

論文の内容の要旨

論文題目 大腸腫瘍における幹細胞ニッチ因子要求性の多角的検討

氏名 藤井 正幸

【背景】

腸陰窩に存在する腸管上皮幹細胞は生涯を通じて自己複製を繰り返すと同時に機能的な娘細胞を産出し、腸管上皮の恒常性維持を担う。幹細胞機能は周囲組織によって形成される微小環境いわゆる幹細胞ニッチによって保持されているが、腸管上皮における幹細胞ニッチシグナルの詳細は不明とされてきた。近年、腸管上皮幹細胞の永続的体外培養法であるオルガノイド培養法が確立され、ヒト大腸上皮幹細胞の機能維持に必要なニッチ因子として Wnt-3a、R-Spondin1、EGF、Noggin、TGF- β 受容体阻害剤、p38 MAPK 阻害剤が同定された。

近年の大規模解析により散発性大腸癌が内包する分子生物学的異常の詳細が明らかとなり、大腸癌変異パスマウエイの多くにおいて腸管上皮幹細胞ニッチシグナルへの収束が認められた。このシグナルの重複は大腸癌の発癌あるいは進行過程で、遺伝子変異によるニッチシグナル非依存的な増殖能の獲得は浸潤先端や転移先などのニッチ因子が乏しい環境において、腫瘍細胞の選択的増殖を可能にする上で重要であることを示唆している。しかしながら、このような患者大腸腫瘍組織の細胞学的な特性を解析することは研究ツールの欠如から従来困難とされてきた。本研究ではオルガノイド培養法を患者大腸腫瘍に応用し、ヒト大腸腫瘍の多様性を網羅するべく様々な大腸腫瘍性病変よりオルガノイドを樹立し、種々の機能的解析に応用可能なオルガノイドライブラリの確立を試みた。さらに、それぞれの腫瘍オルガノイドに対する詳細な分子生物学的解析および機能的アッセイによって、生物学的に高い価値を有する機能的な研究基盤の構築を目指した。

【方法・結果】

従来、高度進行癌や稀な組織型からのオルガノイド樹立効率の低さが難点であったため、表現系解析に先あたり樹立プロトコルの改良を行った。検体処理方法を改変し、回収した腫瘍組織をニッチ因子に立脚した 8 条件に分配することで、多様な大腸腫瘍組織からの確実なオルガノイド樹立が可能となった。改変プロトコルを利用し、良性病変や稀な組織型を含む様々な大腸腫瘍からのオルガノイド樹立を行い、計 55 ラインから成る大腸腫瘍オルガノイドライブラリを構築した。ライブラリの組織学的内訳は腺腫 12 例、鋸歯状病変 3 例、高分化腺癌 8 例、中分化腺癌 17 例、低分化腺癌 2 例、粘液癌 2 例、神経内分泌癌 2 例、転移癌 6 例、不明 3 例であった。

腫瘍オルガノイドによる患者組織像の再構築能を検討するため、大腸癌オルガノイドの *in vitro* の形態学的評価および免疫不全マウス (NOG マウス) の腎被膜下への移植による *in vivo* の組織学的検討を行った。その結果、高・中・低分化腺癌、神経内分泌癌、粘液癌オルガノイドのいずれも *in vitro* において患者腫瘍の組織学的特徴を反映した形態像をとり、*in vivo* においても同様に患者組織像と極めて類似した特徴を有する移植組織を再構築することが可能であった。

各オルガノイドを対象とした分子生物学的解析として、まず発現マイクロアレイを用いてオルガノイドの遺伝子発現解析を行った。正常大腸上皮、腺腫、鋸歯状病変、microsatellite-stable (MSS)

大腸癌、microsatellite-instability (MSI) 大腸癌、神経内分泌癌オルガノイドの遺伝子発現パターンは主成分分析において明確に区分される領域に分布した。Gene set enrichment analysis では腺腫、MSS 大腸癌、MSI 大腸癌オルガノイドのいずれにおいても既存の臨床サンプル遺伝子発現データとの強い相関が認められ、患者腫瘍における遺伝子発現パターンはオルガノイド培養中も保持されていることが示された。

また、遺伝子変異および染色体異常を解析するため、次世代シーケンスによる遺伝子変異解析およびマイクロアレイによるコピー数解析を行った。MSS 大腸癌と MSI 大腸癌では全く異なる遺伝子変異、染色体異常プロファイルが認められたが、各遺伝子の変異頻度は近年の大規模データベースとほぼ同等であり、特定の遺伝子変異に偏ることなくオルガノイド樹立が可能であったと考えられた。また、同一患者由来の原発巣・転移巣オルガノイドの比較では、これまでの報告と同様にいずれの患者においても主要な遺伝子変異いわゆるドライバー遺伝子変異は共通しており、転移形成前の段階でドライバー遺伝子変異を既に獲得していることが明らかとなった。

