

氏名	ソリナ SURINA
学位の種類	博士（医学）
学位記番号	甲第 688 号
学位授与年月日	令和 5 年 3 月 23 日
学位授与の要件	自治医科大学学位規定第 4 条第 2 項該当
学位論文名	患者由来癌細胞を用いた肺癌研究
論文審査委員	(委員長) 教授 坪地 宏 嘉 (委員) 教授 仁木 利 郎 教授 山 本 真 一

論文内容の要旨

1 研究目的

癌性胸膜炎は肺癌に伴う重篤な合併症であり、癌細胞を含んだ胸水が胸腔内に貯留する。大量胸水が貯留した場合は排液が必要である。癌性胸膜炎胸水には癌細胞、腫瘍関連線維細胞、免疫細胞など腫瘍関連細胞（tumor-associated cells）が含まれている。癌細胞を胸水から分離し、培養することで生体内における癌細胞の挙動を検討できる。

患者癌細胞は、少数回の分裂を行った後、生体内の癌細胞の進展を体外で検討することで、市販の細胞株よりも患者体内の状態に近い生体材料を得ることができ、また新たに生じた変化も少ないため、より精密な研究が可能であると考えられる。同一患者の末梢血を採取し、末梢血単核細胞から末梢血循環免疫細胞を誘導分化させ、癌細胞と共培養すれば、末梢血を用いた腫瘍免疫研究も可能となるだろう。

我々は、以前の研究で、癌細胞にダメージを与えないよう物理的刺激を抑えた癌性胸膜炎胸水癌細胞の採取法を確立した。本研究では、分離した癌細胞の体外培養を行なった。患者癌細胞と γ 線を照射したマウス胎児線維芽細胞を共培養した結果、スフェロイド（PDS）が形成された。患者癌細胞を Matrigel matrix で包埋培養した結果、オルガノイド（PDO）が形成された。

本研究はスフェロイドとオルガノイドの形成に伴う形態学的変化とトランスクリプトミクス学的発現から両者と生体内の類似性を検討した。さらに、両者を用いて癌進展モデル構築の可能性を検討した。

2 研究方法

1. 胸水収集

2018 年 4 月から 2020 年 4 月までの間に、自治医科大学附属病院呼吸器内科に入院した 20 名の癌性胸膜炎患者から同意を書面で取得し、診断、治療のため採取、排液された胸水の一部を収集した。

2. 患者癌細胞の単離法の構築

胸水癌細胞の沈降係数を利用した物理的な手法により、癌性胸膜炎胸水から患者癌細胞を分離した。

3. 共培養法

患者癌細胞と γ 線を照射したマウス胎児線維芽細胞の共培養を用いた、スフェロイドの体外培養法を構築した。

4.三次元培養法

患者癌細胞を Matrigel matrix に包埋し、三次元培養を行うオルガノイドの体外培養法を構築した。

5.形態学的観察

PAP 染色、Giemsa 染色、免疫染色と免疫蛍光を用いて、患者癌細胞からスフェロイド、オルガノイドが形成される間に起こる形態学的変化を検討した。

6.RNA sequence

RNA sequence を用いて患者癌細胞、スフェロイド、オルガノイドにおける遺伝子発現、シグナル伝達経路、生物学的過程の相違を検討した。

7.In vitro 免疫反応系の構築

胸水上清単核細胞、患者末梢血単核細胞、健康ドナー末梢血単核細胞から、樹状細胞と細胞傷害性 T 細胞を誘導分化し、in vitro 免疫反応系を構築した。

8.オルガノイドと免疫細胞の共培養

オルガノイドと免疫反応細胞を共培養した。オルガノイドのアポトーシスを評価した。

9.オルガノイド mRNA のプラスミドの構築

オルガノイドの mRNA を抽出し、全長 cDNA を合成した。オルガノイド全長 cDNA を含有するプラスミドを構築し、他の細胞に移入した。

3 研究成果

以前の研究で 10%FBS を含んだ RPMI-1640、胸水上清、両者の 1:1 混合液を用いて患者癌細胞を培養した結果、癌細胞は三者とも明確な成長を示さなかった。そのため、本研究では共培養法と三次元培養法を試みた。3 例の患者癌細胞は共培養法により、スフェロイドが形成された。5 例の患者癌細胞は三次元培養により、オルガノイドが形成された ($n = 5$)。12 例の患者癌細胞はスフェロイドもオルガノイドも形成できなかった。スフェロイドを形成した患者癌細胞ではオルガノイドが形成されず、オルガノイドを形成した患者癌細胞ではスフェロイドを形成されなかったことから、スフェロイドとオルガノイドの形成は排他的な関係であると考えた。

