルとし、13 日目の観察は見送った (図 28A)。0 日目と 6 日目、3 日目と 9 日目をそれぞれ同日に観察した。オルガノイドは、HCQ 含有培地またはミリ Q 水を添加したコントロール培地で培養した。顕微鏡観察には二光子顕微鏡を使用し、合計 25 視野 (5×5 視野) を撮影した。

エンドポイントである 13 日目において、MEK 阻害剤添加実験と同様の評価基準でオルガノイドの増殖抑制効果を検討した。具体的には、(1) 全細胞数 (図 28B)、(2) オルガノイドの数 (図 28C)、(3) 最大のオルガノイドの大きさ (最大オルガノイドサイズ) (図 28D)、および細胞の空間マッピング (図 29) を解析した。PD0325901 処理とは対照的に、HCQ はすべてのオルガノイド株で細胞増殖を抑制した。HCQ で処理した PDAC 細胞は、PD0325901 で処理した細胞で見られたような大きなオルガノイドを形成しなかった (図 22D、図 28D)。しかしながら、HCQ 存在下においても小さなオルガノイドが残存していた (図 28C、図 28D)。これは、HCQ 処理下で小さな細胞クラスターを示した空間マッピングの結果と一致していた (図 29)。

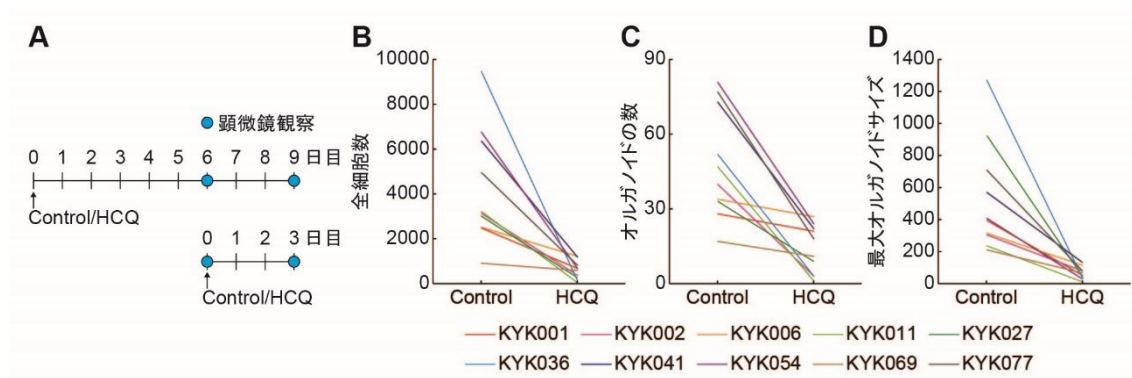


図 28. オートファジー阻害剤添加時のオルガノイド増殖

- (A) オートファジー阻害剤実験の概要図。
- (B) 薬剤添加後 9 日目における全細胞数の比較。 (n = 1)
- (C) 薬剤添加後 9 日目におけるオルガノイドの数の比較。 (n = 1)
- (D) 薬剤添加後 9 日目における最大オルガノイドサイズの比較。 (n = 1)

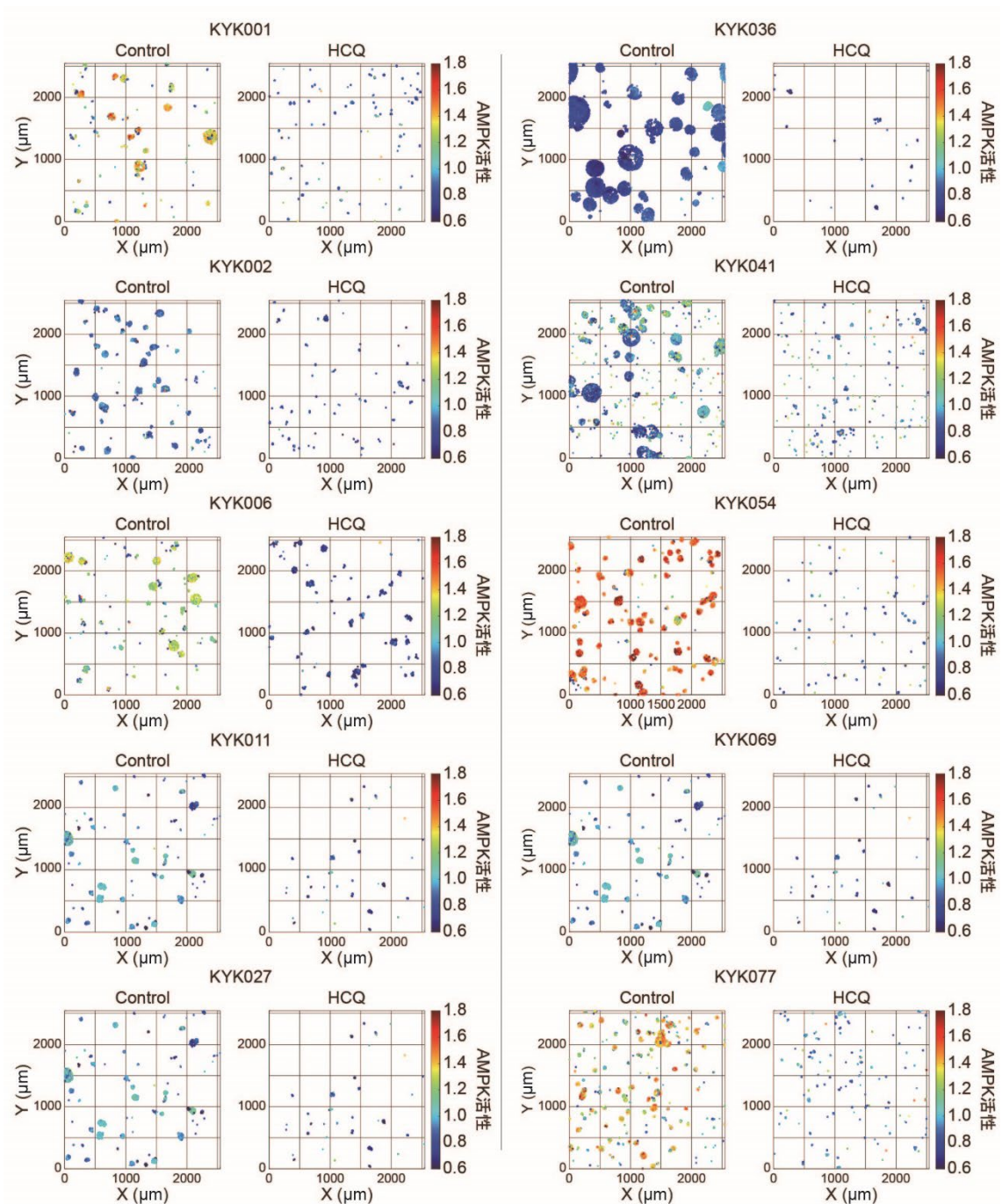


図 29. オートファジー阻害剤添加時の細胞の空間分布と AMPK 活性

薬剤添加後 9 日目における細胞の空間分布と AMPK 活性。5×5 視野で撮影した。一つひとつの点はシングルセルを示している。点が集まった部分がオルガノイドとなる。点の色は細胞の AMPK 活性を示している。赤いと AMPK 活性が高く、青いと AMPK 活性が低い。各オルガノイドについて、コントロール（左）、オートファジー阻害剤（右）。(n = 1)

次に、0日目から9日目までの時系列データを用いて、薬剤効果を詳細に評価した。過半数のオルガノイド株において、80%以上の顕著な増殖阻害が観察された（図 30A）。MEK 阻害剤添加実験（図 24）とは異なり、HCQ 処理により大部分のオルガノイド株で細胞数の増加が停止した（図 30B）。一方で、3つのオルガノイド株（KYK006、KYK069、KYK077）では、HCQ 処理下においても細胞数の増加が認められ、薬剤添加中にもかかわらず細胞増殖が持続した。HCQ は PD0325901 と比較して全体的に強力な増殖抑制効果を示したものの、一部の小さなオルガノイドの残存と特定のオルガノイド株における細胞数増殖の継続という課題が明らかになった。

