

学位論文審査の結果の要旨

審査区分 課・論	第714号	氏名	瀧野貴文
審査委員会委員	主査氏名	濱田文彦	
	副査氏名	河野憲司	
	副査氏名	西田陽登	
論文題目			
<p>Characterization of residual cancer by comparison of a pair of organoids established from a patient with ESCC before and after neoadjuvant chemotherapy (食道扁平上皮癌から樹立した術前化学療法前後のオルガノイドの比較による残存がんの生物学的特徴)</p>			
論文掲載雑誌名 Human Cell			
論文要旨			
<p>【目的】 進行食道癌の患者(同一患者)から、術前化学療法(NAC, neoadjuvant chemotherapy)の前後の癌組織に由来するオルガノイド(O, organoid)を作製し(それぞれPreNAC-OおよびPostNAC-Oとする)、これを患者由来がんモデルとして両者の特性、遺伝子発現プロファイルの違いを解明する。</p>			
<p>【研究対象・方法】 本学附属病院でNAC(DCF療法, Docetaxel, Cisplatin, 5-Fluorouracil)+外科手術を受けた食道癌患者からPreNAC-O(NAC前の生検組織由来)およびPostNAC-O(NAC後の外科手術標本由来)を樹立し、<i>in vitro</i>で増殖能・形態学的特性・薬剤感受性を解析した。また、両者を免疫不全マウスに移植し、<i>in vivo</i>で腫瘍形成能・移植組織像・薬剤感受性を解析した。加えて、両者の網羅的遺伝子発現解析を行った。</p>			
<p>【結果】 ・<i>in vitro</i>での増殖能・形態学的特性・薬剤感受性には、PreNAC-O、PostNAC-Oの両者間に有意差を認めなかった。 ・<i>in vivo</i>では、PreNAC-OよりPostNAC-Oの方が強い増殖能を示し、DCF投与による薬剤感受性試験においてもPostNAC-Oの方が抵抗性を示したことから、PostNAC-OはPreNAC-Oと比較し、悪性度が高いと考えられた。 ・遺伝子発現プロファイルの比較では、PostNAC-O由来の移植組織およびオルガノイドにおいて上皮間葉転換(EMT)関連遺伝子、CA9をはじめとする低酸素関連遺伝子の発現が亢進していた。</p>			
<p>【結論と考察】 NAC前食道癌に比べてNAC後食道癌の方が悪性度が高く、その要因としてとしてEMT、低酸素環境が関連している可能性が考えられた。</p>			
<p>本研究は、「癌に対する個別化医療」実現の基盤となる重要な成果であり、臨床的にもたいへん意義のある論文である。このため、審査員の合議により本論文は学位論文に値するものと判定した。</p>			

最終試験
の結果の要旨
学力の確認

審査区分 ● 論	第714号	氏名	瀧野貴文
審査委員会委員	主査氏名	瀧田文彦	
	副査氏名	河野憲司	
	副査氏名	西田陽登	
<p>学位申請者は本論文の公開発表を行い、各審査委員から研究の目的、方法、結果、考察について以下の質問を受けた。</p> <p>① 抗がん剤感受性の評価にオルガノイドを用いた理由は？過去に報告されている方法の問題点は？</p> <p>② CA9を染めた理由は？</p> <p>③ <i>in vitro</i> は抗がん剤を単剤、<i>in vivo</i> (xenograft) は多剤で投与しているが、この違いは結果の評価に影響しないか？</p> <p>④ <i>in vitro</i> に比べて <i>in vivo</i> で EMT 関連遺伝子の upregulate が起こったとのことであるが、EMT 関連分子の代表であるカドヘリンの変化はどうだったか？</p> <p>⑤ <i>in vitro</i> に比べて <i>in vivo</i> で Hypoxia 関連遺伝子の upregulate が起こったとのことであるが、HIF の変化はどうだったか？</p> <p>⑥ オルガノイドの大きさは EMT-Hypoxia 関連遺伝子発現に影響しないか？</p> <p>⑦ 今回の研究において、培養細胞ではなく、オルガノイドを用いた意義は？オルガノイドならではの研究成果は？</p> <p>⑧ CA9は通常膜に染色されるが、Fig.3d では核が染色されているものが目立つ。この違いや理由は？</p> <p>⑨ pre-NAC-O は病変の表層から採取されたと思われるが、post-NAC-O は病変のどのあたりから採取されたか？</p> <p>⑩ post-NAC-O は低酸素や EMT の遺伝子発現が優位とのことであるが、この結果は腫瘍の採取部位に関係しているのか、化学療法に耐えた影響を受けたことによるものか？</p> <p>⑪ 腫瘍の分化という点で考えると、pre が高分化、post が低分化に見えて、postの方が壊死があって悪そうに見える。しかし、増殖能としての Ki67 は pre と post では差がなさそう。発表者は「postの方が悪性度高そう」と表現しているが、悪性度とは具体的にどういった指標を指しているのか？</p> <p>⑫ オルガノイドを作製する際に、培養液中に細胞の増殖、分化に影響を与えると思われる物質が添加されているが、これらがオルガノイドの特性に与える影響は無視できないのではないか？</p> <p>⑬ 癌組織の中に存在する癌細胞には heterogeneity があると思われるが、オルガノイドを作製する際、その培養条件あるいは環境に適した性質をもった癌細胞のみが優先的に増殖してオルガノイドを形成してしまう恐れはないか？</p> <p>⑭ histological therapeutic effect Grade Ia というのは、化学療法の効果がほとんどなかったということか？内視鏡検査で腫瘍の縮小は認められたか？</p> <p>⑮ 免疫組織染色などにより、化学療法後の癌組織での EMT 関連転写因子や E-cadherin の発現量の変化は認められたか？</p> <p>⑯ 食道の重層扁平上皮のターンオーバーの日数は？幹細胞は同定されているか？</p> <p>これらの質疑に対して、申請者は概ね適切に回答した。よって審査委員の合議の結果、申請者は学位取得有資格者と認定した。</p>			