オルガノイドを用いた機能的解析として、各腫瘍オルガノイドにおける Wnt-3a/R-Spondin1、EGF、Noggin、TGF- β 受容体阻害剤、p38 MAPK 阻害剤、酸素濃度の要求性を個別に検討し、増殖に最小限必要とするニッチ因子の条件を導出した。その結果、良性病変から癌に至る過程つまり腺腫から MSS 大腸癌、鋸歯状病変から MSI 大腸癌に至る過程に必要なニッチ因子の個数の有意な減少が認められた。その一方で、早期癌と進行癌の比較では同様の傾向は確認されなかった。

各ニッチ因子の要求性と分子生物学的異常の相関について検討を行ったところ Wnt-3a/R-Spondin1 非依存のオルガノイドはいずれも Wnt パスウェイ遺伝子を有しており、Wnt-3a/R-Spondin1 の要求性はパスウェイ遺伝子変異によって厳密に規定されていることが明らかとなった。また、EGF の要求性と EGFR パスウェイ遺伝子変異および EGF 関連リガンドである EREG 遺伝子の過剰発現の有無について相関を検討したところ、EGF の要求性は主にパスウェイ遺伝子変異および関連リガンドの過剰発現によって規定されていたが、EGFR パスウェイ変異を有する一部の原発巣オルガノイドにおいて EGF に対する感受性が認められた。続いて TGF- β 受容体阻害剤要求性と TGF- β パスウェイ遺伝子変異の有無の関連について検討したところ、パスウェイ変異を有するオルガノイドについては TGF- β 受容体阻害剤は不要であった一方で、TGF- β 非要求性オルガノイドの多くにはパスウェイ遺伝子変異が認められなかった。遺伝子変異非依存的な TGF- β 耐性を有する大腸癌の特徴として 18q 染色体の欠失、および高度進行癌であることが挙げられた。

大腸癌オルガノイドの *in vivo* における腫瘍学的な評価として、NOG マウスへの異種移植を行った。まず局所増殖能の評価として腎被膜下への移植を行い生着腫瘍面積を定量したところ、必要ニッチ因子の個数が少ない腫瘍ほど大きな腫瘍を形成し、局所増殖能は必要ニッチ因子の個数と負の相関を有することが明らかとなった。続いて転移能の評価として脾臓への移植を行い、肝転移巣の面積および個数を計測した。その結果、原発巣オルガノイドと比較して転移巣オルガノイドはより効率的に肝転移を形成することが可能であった。対となる原発巣オルガノイドと転移巣オルガノイドはほぼ同等の分子生物学的プロファイルを有しており、転移能は遺伝子異常によらないメカニズムによって規定されていることが示唆された。

【考察・結論】

本研究では、まず従来樹立困難とされてきた高度進行大腸癌や稀な組織型大腸癌からのオルガ

ノイド樹立効率を改善するためにプロトコルの改変を行い、最終的にはあらゆる大腸上皮性腫瘍からの確実なオルガノイド樹立が可能となった。大腸腫瘍は本質的に患者間あるいは腫瘍内における多様性に富む不均一な癌腫であり、様々な大腸腫瘍からのオルガノイド樹立が実現したことで、将来的な個別化治療やバイオマーカー探索などへの応用が期待される。今回の検討においてもこの多様性を考慮し、良性病変や稀な組織型、転移巣から幅広いオルガノイド樹立を行った。各オルガノイドは詳細な臨床情報および分子生物学的プロファイルで特徴付けられ、生物学的価値の高いライブラリを構築することが可能であった。大腸腫瘍オルガノイドは患者組織の組織学的特徴や遺伝子発現パターンを保持しており、体外における疾患モデルツールとして極めて有用であると考えられた。

継続的なオルガノイド培養に必要な幹細胞ニッチ因子の個数は良性病変から癌に至る過程で有意な減少が認められた一方で、早期癌と進行癌の比較では有意な差は認められなかった。このことは幹細胞ニッチへの非依存は良性病変から癌に至る過程で肝要であるが、癌の進行自体には必須ではないことを示唆している。個別のニッチ因子要求性の検討において TGF- β 受容体阻害剤の要求性はパスウェイ遺伝子変異以外に染色体異常あるいは臨床ステージとの有意な相関が認められた。また、異種移植モデルにおいて局所増殖能は必要ニッチ因子の個数と相関する一方で、肝転移モデルでは肝転移巣由来オルガノイドのみ効率的に肝転移を形成することが可能であった。このように、大腸腫瘍の細胞学的特性は遺伝子変異や遺伝子発現等の分子生物学的異常、および従来のいわゆる **genotype-phenotype correlation** では説明不能なメカニズムを複雑に包含していることが患者由来オルガノイドを用いた今回の検討で明らかとなり、オルガノイドを用いた患者レベルでの表現型解析の有用性を強く示唆する結果となった。