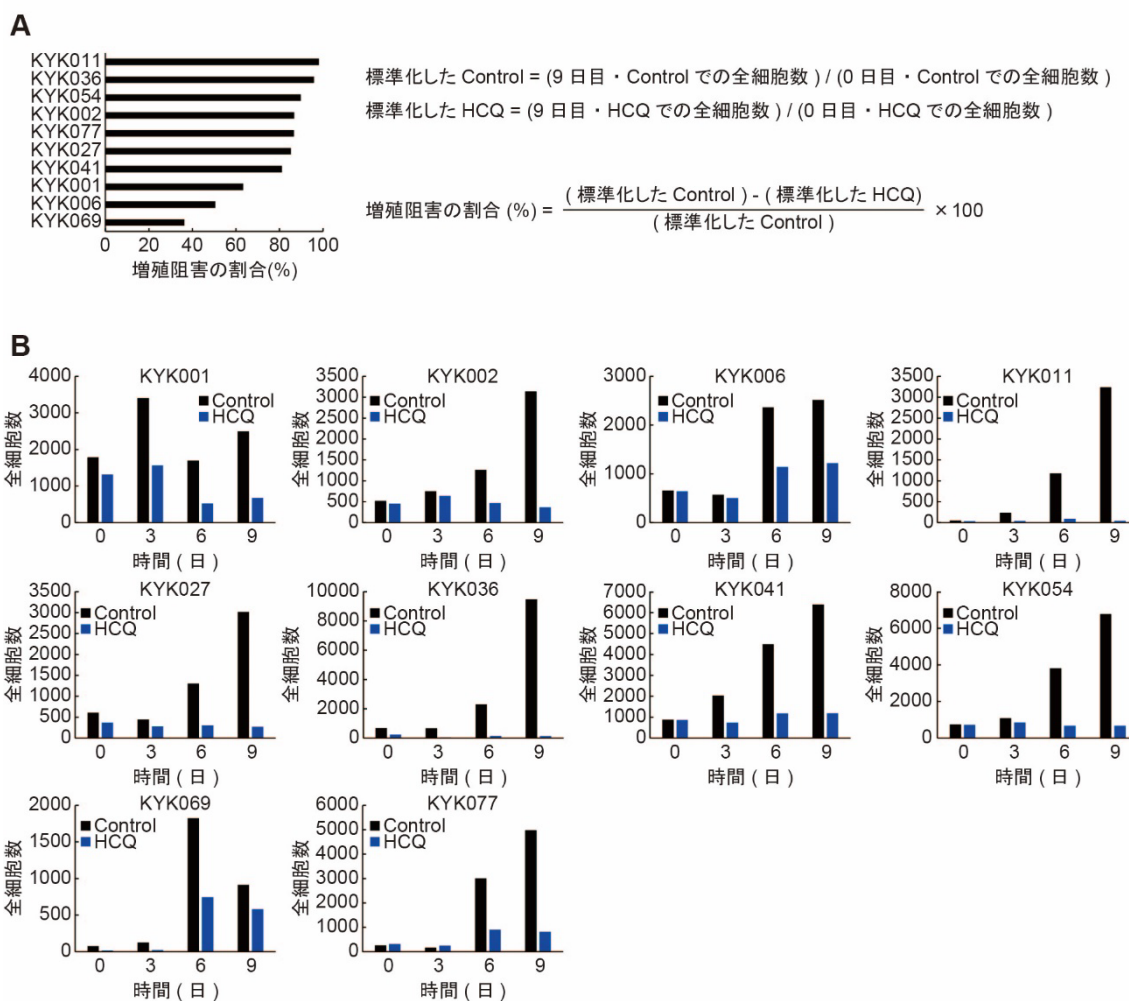


図 30. オートファジー阻害剤添加による増殖抑制

- (A) 10 種類のオルガノイド株における、オートファジー阻害剤による増殖阻害の割合。右に計算式を記した。(n = 1)
- (B) ミリ Q 水添加培地またはオートファジー阻害剤添加培地で培養したオルガノイドの全細胞数。0 日目（播種日）、3 日目、6 日目、9 日目に観察を行った。それぞれ 0 日目と 3 日目、6 日目と 9 日目が同じウェルを観察している。ミリ Q 水添加培地（黒色）、オ

ートファジー阻害剤添加培地（青色）。(n = 1)

6-2. ヒドロキシクロロキンは AMPK 活性を抑制する

続いて、HCQ 添加時の AMPK 活性を評価した。HCQ 添加後 45 分の時点では、AMPK 活性への影響にはばらつきが観察された（図 31A）。しかし、13 日目には、すべてのオルガノイド株において AMPK 活性が抑制されていることが判明した（図 31B）。0 日目と 9 日目のデータを使って算出した結果、AMPK 活性抑制率は 2.8%~27.4%とばらつきがあった（図 31C）。また、AMPK 活性の時系列データを評価したところ、すべてのオルガノイド株に共通して、経時的に HCQ 添加群の AMPK 活性が減少する傾向が認められた（図 32A、図 32B）。HCQ 処理下で生存したオルガノイドの AMPK 活性低下は、増殖抑制が AMPK 活性の減少に起因し、HCQ への抵抗性が AMPK の下流で生じる可能性を示唆している（図 31B）。HCQ 条件下で大型オルガノイドが形成されなかったこと、および大多数のオルガノイド株で後期に AMPK 活性が抑制されていることは、AMPK 活性がオルガノイド増殖後期に重要な役割を果たしていることを支持する結果となった。

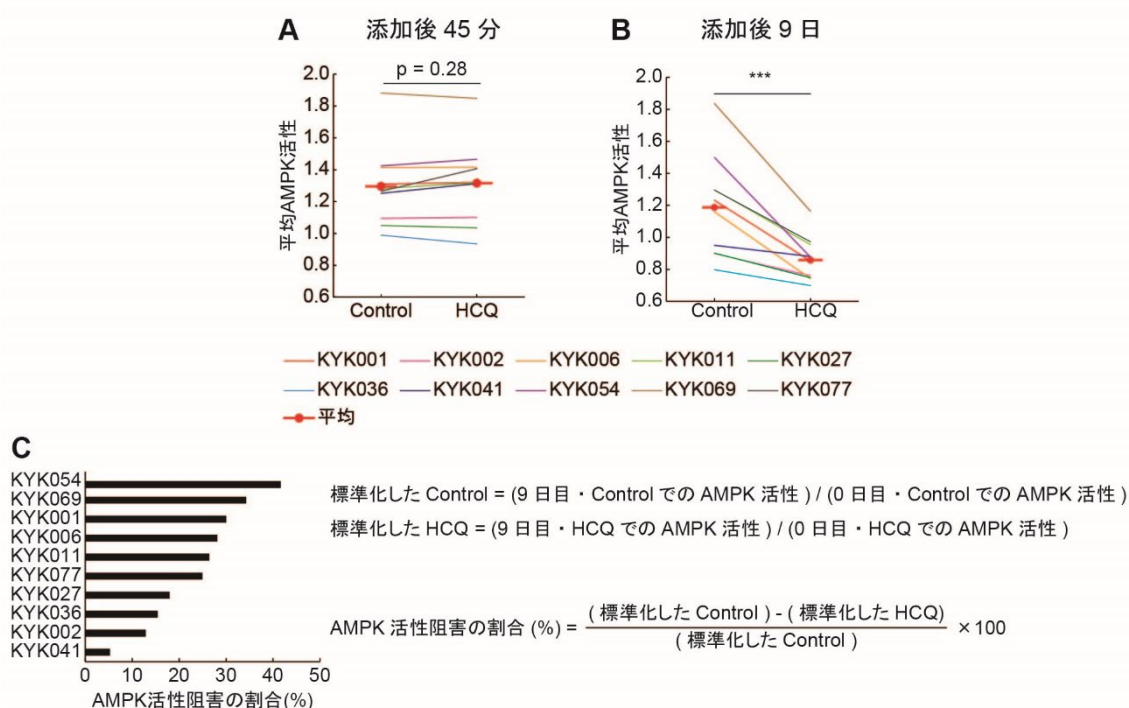


図 31. オートファジー阻害剤添加時の AMPK 活性

- (A) 10 種類のオルガノイド株における薬剤添加後 45 分の平均 AMPK 活性。(n = 1)
- (B) 10 種類のオルガノイド株における薬剤添加後 13 日の平均 AMPK 活性。(n = 1)
- (C) 10 種類のオルガノイド株における、オートファジー阻害剤添加時の AMPK 活性阻害の割合。計算式は右に記した。(n = 1)

