京都大学 博士 (医 学) 氏 名 森本 智紀

Novel and efficient method for culturing patient-derived gastric cancer stem cells
(患者由来胃癌幹細胞の効率的な新規培養法)

(論文内容の要旨)

胃癌は罹患率、死亡率共に未だ上位を占めており、症例ごとの病理的・分子的特徴を踏まえた効果的な治療の開発が求められている。近年、Lauren分類やWHO分類などの組織学的な分類に加えて、TCGA分類やACRG分類などの分子生物学的分類が提唱されているが、これらの分類に基づく治療法は未だ開発されていない。分子標的薬の効果を予測するマーカーとしてHER2やPD-1、PD-L1等が使用されているが、治療の対象となる患者は限られている。

近年、患者癌組織から分離して三次元培養した「癌細胞オルガノイド」を使用した研 究が盛んに行われており、大腸癌などではオルガノイドの薬剤感受性が化学療法の奏 効を予測できるとの報告がなされている。一方、胃癌は他癌種と比較してオルガノイ ド培養の成功率が低く、培養手法に改善の余地がある。京都大学医学部附属病院臨床 研究センター・大腸がん新個別化治療プロジェクトでは患者大腸癌組織より分離した 癌細胞を独自の方法で三次元培養し、増殖の活発な癌幹細胞を豊富に含む「癌幹細胞 スフェロイド」を樹立した。本研究では、この培養手法を胃癌に応用し、樹立の成功 率を検証した。しかし、大腸癌と同一の樹立方法では71例中18例のみの樹立にと どまり、成功率は25%であった。特にびまん性胃癌では腸型胃癌と比較して有意に 樹立成功率が低かった。そこで、以下の3点について手法を改良した結果、成功率が 88%と著明に改善した(33例中29例)。まず樹立に失敗した症例を検討したと ころ46%で採取した組織片に癌細胞が含まれていなかったことから、従来は腫瘍境 界内を2箇所採取していたところを、境界を跨ぐ広範囲の領域を粘膜下の深層まで3 - 4箇所採取した。これにより癌幹細胞を再現性よく確保することが可能になった。 次に、胃癌細胞はコラーゲン線維の豊富な間質に浸潤する傾向が強いことから、培養 基質として従来のマトリゲルに加えて1型コラーゲンを採用し、個別に培養を行なっ た。既存のスフェロイド株を用いて基質毎の増殖率の違いを検証したところ、一部の 細胞株では1型コラーゲンに依存して増殖が促進されることがわかった。最後に、幹 細胞ニッチ因子であるWnt、R-spondin、Nogginを低濃度(5%L -WRN培養上清)で培養液に添加した。胃癌細胞は増殖にWn t 因子を必要とする 傾向が高いことが知られているが、高濃度のWn t 因子は正常上皮幹細胞の競合的な 増殖を引き起こし、癌幹細胞培養の障害となる。そこで、これらのリガンドを豊富に 含むL-WRN培養上清を0%から20%の範囲で段階的に希釈して培養液に添加し たところ、5%から10%の濃度で胃癌幹細胞スフェロイドの増殖を促進した。5% の濃度では正常上皮幹細胞スフェロイドの増殖を維持できなかったことから、前述の 濃度で胃癌幹細胞を選択的に培養することが可能になった。

大腸がん新個別化治療プロジェクトでは大腸癌幹細胞スフェロイドの薬剤感受性が患者の化学療法への感受性を良好に反映することや、FGFR阻害薬や変異型KRAS (G12C)阻害薬などの新規分子標的薬の適応患者選択方法として有用であることが報告された。胃癌についても今回改良した培養法を用いることで、新たな治療標的の探索や新規分子標的薬を用いた個別化治療開発の強力なツールとなることが期待される。

(論文審査の結果の要旨)

癌患者から分離して培養した癌幹細胞の薬剤感受性試験は患者毎に個別化された治療の有効性を判定する優れたツールとなりうる。本論文では先行研究で報告された大腸癌幹細胞由来スフェロイドの培養法(従来法)を胃癌に適用し、臨床応用可能性を検討した。しかし従来法での樹立成功率は25%と大腸癌の90%と比較して著しく低かったことから、「組織の採取法」「細胞外基質」「培地」の3点において改良を行った。まず、従来の癌組織採取法では46%の症例で組織片に癌細胞が含まれていなかったため、採取部位を見直し、採取範囲と採取数を拡大した。次に培養に使用する細胞外基質に関して、既存のスフェロイド株を用いた成長モニタリングで I 型コラーゲンに親和性の高い細胞株を見出したことから、従来のマトリゲルに加えて I 型コラーゲンを採用し別個に培養を行った。さらに胃正常上皮幹細胞の増殖を抑制しつつWnt リガンドに依存性の胃癌幹細胞を培養するため、高活性のWnt リガンドを含む L-WRN 培養上清を低濃度で添加した。以上の改良により、胃癌幹細胞スフェロイド樹立の成功率は88%にまで改善した。病理組織学的解析やゲノム解析の結果から胃癌の組織型や分子学的背景にかかわらず樹立が可能であることが示唆され、低コストかつ高効率であることから臨床現場での使用に資することが示された。

以上の研究は従来の胃癌幹細胞培養法の問題解決に貢献し、今後の個別化診断法開発に寄与するところが多い。

したがって、本論文は博士(医学)の学位論文として価値あるものと認める。

なお、本学位授与申請者は、令和5年8月28日実施の論文内容とそれに関連した試問を受け、合格と認められたものである。

要旨公開可能日: 年 月 日 以降