

審査の結果の要旨

氏名 藤井 正幸

本研究は腸管上皮幹細胞の永続的体外培養法（オルガノイド培養法）をヒト大腸腫瘍に応用し、多様なヒト大腸腫瘍を網羅するオルガノイドライブラリの構築を目指したものである。さらに、オルガノイドを用いた *in vitro*, *in vivo* の機能的アッセイによって、従来解析困難であった患者腫瘍細胞の表現系を探索し、下記の結果を得ている。

1. 検体処理方法および培養条件の改良により、従来培養困難であった高度進行癌やまれな組織型からの効率的なオルガノイド樹立が可能となった。この改良プロトコールを用いて、様々な臨床病期や組織型を網羅する患者由来大腸腫瘍オルガノイドのライブラリを確立した。
2. 大腸腫瘍オルガノイドは培養中 (*in vitro*) および免疫不全マウスへの移植下 (*in vivo*) において、患者腫瘍の組織学的特徴を再構築することが可能であった。また、培養中のオルガノイドには組織型に特徴的な遺伝子発現パターンが認められ、各組織型に特徴的発現が認められる遺伝子群は患者組織においても有意な変動が認められた。これらの結果より、オルガノイドは患者腫瘍の組織学的、分子生物学的特徴を忠実に投影すると考えられた。
3. それぞれの大腸腫瘍オルガノイドの培養に必要な幹細胞ニッチ因子条件の検討では、良性病変から癌への移行過程において必要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認められず、幹細胞ニッチへの依存低減は発癌プロセスにおいて肝要であるが、癌の進行自体には必須でないことが示唆された。
4. 大腸腫瘍オルガノイドにおける Wnt-3a/R-spondin1, EGF の要求性は主に遺伝子異常（パスウェイ遺伝子変異、遺伝子過剰発現）によって規定されていた。一方で、遺伝子変異非依存的に TGF- β への耐性を獲得しているオルガノイドが多数認められ、このような腫瘍の特徴として染色体異常（18qの欠失）および高度進行癌であることが挙げられた。
5. 大腸癌オルガノイドの免疫不全マウスへの異種移植モデルにおいて、腎被膜下移植腫瘍の腫瘍形成能（局所増殖能）と必要ニッチ因子の個数には有意な負の相関が認められた。一方で脾臓移植による肝転移モデルでは、肝転

移由来オルガノイドは原発巣由来オルガノイドと比較して効率的に肝転移を形成することが可能であった。この転移アッセイにおける表現系の差は同一患者由来の転移巣・原発巣オルガノイドにおいても同様に認められた。

以上、本論文は患者由来ヒト大腸腫瘍オルガノイドのライブラリという生物学的価値の高い研究リソースを確立し、オルガノイドを活用した機能的解析により従来の研究手法および遺伝型・表現系相関では観察困難であったヒト大腸腫瘍の細胞学的形質を同定した。個別化薬剤スクリーニング等、将来的な患者レベルでの機能的な研究基盤の構築に大きく寄与すると考えられ、学位の授与に値するものと考えられる。