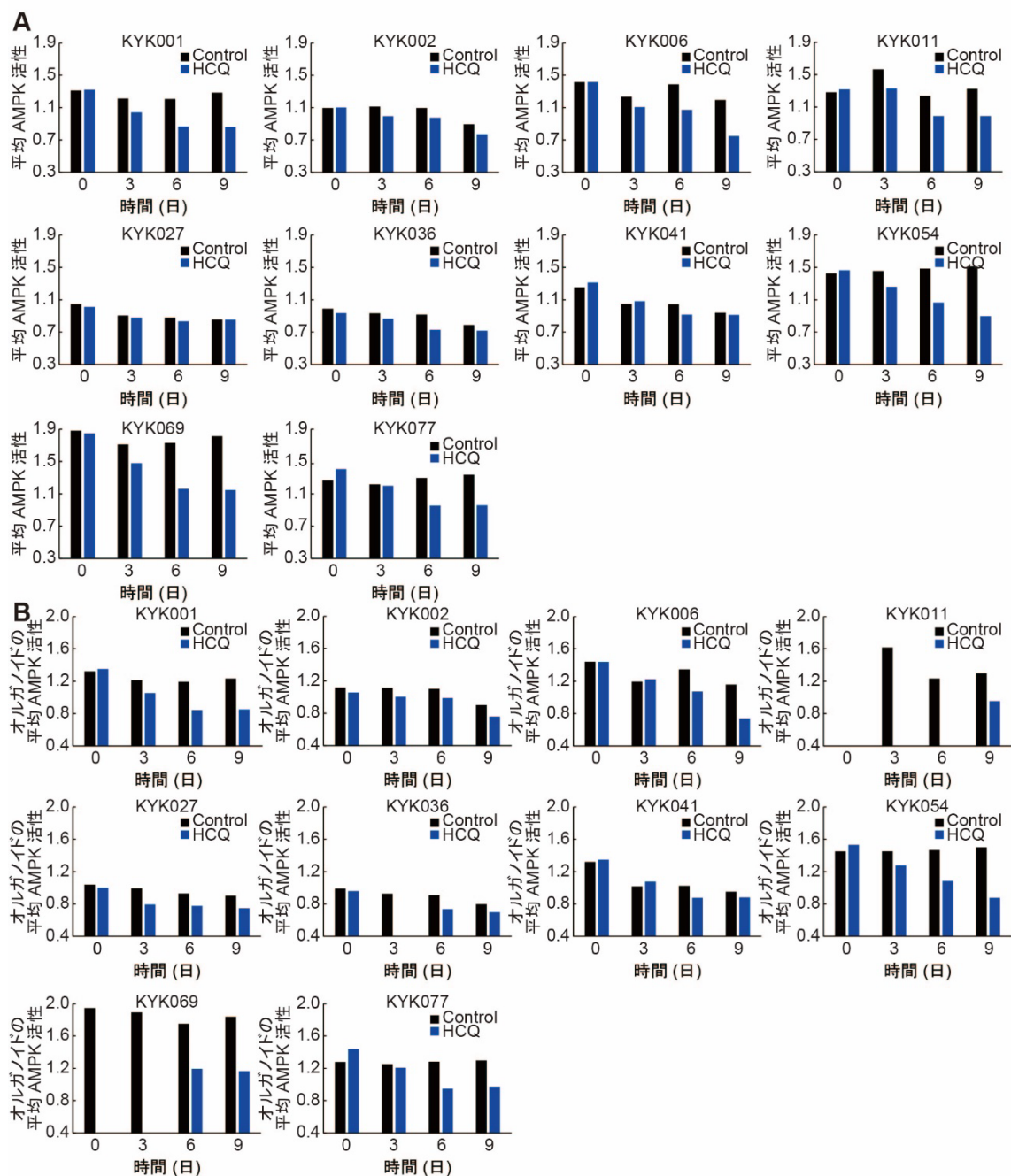


図 32. オートファジー阻害剤添加時の時系列情報を含んだ AMPK 活性

- (A) ミリ Q 水添加培地またはオートファジー阻害剤添加培地で培養したオルガノイドの全細胞における平均 AMPK 活性。0 日目（播種日）、3 日目、6 日目、9 日目に観察を行った。それぞれ 0 日目と 3 日目、6 日目と 9 日目が同じウェルを観察している。ミリ Q 水添加培地（黒色）、オートファジー阻害剤添加培地（青色）。(n = 1)
- (B) ミリ Q 水添加培地またはオートファジー阻害剤添加培地で培養したオルガノイドの全オルガノイドにおける平均 AMPK 活性。0 日目（播種日）、3 日目、6 日目、9 日目に観

察を行った。それぞれ 0 日目と 3 日目、6 日目と 9 日目が同じウェルを観察している。
ミリ Q 水添加培地（黒色）、オートファジー阻害剤添加培地（青色）。(n = 1)

6-3. ヒドロキシクロロキンは ERK 活性を上昇させる

増殖抑制が AMPK 活性の低下に起因すると考えれば、増殖阻害と AMPK 活性の抑制は正の相関を示すことが予想される。しかし、HCQ 処理による増殖阻害と AMPK 活性の抑制が負の相関を示した（図 33A）。この結果から、AMPK 活性の抑制が他のシグナル伝達経路に影響を与え、その結果として HCQ の増殖抑制効果を減弱させる可能性が示唆された。ゲル全体観察において明らかとなった ERK と AMPK の活性動態の違いを踏まえ、HCQ 処理が ERK 活性に与える影響を検証した。ERK バイオセンサー発現 PDAC 細胞を播種し、6 日目に HCQ 含有培地またはミリ Q 水を添加したコントロール培地に置換した後、6 日目、9 日目、13 日目に二光子顕微鏡観察を実施した（図 33B）。本実験では、オルガノイド株として KYK011 を使用した。薬剤添加後 45 分の時点で、HCQ 処理により ERK 活性が有意に増加した（図 33C）。一方、薬剤添加後 7 日目（播種から 13 日目）においては、コントロールと HCQ 処理で同程度の ERK 活性を示した（図 33D）。これらの結果は、オルガノイド増殖の初期段階において HCQ が ERK 活性を増加させることを示唆している。この知見は、ゲル全体観察においてオルガノイド増殖の比較的初期段階における ERK の関与が示唆されていたことと一致し、増殖初期において ERK 活性が上昇しやすい可能性を裏付けている。対照的に、オルガノイド増殖後期では、ERK 活性への依存性が減少するため、HCQ による ERK 活性の上昇が起こりにくいと考えられる。まとめると、増殖初期段階において、活性化した ERK 活性が HCQ 処理による増殖阻害を減弱させている可能性が示唆された。



図 33. オートファジー阻害剤添加時の ERK 活性

- (A) 増殖阻害の割合（図 31A）と AMPK 活性阻害の割合（図 32C）の相関。(n = 1)
 (B) オートファジー阻害剤を ERK バイオセンサー発現オルガノイドに添加する実験の概要図。
 (C) 薬剤添加後 45 分の平均 ERK 活性（6 日目の撮影）。(Control: n = 1660, HCQ: n = 1617)
 (D) 薬剤添加後 7 日の平均 ERK 活性（13 日目の撮影）。(Control: n = 6295, HCQ: n = 5356)

7. ERK シグナル伝達経路とオートファジー経路の同時阻害

7-1. MEK 阻害剤とヒドロキシクロロキンの併用療法は2つのオルガノイド株で高い細胞増殖抑制効果を示した

MEK 阻害剤とオートファジー阻害剤の薬剤応答の差異を踏まえ、PD0325901 と HCQ の併用療法の効果を検証した。PDAC オルガノイドを6日間培養し、成長したオルガノイドに対する薬剤応答を検討した。PDAC オルガノイドは(1) ミリ Q 水と DMSO を含むコントロール、(2) PD0325901、(3) HCQ、または(4) PD03025901 と HCQ のコンビネーションで処理し、共焦点顕微鏡によるイメージング解析を行った。その結果、全細胞数(図 34A)、オルガノイド数(図 34B)、および最大オルガノイドの細胞数(図 34C)において、PD0325901 または HCQ 単剤療法と比較して、併用療法は KYK001 と KYK027 で最も強い増殖抑制効果を示した。一方、その他の過半数のオルガノイド株では、併用療法は単剤療法と同程度の増殖抑制効果を示すにとどまった。なお、KYK069 細胞は本研究中に増殖能を喪失したため、観察対象から除外された。薬剤併用の効果は、一般的に相加効果(各薬剤の効果の和に相当)と相乗効果(相加効果を上回る効果)に分類される。本研究における併用療法の効果は相加効果に達しなかったことから、両薬剤が部分的に互いの効果を相殺している可能性が示唆された。しかしながら、KYK001 と KYK027 においては、この相殺作用にもかかわらず、併用療法が最も効果的な増殖抑制をもたらしたと考えられる。

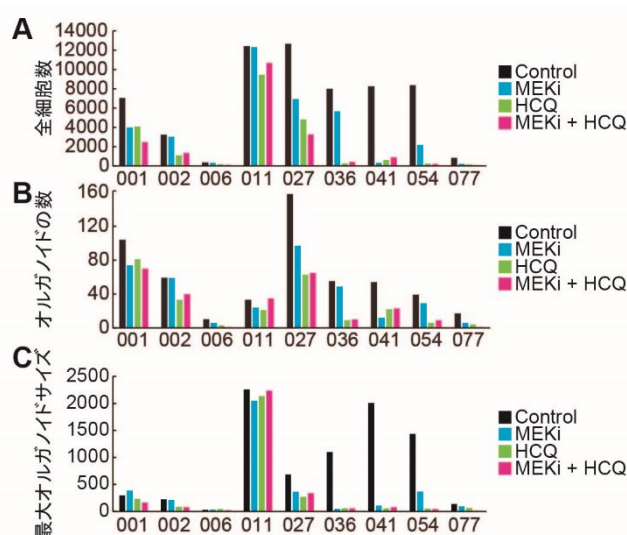


図 34. MEK 阻害剤とオートファジー阻害剤による併用療法下のオルガノイド増殖

(A) 13 日目 (薬剤添加後 7 日) における全細胞数の比較。(n = 1)

(B) 13 日目 (薬剤添加後 7 日) におけるオルガノイドの数の比較。(n = 1)

(C) 13 日目 (薬剤添加後 7 日) における最大オルガノイドサイズの比較。(n = 1)

空間マッピング解析では、KYK011 と KYK027 を除く大部分のオルガノイド株において、併用療法による有意な増殖抑制効果が示された（図 35）。また、単剤療法の有効性はオルガノイド株によって異なっていた（図 34A-C）。例えば、KYK001、KYK006 および KYK077 は、PD0325901 と HCQ で同程度の増殖阻害を示した。一方、KYK002、KYK011、KYK036、および KYK054 は、HCQ が PD0325901 よりも高い有効性を示した。これらの結果は、併用療法が、単剤療法に対する反応の異なる多様なオルガノイド株に対して高い治療効果を発揮することを示唆している。