スフェロイド、オルガノイドの形態を検討した。スフェロイドの形態は患者癌細胞より低分化であり、オルガノイドの形態は患者癌細胞より高分化だった。

スフェロイド、オルガノイドをトランスクリプトミクスから検討した。スフェロイドで高発現した遺伝子は腫瘍の増殖を補助し、オルガノイドで高発現した遺伝子は腫瘍の転移を補助するものだった。遺伝子セット濃縮分析 Gene Set Enrichment Analysis (GSEA) では、スフェロイドは炎症反応と上皮間葉系転換を減弱し、オルガノイドでは相反して増強した。遺伝子セット変動分析 Gene Set Variation Analysis (GSVA) では、スフェロイドでは transforming growth factor beta (TGF- β)により引き起こされた上皮間葉系転換の増強を抑制したが、オルガノイドでは促進していた。

GSEA と GSVA の結果は、オルガノイドは免疫応答性を増強する可能性があることを示すものだった。我々は末梢血単核細胞を用いて、体外の細胞傷害性アッセイを構築した。アッセイでは、

オルガノイドのアポトーシスを促進することを示唆しており、オルガノイドは樹状細胞が認識可能な腫瘍関連抗原を保有していると考えた。これまでの結果の応用として、オルガノイドを用いた癌治療法を確立することを目指し、**mRNA** を抽出し、**mRNA** ワクチンを作成する基礎検討を行った。オルガノイド全長 **cDNA** プラスミドライブラリーを構築し、他の細胞への導入を確認した。

4 考察

患者癌細胞を直接用いた癌研究は生体内の癌をより近い状態で観察でき、個々の癌の異なる性質を検討できると考えられる。

単離した患者癌細胞が共培養、三次元培養のいずれでしか培養できなかったことは、癌細胞の増殖における成長因子だけでは不十分であり、胸膜間質と接触することが重要であることを示唆するものであった。共培養の **feeder cell** が胸膜・胸膜間質細胞の機能を模倣し、足場を提供することでスフェロイドが形成されると考えられた。スフェロイドは低分化で増殖し続け、癌の局所増殖のモデルになると考えられた。三次元培養では、**Matrigel matrix** が細胞外基質を提供することでオルガノイドが形成された。オルガノイドは癌の転移増殖のモデルになると考えられた。

スフェロイドとオルガノイドの形成は排他的な関係であり、いずれを形成するかは患者癌細胞が胸腔内に存在する際に、すでに決定付けられていると考えた。トランスクリプトミクスの研究を通して、これらの性質を **RNA** 発現パターンから解明できると考えた。

スフェロイドとオルガノイドに共通して認められた変化は細胞外基質に関与し、細胞外基質に対する反応性は局所増殖、転移に関連する。癌細胞は免疫系との相互作用により、生体内で変化し、**TGF- β** を分泌することで腫瘍の成長を促進する。**TGF- β** シグナル伝達経路に関与することで免疫寛容の環境を修飾することができ、腫瘍細胞は容易に成長できる微小環境を保持できると考えられる。スフェロイド、オルガノイドと免疫細胞の相互作用を検討することにより、腫瘍の増殖、進展、転移を体外で検討できると考えられる。

同一患者の末梢血単核細胞を樹状細胞、細胞傷害性 **T** 細胞に誘導分化し、オルガノイドと共培養することで腫瘍と免疫細胞の相互作用を解明できるだけでなく、体外で抗腫瘍治療法を検討できるシステムともなり得る。これらの応用として、オルガノイド **mRNA** は医療手段になることが期待できる。

5 結論

患者癌細胞から作成されたスフェロイドは腫瘍の局所進展のモデルとなり、オルガノイドは腫瘍の遠隔転移のモデルになると考えられた。トランスクリプトミクスの結果では、スフェロイドでは細胞外基質の形成に関する遺伝子が発現増強し、オルガノイドでは細胞外基質の分解に関する遺伝子発現増強していた。スフェロイドでは免疫反応と上皮間葉系転換に関連する遺伝子が発現減弱し、オルガノイドでは発現増強していた。同一患者の末梢血単核細胞から、樹状細胞と細胞傷害性 **T** 細胞を誘導分化し、それらをオルガノイドと共に培養した結果、オルガノイドのアポトーシスが促進し、腫瘍変異負荷を保有することが示唆され、腫瘍関連抗原を有していると推測した。腫瘍関連抗原が含まれたオルガノイド **RNA** を抽出し、オルガノイド全長 **cDNA** プラスミドライブラリーが作成でき、**lipofectamine** を用いてオルガノイド **mRNA** が他細胞内に導入することができた。患者胸水癌細胞は、様々な癌研究に利用可能だと考えられる。

