

京都大学	博士 (医学)	氏名	岡本 拓也
論文題目	Comparative Analysis of Patient-Matched PDOs Revealed a Reduction in OLFM4-Associated Clusters in Metastatic Lesions in Colorectal Cancer (同一患者由来の大腸がんオルガノイド比較解析による OLFM4 陽性がん幹細胞の同定と転移再発に伴う細胞多様性の変化)		
(論文内容の要旨) 【目的・背景】 腫瘍組織は機能的に不均一な細胞から構成される。ヒト検体における原発巣と転移巣の包括的なオミックス解析が行われてきたが、転移に伴う腫瘍組織を構成する細胞集団の変化については明らかではない。同一患者から樹立された Patient-derived organoids(PDOs)を用いて同一培養条件下での腫瘍組織の細胞不均一性とその細胞生物学的意義について検証する。 【方法・結果】 StageIVの大腸がん患者 21 名の原発巣と転移/再発巣のから合計 72 個の PDOs を樹立した。PDOs の遺伝子変異は由来する手術標本と 85%-100%の頻度で一致した。一方、PDOs をバルクで遺伝子発現解析を行ったところ、同一患者の原発巣と転移/再発巣 PDOs は異なるクラスターを形成した。原発巣 PDOs では転移/再発巣 PDOs に比較して幹細胞マーカーである OLFM4 に加え、MUC2 や ST6GALNAC1 などの分化細胞マーカーが高発現していた。OLFM4 と相関する発現パターンを示す遺伝子には SLC12A2 や RGMB や BCL2 といった消化管幹細胞マーカーが含まれており、原発巣と転移・再発巣の遺伝子発現の違いは特定の遺伝子の単独の変化ではなくオルガノイドを構成する細胞集団の変化に起因することが考えられた。そこで同一患者 PDOs の原発巣(HCT25-1T)、同時性肝転移巣(HCT25-5LM)、異時性肝転移巣(HCT25-10LMRR)の 1 細胞遺伝子発現解析(scRNA-seq)を行った。その結果、PDOs を構成する細胞集団は C1-5 の 5 つのクラスターに区分され、さらに Differentially Expressed Genes(DGE)解析では、C5 と C4 では分化マーカーが、C2-4 では増殖マーカーが高発現していた。C1 では OLFM4 が最も高く発現しており、MYC や IFITM3 などの幹細胞マーカーも高発現していた。Gene Set Enrichment Analysis(GSEA)解析では C2-4 では細胞増殖に関連する遺伝子群、C1 では RNA 代謝や翻訳に関わる遺伝子群が相関していた。このことから PDOs は、幹細胞様クラスター(C1)、2 つの増殖細胞様クラスター(C2 と C3)、前駆細胞様クラスター(C4)、分化細胞様クラスター(C5)から構成され、進行大腸がんにおいても正常組織に類似の細胞階層性が存在することが示された。興味深いことに、原発巣由来 PDO では幹細胞および分化細胞(C1、C4、C5)の割合が多いのに対し、転移・再発巣由来 PDO では増殖細胞(C3)の割合が多かった。これらの結果とバルク遺伝子発現解析の結果から、転移/再発巣 PDOs では幹細胞や分化細胞が減少しており増殖細胞の分画が増加していることが明らかになった。幹細胞マーカーの候補として同定された OLFM4 の生物学的検証を目的として、ゲノム編集により 3'UTR 領域に IRES-EGFP-P2A-iCaspase9 カセットを導入し、可視化と除去実験を行った。その結果、FACS により分離した原発巣 PDO の OLFM4 陽性細胞は OLFM4 陰性細胞に比べて 6.4 倍のオルガノイド形成能を示した。また、OLFM4 陰性細胞から生じるオルガノイドは、その過程で OLFM4 陽性細胞が出現すること、その OLFM4 陽性細胞を除去するとオルガノイド形成が阻害されることが明らかになった。一方、転移巣由来 PDO では遺伝子発現解析結果と一致して OLFM4 陽性細胞			

は検出されず、OLFM4 陰性細胞からのオルガノイド構成効率は、陽性細胞の除去に影響されなかった。

【結語・考察】 同一患者の原発巣と転移巣から樹立された PDOs の比較解析により、転移に伴う細胞階層性の変化を明らかにした。原発巣由来 PDO では OLFM4 陽性細胞ががん幹細胞としてオルガノイドの構成に必須の機能を果たしているのに対し、転移巣由来 PDO の細胞多様性は異なり、オルガノイドの構成が OLFM4 陽性細胞に依存しないことが明らかになった。大腸がん原発巣と転移/再発巣では、異なった細胞集団を治療標的とすることで奏効率が改善される可能性がある。

(論文審査の結果の要旨)

大腸がんの細胞多様性は転移や治療抵抗性に寄与するが、原発巣の転移巣との相違は未解明である。本研究の目的は大腸がんの細胞多様性を明らかにし、その意義を検討することである。同一患者由来の原発巣と転移巣の Patient-derived organoids (PDOs) の比較解析と生物学的検証を行った。

1 細胞遺伝子発現解析の結果、原発巣由来 PDOs では転移に伴って幹細胞・分化細胞様の分画が減少し増殖性細胞が増加することが示され、幹細胞性マーカーとして OLFM4 を同定した。21 患者 72 PDOs のバルク遺伝子発現解析では約 8 割で同様の変化が確認された。

次にゲノム編集による OLFM4 陽性細胞の可視化とアポトーシス誘導実験を行った。原発巣 PDOs の PDOs 再構築には OLFM4 陽性細胞が必須であり、再発巣 PDOs は OLFM4 陽性細胞に非依存的事であることが示された。

本研究では大腸がんの幹細胞のマーカー遺伝子として OLFM4 陽性細胞を同定し、原発巣と転移/再発巣では細胞多様性が異なることが明らかになった。転移巣 PDOs では OLFM4 陽性細胞が減少しており、転移巣と再発巣では異なる標的が必要であることが示された。

以上の研究は大腸がん原発巣と転移巣の細胞多様性の解明に貢献し、新たな大腸がん治療の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 3 年 10 月 27 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