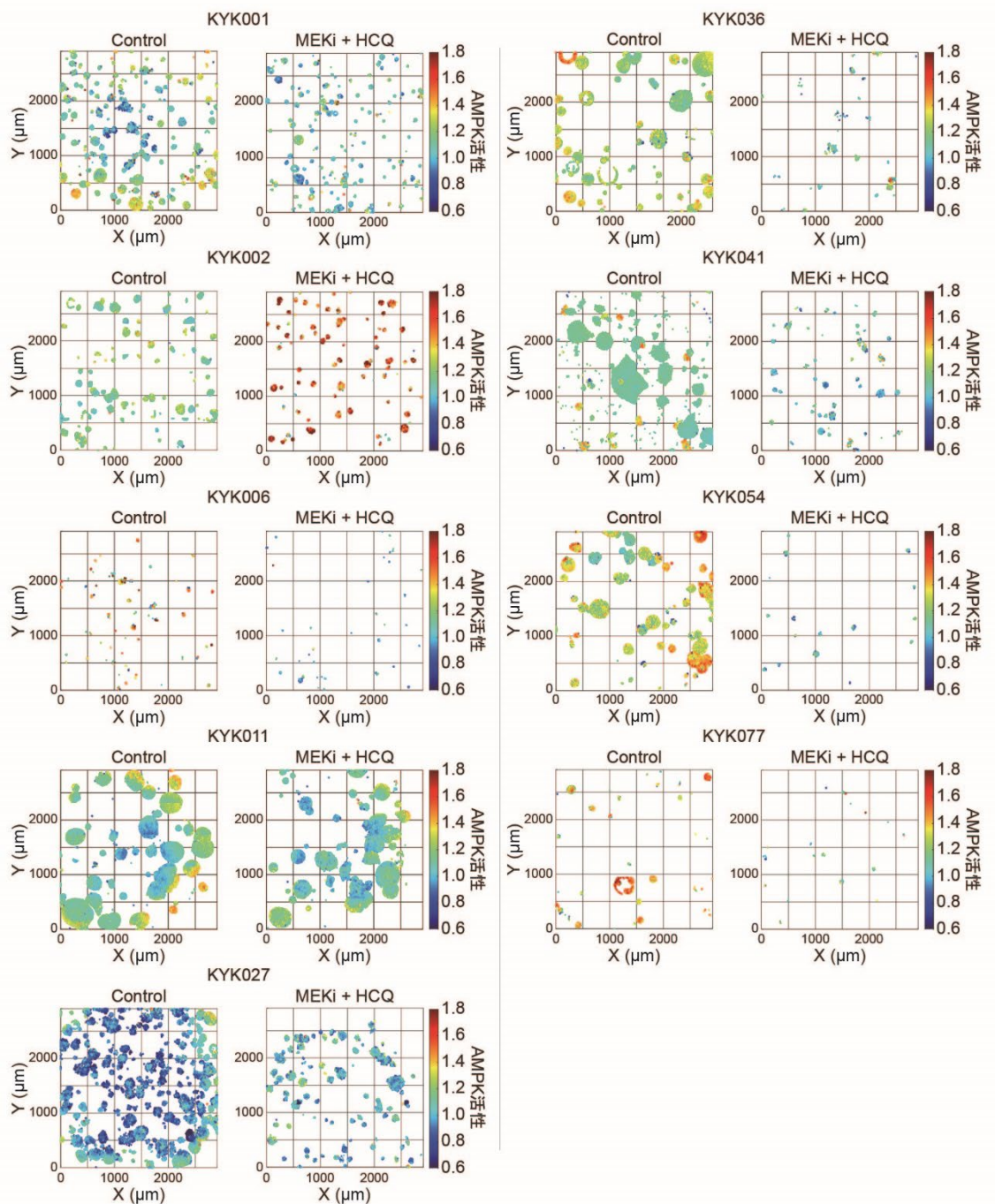


図 35. MEK 阻害剤とオートファジー阻害剤による併用療法下の空間分布と AMPK 活性
 13 日目（薬剤添加後 7 日）における細胞の空間分布と AMPK 活性。5×5 視野で撮影した。一つひとつの点はシングルセルを示している。点が集まった部分がオルガノイドとなる。点の色は細胞の AMPK 活性を示している。赤いと AMPK 活性が高く、青いと AMPK 活性が低い。各オルガノイドについて、コントロール（左）、MEK 阻害剤とオートファジー阻害剤による併用療法（右）。(n = 1)

続いて、薬剤添加0日目（播種後6日目）から9日目（播種後13日目）までの時系列データを含めた薬剤応答を評価した。KYK001を除くすべてのオルガノイド株において、併用療法下で細胞数の増加が抑制された（図36）。PD0325901やHCQ単剤療法と比較して、併用療法は持続的な細胞増殖抑制効果を示し、その有効性が示された。

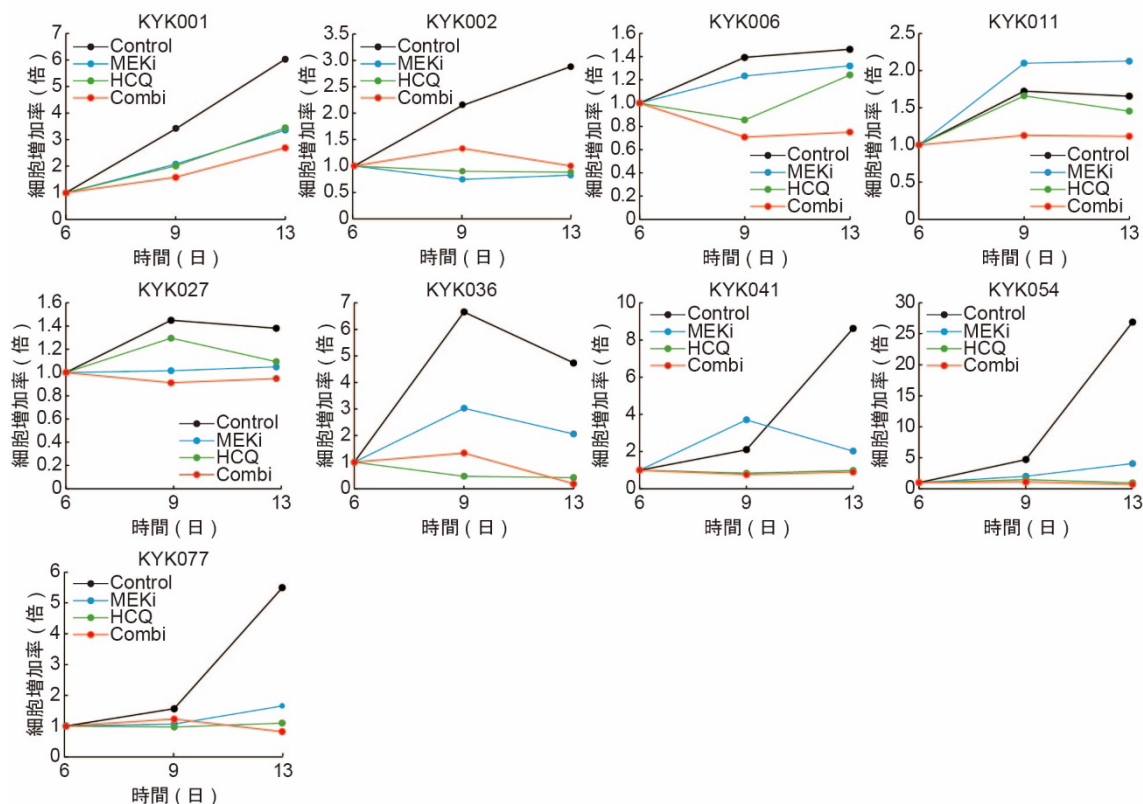


図 36. MEK 阻害剤とオートファジー阻害剤による併用療法下の増殖抑制

コントロール培地またはMEK阻害剤とオートファジー阻害剤の併用添加培地で培養したオルガノイドの細胞増加率。6日目、9日目、13日目に観察を行った。6日目の細胞数を1.0とした。コントロール（黒色）、MEK阻害剤（青色）、オートファジー阻害剤（緑色）、併用療法（赤色）。(n = 1)

7-2. 併用療法は細胞死を誘導する

別の指標で治療効果を評価するため、薬物添加後7日（播種後13日）における細胞死を検出した。併用療法では細胞死の割合が最も高く、80%に達した（図37A）。対照的に、PD0325901は最も低い細胞死の割合を示した。PD0325901を除去した後もPDAC細胞が増殖可能であること（図27B）と併せて考察すると、PD0325901は細胞増殖を抑制してもPDAC細胞の細胞死を誘導していないことが明らかになった。HCQは約40%の細胞死を誘導した。コントロールで高い細胞死の割合が観察されたが、これは過度な成長によりオルガノイド内で細胞が過密状態となり、細胞死が誘発されたためと考えられる。

続いて、薬剤治療が細胞死を誘導したかどうかについて画像を通じて判定した。HCQ 添加および併用療法を受けたオルガノイドは凝集体を形成し、明確な細胞死の兆候が認められた (図 37B)。一方、PD0325901 はオルガノイドの増殖を抑制したものの、細胞死を効果的に誘導することはできなかった。したがって、併用療法の細胞死に対する効果は HCQ 由来であり、PD0325901 と HCQ の併用療法は、単剤療法と比較してより効率的に PDAC 細胞の細胞死を誘導することが明らかになった。