(注) 不要の文字は2本線で抹消すること。

学 位 論 文 要 旨

氏名 瀧野 貴文

論 文 題 目

Characterization of residual cancer by comparison of a pair of organoids established from a patient with ESCC before and after neoadjuvant chemotherapy

(食道扁平上皮癌から樹立した術前化学療法前後のオルガノイドの比較による残存がんの生物学的特徴)

要 旨

ア. 諸言

進行食道癌には術前化学療法(NAC; neoadjuvant chemotherapy)+外科手術が主流だが、NACに対して治療抵抗性を示す食道癌は予後不良である。化学療法耐性メカニズムは不明な点が多く、解明のためには新たな研究方法の確立が必要であると考え。そこで本研究では同一患者のNAC後と比較対象としてNAC前の食道癌組織を用いて、患者由来がんモデルを確立し、両者の生物学的な違いを明らかにすることを目的とした。

イ. 研究対象及び方法

当院でNAC(DCF療法; Docetaxel, Cisplatin, 5-Fluorouracil)+外科手術を受けた食道癌患者で、NACの治療効果がGrade1aであった1症例を対象とし、NAC前の内視鏡生検組織からNAC前食道癌オルガノイド(PreNAC-O)を樹立し、NAC後の手術標本からNAC後食道癌オルガノイド(PostNAC-O)を樹立した。In vitroでPreNAC-O, PostNAC-Oの増殖能・形態学的特性・薬剤感受性を検討した。次にそ

それぞれのオルガノイドを免疫不全マウスに皮下移植し、In vivo で腫瘍形成能・移植組織像・薬剤感受性を検討した。さらに、PreNAC-O、PostNAC-O の網羅的遺伝子発現解析を行った。

ウ. 結果

PreNAC-O、PostNAC-O は In vitro での増殖能・形態学的特性・薬剤感受性に有意な差を認めなかった。In vivo 増殖実験では、Post-NAC の移植腫瘍体積、回収した腫瘍重量は有意に大きかった。移植組織像に関しては PreNAC-O は角化傾向が強く、PostNAC-O は壊死領域が目立っており、両者の組織像に違いを認めた。薬剤感受性試験では DCF 投与により PreNAC-O、PostNAC-O どちらも移植腫瘍増大は抑制されたが、PostNAC-O の DCF 投与群は PreNAC-O の control 群より増大傾向は大きかった。In vivo にて PostNAC-O の方が悪性度は高いという結果となった。遺伝子発現マイクロアレイによる移植組織でのクラスタリング解析では PostNAC-O と PreNAC-O は非常に異なる遺伝子発現プロファイルを認めた。移植組織およびオルガノイド培養物での GSEA(Gene Set Enrichment Analysis)では PostNAC-O 由来の移植組織ならびにオルガノイド培養物において EMT 関連および/または低酸素関連遺伝子の発現が亢進していることが明らかになった。発現の亢進していた低酸素関連遺伝子の CA9 の免疫組織染色では、PreNAC-O と比較して PostNAC-O のオルガノイド、移植組織ならびに原発巣の手術標本で細胞膜の染色性が亢進した。同様に NAC 治療抵抗性食道癌症例の検討では、13/19 症例で NAC 前の内視鏡生検に比べて、NAC 後の手術標本で CA9 の発現の亢進を認めた。

エ. 考察

今回の In vitro、In vivo の結果からは「NAC 後に残った癌細胞は抗癌剤に対する耐性能を獲得したというより、化学療法の効果を上回る悪性度を微小環境との相互作用で獲得した」と考えられた。この結果は、本症例 1 例に限った可能性もあり、他の症例では NAC 前・後の癌オルガノイドが In vitro でも抗癌剤感受性に差を認める可能性も考えられる。また、アポトーシス抑制や抗癌剤の排出促進といった癌細胞の内因性のメカニズムで耐性能を獲得している可能性も考えられる。更なる検証が必要と考える。

オ. 結語

NAC 前食道癌に比べて NAC 後食道癌の方が生物学的に悪性度は高いという特徴が明らかになった。NAC 後食道癌の悪性度の亢進の要因として、EMT・低酸素が関連している可能性が考えられた。