論文審査の結果の要旨

本研究では、肺癌患者の胸水中から採取した癌細胞を用いてスフェロイドとオルガノイドを作成し、もとの癌細胞及びスフェロイドとオルガノイドで発現する遺伝子を多角的に分析している。得られた結果からスフェロイドとオルガノイドの特徴を明らかにし、癌の増殖や転移の研究への応用および今後の治療に繋がる知見を得ることを目指したものである。

本研究は、(1) 肺癌患者の胸水中から採取した癌細胞からのスフェロイドとオルガノイドの作成と形態学的観察、(2) 患者癌細胞、スフェロイド、オルガノイドからの mRNA 発現のプロファイルの比較検討、(3) スフェロイドを用いた *in vitro* 細胞傷害性アッセイとオルガノイドのアポトーシスの検討、(4) オルガノイド全長 cDNA を用いた mRNA ワクチンの作成と細胞への投与から構成される。

(1) では、患者癌細胞は一般的な培養法では増殖を示さなかったが、線維芽細胞との共培養によりスフェロイドが、三次元培養によりオルガノイドが形成されることが明らかとなった。本研究では 20 症例の胸水癌細胞が用いられており、そのうち 3 例でスフェロイドが、5 例でオルガノイドが形成され、スフェロイドとオルガノイドの両方が形成された症例は認められなかった。当初の論文ではスフェロイドとオルガノイドの作成に成功した症例数が明確ではないため修正を求めた。また、スフェロイドとオルガノイド作成の方法について、何代まで継代し、どの継代数の細胞を蛍光染色、遺伝子発現解析に用いたかについて具体的な記載を求めた。さらに、患者の臨床情報の記載について誤りがあったため修正するよう指示した。(2) に関しては、主成分分析による遺伝子発現の解析で、患者癌細胞とスフェロイドは遺伝子発現の隔たりが大きかったが、患者癌細胞とオルガノイドは比較的近いことが明らかにされた。また、遺伝子の発現量に関して、スフェロイドとオルガノイドの両方で高発現している遺伝子は気管支上皮のマーカーである SCGB3A1 のみであり、共通に低発現している遺伝子は補体に関するもののみであることが示された。Gene Set Variation analysis では、TGF- β により引き起こされた上皮間葉系転換がスフェロイドとオルガノイドいずれにおいても抑制されたが、オルガノイドの方がより抑制効果が強いことが示された。初稿ではこれらを示す図がいずれも小さく読解が困難であったため修正を依頼した。(3) に関しては、単核細胞の分離、培養の方法の記載が曖昧でわかりにくいためより具体的な記述を求めた。細胞傷害性アッセイでは、患者胸水、患者末梢血、健康ドナー末梢血から誘導分化された樹状細胞と細胞傷害性 T 細胞を用いてオルガノイドと共培養されたが、患者末梢血細胞傷害性アッセイと nivolumab が添加された健康ドナー末梢血細胞傷害性アッセイでアポトーシスが最も強く誘導されることが示された。アポトーシス係数の経時変化を示したグラフの改善を求め、最終稿では適切に修正されていることを確認した。(4) についてはオルガノイド mRNA を 3T3-J2 細胞に取り込ませ、傾向顕微鏡にて持続発現することが確認された。

本研究を基盤とした mRNA ワクチンの作成などについては、臨床応用のためにはさらに多くの課題を克服する必要がある。ただし、本研究の一部は既に 1 編の英文誌に掲載されているほか、さらに 1 編が英文誌に受理されている。以上本研究で得られた知見はいずれも新規性と独創性があり、学問的意義が認められ学位授与に相応しいと審査員全員が評価し合格と判断した。

最終試験の結果の要旨

申請者は最終試験において、本研究の学術的背景、方法、結果、考察のいずれに関しても過不足なく適切にプレゼンテーションを行った。得られた知見と本研究の限界およびこれからの発展性についてもわかりやすく発表していた。本研究の内容について多方面からの質疑があったが、概ね適切な回答が得られた。

論文審査と最終試験の内容より、申請者は研究者として十分な研究遂行能力と論理的思考を有すると判断し、審査員全員一致で学位授与に値すると判断した。