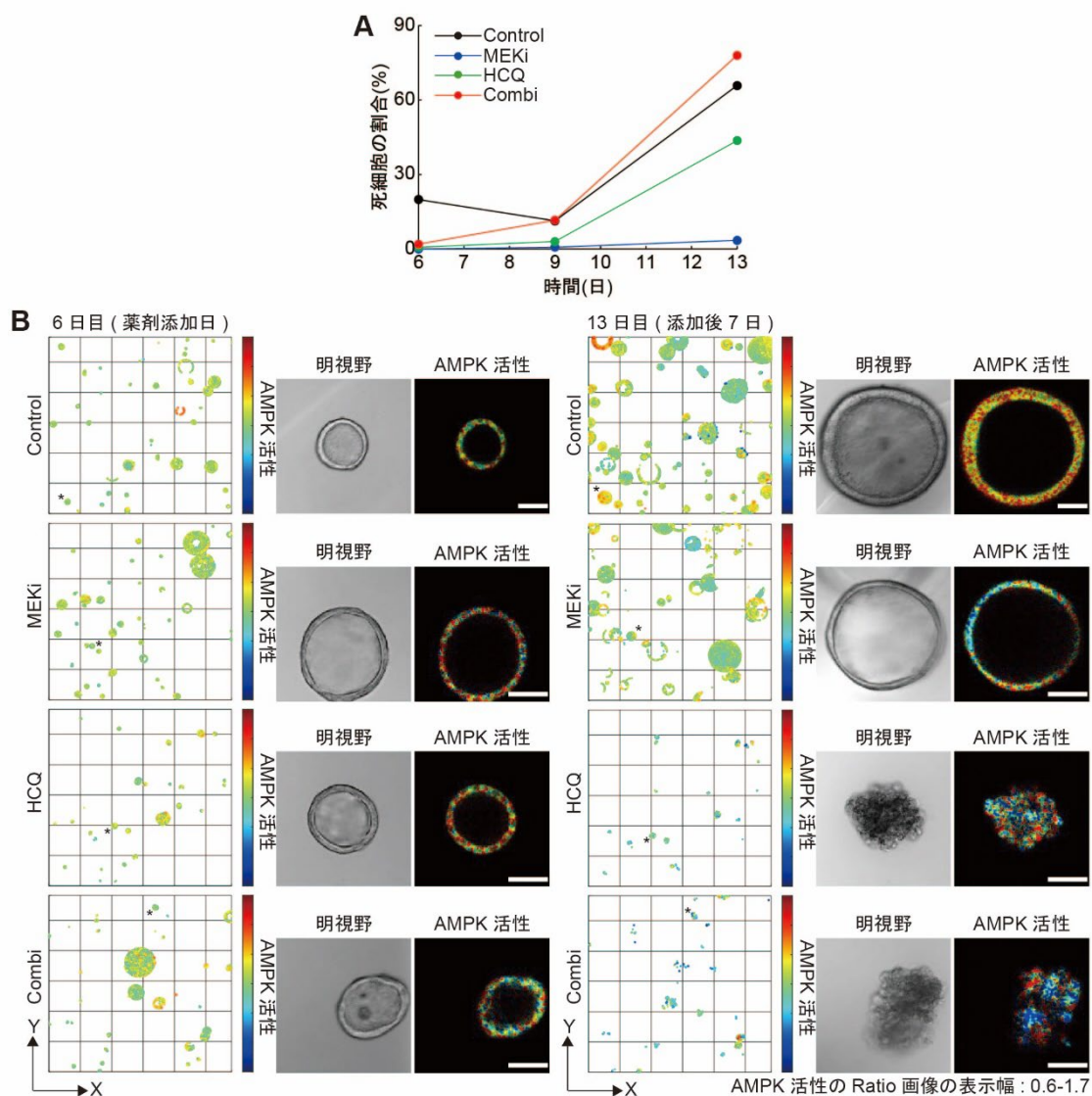


図 37. MEK 阻害剤とオートファジー阻害剤による併用療法による細胞死誘導

(A) 薬剤添加時の死細胞の割合 (KYK041)。6日目、9日目、13日目に観察を行った。コントロール (黒色)、MEK 阻害剤 (青色)、オートファジー阻害剤 (緑色)、併用療法 (赤色)。(n = 1)

(B) 細胞分布上でアスタリスクをつけたオルガノイドの明視野と AMPK 活性 (KYK036)。6 日目 (薬剤添加日) が左半分、13 日目 (薬剤添加後 7 日) が右半分。上から、コントロール、MEK 阻害剤、オートファジー阻害剤、併用療法。色は AMPK 活性を示している。赤いと AMPK 活性が高く、青いと AMPK 活性が低い。スケールバー: 50 μm 。

7-3. 併用療法において AMPK 活性の抑制効果が減弱する

併用療法実験における AMPK 活性を評価した。併用療法時の AMPK 活性は、多くのオルガノイド株で低下する一方、一部のオルガノイド株では上昇が観察された (図 38A)。HCQ 単剤療法で見られたような急激な AMPK 活性の減少は認められず (図 31B)、これにより PD0325901 による MEK 阻害が AMPK の活性化を誘導している可能性が示唆された。ERK から AMPK への制御システムを理解するため、播種後 6 日目の AMPK バイオセンサー発現 PDAC オルガノイドに PD0325901 を添加し、観察を行った。その結果、6 つの PDAC オルガノイド株 (KYK002、KYK006、KYK011、KYK027、KYK054、KYK077) においては、PD0325901 が AMPK 活性を上昇させることが明らかになった (図 38B)。対照的に、KYK001 と KYK036 は、PD0325901 添加による AMPK 活性への影響が軽微であった。さらに、KYK041 では PD0325901 が AMPK 活性を低下させるという、他のオルガノイド株とは異なる挙動を示した。これら結果は、オルガノイド株によって ERK と AMPK の制御機構が異なることを示唆している。まとめると、本研究で対象としたオルガノイド株のうち過半数において、ERK が AMPK を負に制御する機構が働いており、この機構が HCQ による AMPK 活性抑制効果を減弱させている可能性が示唆された。

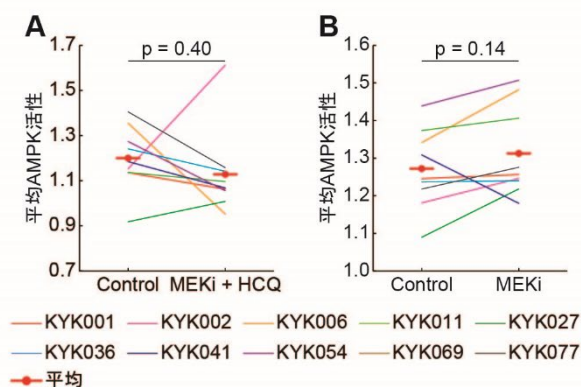


図 38.併用療法における AMPK 活性への影響

- (A) コントロールと併用療法における、薬剤添加後 7 日 (13 日目の撮影) の平均 AMPK 活性の比較。 (n = 1)
- (B) コントロール培地または MEK 阻害剤添加培地の添加後 45 分 (6 日目の撮影) の平均 AMPK 活性。 (n = 1)

考察

不均一性を理解するシングルセルイメージングの包括的解析

がんの不均一性は、薬剤耐性、再発、転移の主要な要因となり、臨床上大きな課題となっている[23]。患者由来オルガノイドは、原発腫瘍のゲノムおよびトランスクリプトーム情報と病理学的特徴を忠実に反映することから、患者特異的な不均一性を再現する有力な手段として注目されている[7, 8]。がんの不均一性をより深く理解するため、シングルセル RNA-seq などの包括的なシングルセル解析が精力的に活用されてきた[26, 32-34]。本研究では、薬物応答の経時的变化を検出することを目的にライブイメージングを採用した。従来のライブイメージングが抱える低スループットの課題を克服するため、ゲル全体観察を導入し、シングルセルレベルの包括的解析を実現した。このアプローチにより、10 種類のオルガノイド株における空間的な増殖パターン、ERK 活性、AMPK 活性に関する多次元的不均一性が明らかとなった。本研究では患者検体における ERK 活性や AMPK 活性の不均一性を観察していないため、生体内の不均一性の再現度合いには疑問が残る。しかし、臨床の患者組織を反映すると報告されている患者由来オルガノイドにおけるシグナル活性の不均一性の理解が今後の治療方法の発展に繋がることを期待する。

オルガノイドを用いたがんの不均一性の包括的評価は、膵管腺がんにとどまらず、他のがん種への応用が期待される。さらに、より広い観点から見れば、腫瘍微小環境もがんの不均一性の重要な側面である。腫瘍微小環境は、がん細胞のみならず間質細胞や免疫細胞が複雑に存在し、相互作用を繰り返す場である。既に、オルガノイド、間質細胞、免疫細胞の 3 次元共培養技術により、腫瘍微小環境の再現が可能となっている[96, 97]。本研究で実施した包括的なシングルセル解析は、がん細胞のみならず腫瘍微小環境における不均一性の評価にも有用であり、今後のさらなる発展が期待される。

PDAC オルガノイドにおける ERK と AMPK の不均一性

本研究は、包括的ライブイメージングを通じて、PDAC オルガノイドにおける ERK と AMPK の不均一性を示した。ゲル全体観察の結果、ERK 活性の不均一性がオルガノイド株で異なることが判明した。乳がん研究においても ERK 活性の不均一性が報告されており、ERK 活性の低い細胞は、高いがん幹細胞マーカーの発現と優れた腫瘍形成能を示すことが明らかになっている[98]。このように、本研究で観察された ERK 活性の不均一性は、がん細胞の生存戦略の一つとして、腫瘍の高い増殖能を誘導する可能性が示唆された。一方、AMPK の不均一性はヒト腫瘍において観察されているものの、これまで定量的に評価されていなかった[99]。本研究による AMPK 活性の定量解析の結果、ERK 活性と同様に PDAC オルガノイドにおける AMPK 活性の不均一性が明らかになった。AMPK の不均一性の生物学的意義については、いまだ不明な点が多く、シグナル活性の不均一性に関する

さらなる議論が求められる。

PDAC における ERK シグナル伝達経路と AMPK-オートファジーシグナル伝達経路の併用療法

近年、ERK シグナル伝達経路と AMPK-オートファジーシグナル伝達経路の阻害剤を併用する治療戦略が注目を集めている。MEK 阻害剤と HCQ の併用療法は、PDAC 細胞株およびマウスモデルにおいてその有用性が示唆されており[84]、実際に 2 名の患者で病勢安定化が報告されている[85]。さらに、PDAC において ERK 阻害がオートファジーへの依存性を高めることが示唆されており、ERK 阻害剤と HCQ の併用療法の PDAC 細胞株における有効性が検証されている[82]。MEK 阻害剤と AMPK 阻害剤の併用療法においても、PDAC 細胞株レベルで相乗効果が報告されている[100]。臨床現場では患者ごとに薬剤応答が異なるため、患者の不均一性をより反映した知見が求められていた。

本研究は、患者由来 PDAC オルガノイドを用いて、ERK シグナル伝達経路と AMPK-オートファジーシグナル伝達経路の併用阻害の有効性を 2 つのオルガノイド株で実証した。一方で、過半数のオルガノイド株では単剤療法と同程度の増殖阻害にとどまり、KYK011 のように薬剤効果が限定的な株も観察された。また、併用療法の効果は相加効果に達しなかったことから、両薬剤がお互いの効果を部分的に相殺している可能性が示唆された。本研究の限界として、10 種類のオルガノイド株では、全患者のプロファイルを網羅することは不可能であり、検体数の低さが課題として挙げられる。今後、多検体を高速で観察可能な顕微鏡技術を活用することで、より一般化した結果を得られると期待される。その結果をもとに検体患者の予後推移との関連を調査することで、オルガノイドにおける臨床応答の再現性を評価することも可能となる。さらに、将来的に個別化治療を実現するためには、患者のゲノム・トランスクリプトームプロファイルと薬剤応答の関係を詳細に調査する必要がある。本研究における患者由来 PDAC オルガノイドでの併用療法の有効性の実証は、前臨床研究における貴重な知見であり、個別化医療への重要な第一歩となるものと考えられる。

ERK と AMPK のクロストークに基づいた併用療法の評価

本研究により、ERK と AMPK の間に 2 種類のクロストークが示唆された。ゲル全体観察の結果、平均 ERK 活性と平均 AMPK 活性に逆相関が観察された。さらに、大きいオルガノイドでは ERK 活性が低く、AMPK 活性が高い傾向が認められた。これらの結果から、ERK と AMPK が逆の挙動を示すこと、そして、オルガノイド増殖初期では ERK への依存性が高まり、オルガノイド増殖後期では AMPK 活性への依存性が高まるという時間依存的な活性変化の存在が示唆された。併用療法における効果増強のメカニズムの一つとして、この活性依存性の変化が寄与していると考えられる。初期段階で依存性の高い ERK

と、後期段階で依存性の高い AMPK を長期的に抑制することで、治療効果が増強したと推察される。

薬剤添加実験の結果、KYK011 において HCQ の添加により ERK 活性が増加し、ERK と AMPK のクロストークが示唆された。メラノーマ研究において AMPK 活性化が ERK 活性を抑制する報告があり、AMPK が ERK を抑制的に制御するという点で既報と一致している[101]。一方、MEK 阻害剤の添加時の AMPK 活性の変動は、オルガノイド株によって多様であった。既存の文献においても、ERK から AMPK への制御に関する報告は一貫していない。MEK 阻害が AMPK シグナル伝達経路を活性化するという報告[84, 102, 103]と合致し、本研究の 6 つの PDAC オルガノイド株 (KYK002、KYK006、KYK011、KYK027、KYK054、KYK077) において MEK 阻害剤の添加により AMPK 活性が上昇した。一方で、MEK 阻害剤により AMPK 活性が減少するという相反する報告も存在し[104]、本研究の KYK041 においてもそれに類似した結果が得られた。

これらの ERK と AMPK のクロストークが併用療法の効果増強に関与すると考えられるが、クロストークのみで併用療法の薬効を完全に説明することには限界がある。例えば、KYK011 は HCQ の添加により ERK 活性が上昇し、MEK 阻害剤添加により AMPK 活性が上昇する。両シグナル伝達経路の同時抑制にもかかわらず、併用療法の効果は限定的であった。近年、ERK 活性を減少させる従来の治療戦略に加え、ERK 活性を過剰に増加させることでがん細胞死を誘導する新たな戦略も報告されている[105]。シグナル活性の制御戦略は、今後さらなる探求が必要な研究領域である。本研究では、シグナル活性の抑制戦略を採用したが、オルガノイド株 (患者) によっては、シグナル活性の制御戦略を最適化する必要が示唆された。また、細胞内では無数のシグナル伝達分子が相互に作用し、細胞の挙動を決定していることを考慮すると、ERK と AMPK に限定されない、より包括的なシグナル伝達の調査が不可欠である。

謝辞

本研究を進めるにあたり、多くのご支援とご指導を賜りました京都大学大学院生命科学
研究科 生体制御学分野 松田道行教授、細胞周期学分野 青木一洋教授に心より感謝申し
上げます。地方独立行政法人大阪府立病院機構大阪国際がんセンター 研究所 腫瘍増殖制
御学部 主任研究員 平塚徹先生には直接のご指導を賜り、また定量的データ解析において
並々ならぬご尽力を賜り深く感謝申し上げます。また、日々の研究生活の中で多くの議論
を交わしてくださいました生体制御学研究室、細胞周期学研究室の皆様にも深く感謝致し
ます。

患者由来 PDAC オルガノイドの作製にご尽力いただきました、エーザイ株式会社筑波
研究所 待永明仁様、京都大学大学院医学研究科 消化器内科学 特定准教授 垣内伸之先
生、京都大学大学院医学研究科 腫瘍生物学 小川誠司教授、京都大学大学院医学研究科
消化器内科学 妹尾浩教授、また議論を交わしてくださいました大阪国際がんセンター 腫
瘍増殖制御学部 東山繁樹部長に感謝申し上げます。

オルガノイドの培養をサポートしてくださいました大阪大学大学院 医学系研究科 連携
大学院 分子腫瘍医学 叶 華沢様、ERK バイオセンサーの評価を行ってくださいました大
阪大学大学院 医学系研究科 連携大学院 分子腫瘍医学 張 偉生様、技術面や研究室生活
のサポートをしてくださいました高倉加奈子様、平野鏡子様、平尾真理佳様、上杉知子様
に感謝申し上げます。本研究は、京都大学大学院 生命科学研究科 生命動態共用研究施設
の顕微鏡を用いて行われました。施設の運営に携わられている松田道行教授、青木一洋教
授、高倉加奈子様に改めてお礼申し上げます。

研究遂行にあたり、京都大学大学院教育支援機構 SPRING プログラムのご支援を賜り
ましたこと、心より感謝申し上げます。最後に、これまで私を支えてくださいました家
族、友人の皆様にも感謝申し上げます。

塚本 祥子

連絡先：tsukamoto.shoko.36x@st.kyoto-u.ac.jp

本学位論文は以下の学術論文に基づいて書かれたものである。

Shoko Tsukamoto, Ye Huaze, Zhang Weisheng, Akihito Machinaga, Nobuyuki Kakiuchi,
Seishi Ogawa, Hiroshi Seno, Shigeki Higashiyama, Michiyuki Matsuda, and Toru Hiratsuka
Quantitative live imaging reveals phase dependency of PDAC patient-derived organoids on
ERK and AMPK activity
Cancer Science, in press, 2025

参考文献

1. Casolino, R., et al., *Reshaping preoperative treatment of pancreatic cancer in the era of precision medicine*. Ann Oncol, 2021. **32**(2): p. 183-196.
2. Siegel, R.L., et al., *Cancer statistics, 2023*. CA Cancer J Clin, 2023. **73**(1): p. 17-48.
3. Park, M., et al., *Drug approval prediction based on the discrepancy in gene perturbation effects between cells and humans*. EBioMedicine, 2023. **94**: p. 104705.
4. Wood, L.D., et al., *Pancreatic Cancer: Pathogenesis, Screening, Diagnosis, and Treatment*. Gastroenterology, 2022. **163**(2): p. 386-402.e1.
5. Hyun, S. and D. Park, *Challenges in genomic analysis of model systems and primary tumors of pancreatic ductal adenocarcinoma*. Comput Struct Biotechnol J, 2022. **20**: p. 4806-4815.
6. Ben-David, U., et al., *Patient-derived xenografts undergo mouse-specific tumor evolution*. Nat Genet, 2017. **49**(11): p. 1567-1575.
7. Gong, M., et al., *Establishment of organoid models for pancreatic ductal adenocarcinoma and screening of individualized therapy strategy*. Animal Model Exp Med, 2023. **6**(5): p. 409-418.
8. Romero-Calvo, I., et al., *Human Organoids Share Structural and Genetic Features with Primary Pancreatic Adenocarcinoma Tumors*. Mol Cancer Res, 2019. **17**(1): p. 70-83.
9. Grossman, J.E., et al., *Organoid Sensitivity Correlates with Therapeutic Response in Patients with Pancreatic Cancer*. Clin Cancer Res, 2022. **28**(4): p. 708-718.
10. Bleijs, M., et al., *Xenograft and organoid model systems in cancer research*. Embo j, 2019. **38**(15): p. e101654.
11. Kopper, O., et al., *An organoid platform for ovarian cancer captures intra- and interpatient heterogeneity*. Nat Med, 2019. **25**(5): p. 838-849.
12. Tiriach, H., et al., *Organoid Profiling Identifies Common Responders to Chemotherapy in Pancreatic Cancer*. Cancer Discov, 2018. **8**(9): p. 1112-1129.
13. Driehuis, E., et al., *Pancreatic cancer organoids recapitulate disease and allow personalized drug screening*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2019. **116**(52): p. 26580-26590.
14. Yoshida, G.J., *Applications of patient-derived tumor xenograft models and tumor organoids*. J Hematol Oncol, 2020. **13**(1): p. 4.
15. Choi, S.I., et al., *Development of Patient-Derived Preclinical Platform for Metastatic Pancreatic Cancer: PDOX and a Subsequent Organoid Model System Using Percutaneous Biopsy Samples*. Front Oncol, 2019. **9**: p. 875.
16. Frappart, P.O., et al., *Pancreatic cancer-derived organoids - a disease modeling tool*

- to predict drug response*. United European Gastroenterol J, 2020. **8**(5): p. 594-606.
17. Seppälä, T.T., et al., *Patient-derived Organoid Pharmacotyping is a Clinically Tractable Strategy for Precision Medicine in Pancreatic Cancer*. Ann Surg, 2020. **272**(3): p. 427-435.
 18. Raimondi, G., et al., *Patient-derived pancreatic tumour organoids identify therapeutic responses to oncolytic adenoviruses*. EBioMedicine, 2020. **56**: p. 102786.
 19. Gendoo, D.M.A., et al., *Whole genomes define concordance of matched primary, xenograft, and organoid models of pancreas cancer*. PLoS Comput Biol, 2019. **15**(1): p. e1006596.
 20. Dang, H.X., et al., *The clonal evolution of metastatic colorectal cancer*. Sci Adv, 2020. **6**(24): p. eaay9691.
 21. Saito, Y., et al., *Establishment of Patient-Derived Organoids and Drug Screening for Biliary Tract Carcinoma*. Cell Rep, 2019. **27**(4): p. 1265-1276.e4.
 22. Phan, N., et al., *A simple high-throughput approach identifies actionable drug sensitivities in patient-derived tumor organoids*. Commun Biol, 2019. **2**: p. 78.
 23. Marusyk, A., M. Janiszewska, and K. Polyak, *Intratumor Heterogeneity: The Rosetta Stone of Therapy Resistance*. Cancer Cell, 2020. **37**(4): p. 471-484.
 24. Cros, J., et al., *Tumor Heterogeneity in Pancreatic Adenocarcinoma*. Pathobiology, 2018. **85**(1-2): p. 64-71.
 25. Moffitt, R.A., et al., *Virtual microdissection identifies distinct tumor- and stroma-specific subtypes of pancreatic ductal adenocarcinoma*. Nat Genet, 2015. **47**(10): p. 1168-78.
 26. Peng, J., et al., *Single-cell RNA-seq highlights intra-tumoral heterogeneity and malignant progression in pancreatic ductal adenocarcinoma*. Cell Res, 2019. **29**(9): p. 725-738.
 27. Bailey, P., et al., *Genomic analyses identify molecular subtypes of pancreatic cancer*. Nature, 2016. **531**(7592): p. 47-52.
 28. Cancer Genome Atlas Research Network. Electronic address, a.a.d.h.e. and N. Cancer Genome Atlas Research, *Integrated Genomic Characterization of Pancreatic Ductal Adenocarcinoma*. Cancer Cell, 2017. **32**(2): p. 185-203 e13.
 29. Collisson, E.A., et al., *Subtypes of pancreatic ductal adenocarcinoma and their differing responses to therapy*. Nat Med, 2011. **17**(4): p. 500-3.
 30. Hayashi, A., et al., *A unifying paradigm for transcriptional heterogeneity and squamous features in pancreatic ductal adenocarcinoma*. Nat Cancer, 2020. **1**(1): p. 59-74.
 31. Nakamura, T., et al., *Zonal heterogeneity for gene expression in human pancreatic*

- carcinoma*. Cancer Res, 2007. **67**(16): p. 7597-604.
32. Xu, Q., et al., *Single-cell RNA transcriptome reveals the intra-tumoral heterogeneity and regulators underlying tumor progression in metastatic pancreatic ductal adenocarcinoma*. Cell Death Discov, 2021. **7**(1): p. 331.
 33. Mao, Y., et al., *RNA sequencing analyses reveal novel differentially expressed genes and pathways in pancreatic cancer*. Oncotarget, 2017. **8**(26): p. 42537-42547.
 34. Krieger, T.G., et al., *Single-cell analysis of patient-derived PDAC organoids reveals cell state heterogeneity and a conserved developmental hierarchy*. Nat Commun, 2021. **12**(1): p. 5826.
 35. Muta, Y., et al., *Composite regulation of ERK activity dynamics underlying tumour-specific traits in the intestine*. Nat Commun, 2018. **9**(1): p. 2174.
 36. Ponsioen, B., et al., *Quantifying single-cell ERK dynamics in colorectal cancer organoids reveals EGFR as an amplifier of oncogenic MAPK pathway signalling*. Nat Cell Biol, 2021. **23**(4): p. 377-390.
 37. Walsh, A.J., et al., *Optical Imaging of Drug-Induced Metabolism Changes in Murine and Human Pancreatic Cancer Organoids Reveals Heterogeneous Drug Response*. Pancreas, 2016. **45**(6): p. 863-9.
 38. Walsh, A.J., et al., *Quantitative optical imaging of primary tumor organoid metabolism predicts drug response in breast cancer*. Cancer Res, 2014. **74**(18): p. 5184-94.
 39. Jares-Erijman, E.A. and T.M. Jovin, *FRET imaging*. Nat Biotechnol, 2003. **21**(11): p. 1387-95.
 40. Komatsu, N., et al., *Development of an optimized backbone of FRET biosensors for kinases and GTPases*. Mol Biol Cell, 2011. **22**(23): p. 4647-56.
 41. Watabe, T., et al., *Booster, a Red-Shifted Genetically Encoded Förster Resonance Energy Transfer (FRET) Biosensor Compatible with Cyan Fluorescent Protein/Yellow Fluorescent Protein-Based FRET Biosensors and Blue Light-Responsive Optogenetic Tools*. ACS Sens, 2020. **5**(3): p. 719-730.
 42. Aoki, K., et al., *Visualization of growth signal transduction cascades in living cells with genetically encoded probes based on Förster resonance energy transfer*. Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci, 2008. **363**(1500): p. 2143-51.
 43. Miyawaki, A., *Visualization of the spatial and temporal dynamics of intracellular signaling*. Dev Cell, 2003. **4**(3): p. 295-305.
 44. dos Remedios, C.G. and P.D. Moens, *Fluorescence resonance energy transfer spectroscopy is a reliable "ruler" for measuring structural changes in proteins. Dispelling the problem of the unknown orientation factor*. J Struct Biol, 1995. **115**(2):

- p. 175-85.
45. Berney, C. and G. Danuser, *FRET or no FRET: a quantitative comparison*. Biophys J, 2003. **84**(6): p. 3992-4010.
 46. Halbrook, C.J., et al., *Pancreatic cancer: Advances and challenges*. Cell, 2023. **186**(8): p. 1729-1754.
 47. Navas, C., et al., *EGF receptor signaling is essential for k-ras oncogene-driven pancreatic ductal adenocarcinoma*. Cancer Cell, 2012. **22**(3): p. 318-30.
 48. Moore, M.J., et al., *Erlotinib plus gemcitabine compared with gemcitabine alone in patients with advanced pancreatic cancer: a phase III trial of the National Cancer Institute of Canada Clinical Trials Group*. J Clin Oncol, 2007. **25**(15): p. 1960-6.
 49. Wang, X., et al., *Identification of MRTX1133, a Noncovalent, Potent, and Selective KRAS(G12D) Inhibitor*. J Med Chem, 2022. **65**(4): p. 3123-3133.
 50. Lito, P., et al., *Allele-specific inhibitors inactivate mutant KRAS G12C by a trapping mechanism*. Science, 2016. **351**(6273): p. 604-8.
 51. Patricelli, M.P., et al., *Selective Inhibition of Oncogenic KRAS Output with Small Molecules Targeting the Inactive State*. Cancer Discov, 2016. **6**(3): p. 316-29.
 52. Janes, M.R., et al., *Targeting KRAS Mutant Cancers with a Covalent G12C-Specific Inhibitor*. Cell, 2018. **172**(3): p. 578-589.e17.
 53. Blasco, M.T., et al., *Complete Regression of Advanced Pancreatic Ductal Adenocarcinomas upon Combined Inhibition of EGFR and C-RAF*. Cancer Cell, 2019. **35**(4): p. 573-587.e6.
 54. Sinn, M., et al., *CONKO-005: Adjuvant Chemotherapy With Gemcitabine Plus Erlotinib Versus Gemcitabine Alone in Patients After R0 Resection of Pancreatic Cancer: A Multicenter Randomized Phase III Trial*. J Clin Oncol, 2017. **35**(29): p. 3330-3337.
 55. Ostrem, J.M., et al., *K-Ras(G12C) inhibitors allosterically control GTP affinity and effector interactions*. Nature, 2013. **503**(7477): p. 548-51.
 56. Bodoky, G., et al., *A phase II open-label randomized study to assess the efficacy and safety of selumetinib (AZD6244 [ARRY-142886]) versus capecitabine in patients with advanced or metastatic pancreatic cancer who have failed first-line gemcitabine therapy*. Invest New Drugs, 2012. **30**(3): p. 1216-23.
 57. Philip, P.A., et al., *Phase III study comparing gemcitabine plus cetuximab versus gemcitabine in patients with advanced pancreatic adenocarcinoma: Southwest Oncology Group-directed intergroup trial S0205*. J Clin Oncol, 2010. **28**(22): p. 3605-10.
 58. Infante, J.R., et al., *A randomised, double-blind, placebo-controlled trial of trametinib,*

- an oral MEK inhibitor, in combination with gemcitabine for patients with untreated metastatic adenocarcinoma of the pancreas.* Eur J Cancer, 2014. **50**(12): p. 2072-81.
59. Wilson, C.Y. and P. Tolia, *Recent advances in cancer drug discovery targeting RAS.* Drug Discov Today, 2016. **21**(12): p. 1915-1919.
 60. Christensen, J.G., et al., *Targeting Kras(g12c) -mutant cancer with a mutation-specific inhibitor.* J Intern Med, 2020. **288**(2): p. 183-191.
 61. Middleton, G., et al., *Vandetanib plus gemcitabine versus placebo plus gemcitabine in locally advanced or metastatic pancreatic carcinoma (ViP): a prospective, randomised, double-blind, multicentre phase 2 trial.* Lancet Oncol, 2017. **18**(4): p. 486-499.
 62. Patgiri, A., et al., *An orthosteric inhibitor of the Ras-Sos interaction.* Nat Chem Biol, 2011. **7**(9): p. 585-7.
 63. Huang, L., et al., *KRAS mutation: from undruggable to druggable in cancer.* Signal Transduct Target Ther, 2021. **6**(1): p. 386.
 64. Rinehart, J., et al., *Multicenter phase II study of the oral MEK inhibitor, CI-1040, in patients with advanced non-small-cell lung, breast, colon, and pancreatic cancer.* J Clin Oncol, 2004. **22**(22): p. 4456-62.
 65. Van Cutsem, E., et al., *Phase I/II trial of pimasertib plus gemcitabine in patients with metastatic pancreatic cancer.* Int J Cancer, 2018. **143**(8): p. 2053-2064.
 66. Kasuga, A., et al., *A phase I/Ib study of trametinib (GSK1120212) alone and in combination with gemcitabine in Japanese patients with advanced solid tumors.* Invest New Drugs, 2015. **33**(5): p. 1058-67.
 67. Flemington, V., et al., *AZD0364 Is a Potent and Selective ERK1/2 Inhibitor That Enhances Antitumor Activity in KRAS-Mutant Tumor Models when Combined with the MEK Inhibitor, Selumetinib.* Mol Cancer Ther, 2021. **20**(2): p. 238-249.
 68. Yang, S., et al., *Pancreatic cancers require autophagy for tumor growth.* Genes Dev, 2011. **25**(7): p. 717-29.
 69. Fujii, S., et al., *Autophagy is activated in pancreatic cancer cells and correlates with poor patient outcome.* Cancer Sci, 2008. **99**(9): p. 1813-9.
 70. Yang, A., et al., *Autophagy is critical for pancreatic tumor growth and progression in tumors with p53 alterations.* Cancer Discov, 2014. **4**(8): p. 905-13.
 71. Wolpin, B.M., et al., *Phase II and pharmacodynamic study of autophagy inhibition using hydroxychloroquine in patients with metastatic pancreatic adenocarcinoma.* Oncologist, 2014. **19**(6): p. 637-8.
 72. Papandreou, I., et al., *Hypoxia signals autophagy in tumor cells via AMPK activity, independent of HIF-1, BNIP3, and BNIP3L.* Cell Death Differ, 2008. **15**(10): p. 1572-

- 81.
73. Li, J., et al., *Regulation and function of autophagy in pancreatic cancer*. Autophagy, 2021. **17**(11): p. 3275-3296.
74. Xu, C., et al., *Targeting surface nucleolin induces autophagy-dependent cell death in pancreatic cancer via AMPK activation*. Oncogene, 2019. **38**(11): p. 1832-1844.
75. Keerthana, C.K., et al., *The role of AMPK in cancer metabolism and its impact on the immunomodulation of the tumor microenvironment*. Front Immunol, 2023. **14**: p. 1114582.
76. Chang, X., et al., *Glycolysis in the progression of pancreatic cancer*. Am J Cancer Res, 2022. **12**(2): p. 861-872.
77. Hahn, S., et al., *Anti-cancer effects of metformin in a 3D co-culture model of pancreatic ductal adenocarcinoma*. Am J Cancer Res, 2023. **13**(5): p. 1806-1825.
78. Duan, W., et al., *Desmoplasia suppression by metformin-mediated AMPK activation inhibits pancreatic cancer progression*. Cancer Lett, 2017. **385**: p. 225-233.
79. Reni, M., et al., *(Ir)relevance of Metformin Treatment in Patients with Metastatic Pancreatic Cancer: An Open-Label, Randomized Phase II Trial*. Clin Cancer Res, 2016. **22**(5): p. 1076-85.
80. Kordes, S., et al., *Metformin in patients with advanced pancreatic cancer: a double-blind, randomised, placebo-controlled phase 2 trial*. Lancet Oncol, 2015. **16**(7): p. 839-47.
81. Hu, M., et al., *AMPK Inhibition Suppresses the Malignant Phenotype of Pancreatic Cancer Cells in Part by Attenuating Aerobic Glycolysis*. J Cancer, 2019. **10**(8): p. 1870-1878.
82. Bryant, K.L., et al., *Combination of ERK and autophagy inhibition as a treatment approach for pancreatic cancer*. Nat Med, 2019. **25**(4): p. 628-640.
83. Encarnacion-Rosado, J. and A.C. Kimmelman, *Harnessing metabolic dependencies in pancreatic cancers*. Nat Rev Gastroenterol Hepatol, 2021. **18**(7): p. 482-492.
84. Kinsey, C.G., et al., *Protective autophagy elicited by RAF-->MEK-->ERK inhibition suggests a treatment strategy for RAS-driven cancers*. Nat Med, 2019. **25**(4): p. 620-627.
85. Xavier, C.B., et al., *Trametinib and Hydroxychloroquine (HCQ) Combination Treatment in KRAS-Mutated Advanced Pancreatic Adenocarcinoma: Detailed Description of Two Cases*. J Gastrointest Cancer, 2021. **52**(1): p. 374-380.
86. Goedhart, J., et al., *Bright cyan fluorescent protein variants identified by fluorescence lifetime screening*. Nat Methods, 2010. **7**(2): p. 137-9.
87. Konagaya, Y., et al., *A Highly Sensitive FRET Biosensor for AMPK Exhibits*

- Heterogeneous AMPK Responses among Cells and Organs*. Cell Rep, 2017. **21**(9): p. 2628-2638.
88. Van Eaton, K.M. and D.L. Gustafson, *Pharmacokinetic and Pharmacodynamic Assessment of Hydroxychloroquine in Breast Cancer*. J Pharmacol Exp Ther, 2021. **379**(3): p. 331-342.
 89. Du, L., et al., *Role of mTOR through Autophagy in Esophageal Cancer Stemness*. Cancers (Basel), 2022. **14**(7).
 90. Ershov, D., et al., *TrackMate 7: integrating state-of-the-art segmentation algorithms into tracking pipelines*. Nat Methods, 2022. **19**(7): p. 829-832.
 91. Stringer, C., et al., *Cellpose: a generalist algorithm for cellular segmentation*. Nat Methods, 2021. **18**(1): p. 100-106.
 92. Gonçalves, C.A., et al., *A 3D system to model human pancreas development and its reference single-cell transcriptome atlas identify signaling pathways required for progenitor expansion*. Nat Commun, 2021. **12**(1): p. 3144.
 93. Huang, L., et al., *Commitment and oncogene-induced plasticity of human stem cell-derived pancreatic acinar and ductal organoids*. Cell Stem Cell, 2021. **28**(6): p. 1090-1104.e6.
 94. Koo, B.K., et al., *Controlled gene expression in primary Lgr5 organoid cultures*. Nat Methods, 2011. **9**(1): p. 81-3.
 95. Huang, L., et al., *Ductal pancreatic cancer modeling and drug screening using human pluripotent stem cell- and patient-derived tumor organoids*. Nat Med, 2015. **21**(11): p. 1364-71.
 96. Kometani, T., et al., *Development of a novel co-culture system using human pancreatic cancer cells and human iPSC-derived stellate cells to mimic the characteristics of pancreatic ductal adenocarcinoma in vitro*. Biochem Biophys Res Commun, 2023. **658**: p. 1-9.
 97. Dekkers, J.F., et al., *Uncovering the mode of action of engineered T cells in patient cancer organoids*. Nat Biotechnol, 2023. **41**(1): p. 60-69.
 98. Kumagai, Y., et al., *Heterogeneity in ERK activity as visualized by in vivo FRET imaging of mammary tumor cells developed in MMTV-Neu mice*. Oncogene, 2015. **34**(8): p. 1051-7.
 99. Schneider, C., et al., *A Novel AMPK Inhibitor Sensitizes Pancreatic Cancer Cells to Ferroptosis Induction*. Adv Sci (Weinh), 2024. **11**(31): p. e2307695.
 100. Schneider, C., et al., *A Novel AMPK Inhibitor Sensitizes Pancreatic Cancer Cells to Ferroptosis Induction*. Adv Sci (Weinh), 2024: p. e2307695.
 101. Shen, C.H., et al., *Phosphorylation of BRAF by AMPK impairs BRAF-KSR1*

- association and cell proliferation*. Mol Cell, 2013. **52**(2): p. 161-72.
102. Lacher, M.D., R.J. Pincheira, and A.F. Castro, *Consequences of interrupted Rheb-to-AMPK feedback signaling in tuberous sclerosis complex and cancer*. Small GTPases, 2011. **2**(4): p. 211-216.
 103. Mollinedo, F. and C. Gajate, *Novel therapeutic approaches for pancreatic cancer by combined targeting of RAF-->MEK-->ERK signaling and autophagy survival response*. Ann Transl Med, 2019. **7**(Suppl 3): p. S153.
 104. Falcomatà, C., et al., *Selective multi-kinase inhibition sensitizes mesenchymal pancreatic cancer to immune checkpoint blockade by remodeling the tumor microenvironment*. Nat Cancer, 2022. **3**(3): p. 318-336.
 105. Lilja, J., et al., *SHANK3 depletion leads to ERK signalling overdose and cell death in KRAS-mutant cancers*. Nat Commun, 2024. **15**(1): p. 8002.