

氏 名	佐藤 元
学 位 の 種 類	博士 (医学)
学 位 記 番 号	甲第 735 号
学位授与年月日	令和 7 年 3 月 17 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	ヒト舌癌オルガノイドを用いた化学療法薬抵抗性をもたらすサイクリングパーシスターの同定と性状解析
論 文 審 査 委 員	(委員長) 教授 西野 宏 (委 員) 准教授 天野 雄介 講師 太田 聡

論文内容の要旨

1 研究目的

Drug-tolerant persister (以下「DTP」) は、癌治療を受けている患者において、化学療法薬や分子標的薬に対して一過的かつ非遺伝的に抵抗性を獲得する一部の癌細胞を指す。一方、癌細胞株やマウス発癌モデルを用いた従来の方法では、薬剤治療後に増殖する少数の DTP を捕捉・解析することは困難であった。

我々は以前、様々な癌ステージの未治療の舌癌患者 28 人から、舌癌オルガノイド(tongue cancer organoid、以下「TCO」)ライブラリーを独自に樹立・解析した。その結果、TCO は患者ごとの癌組織の遺伝子変異や組織学的特徴を再現していた。また、樹立した各 TCO 株は化学療法薬(シスプラチンを使用、以下「CDDP」)に対して多様な反応を示し、強い化学療法薬抵抗性を示す株が複数見出された。

本研究では DTP のクローンレベルでの運命追跡により、化学療法薬暴露後、静止状態を維持あるいは死滅する non-cycling persisters (以下「non-CPs」) と、増殖を続ける cycling persisters (以下「CPs」) に大別した。また、3D マトリックス培養ゲルからそれらを直接サンプリングする方法を確立し、遺伝子発現プロファイルの比較解析から化学療法薬による細胞死を回避する CPs の性質を特徴づけることを目的とした。

2 研究方法

本研究では、化学療法薬への感受性を既に評価していた 4 つの TCO 株(化学療法薬抵抗性株: TC08・TC021、化学療法薬感受性株: TC03・TC012)を使用した。

【方法 1】化学療法薬処理後の TCO クローンの多様性の評価

各々の TCO 株を CDDP 非存在下あるいは存在下で培養し、生存しているオルガノイドの経日的成長変化を観察した。また、Calcein-AM (生細胞染色用) / Propidium iodide (死細胞染色用) で染色し、3D フルフォーカス顕微鏡画像を取得後、個々のオルガノイドの面積値を定量した。

【方法 2】化学療法薬暴露による CPs の可視化

化学療法薬抵抗性株において化学療法薬の作用を回避し増殖するクローンの細胞分裂状態を確認するため、Calcein-AM/Hoechst33342 染色を用いて核の数を指標に個々のオルガノイドを構成する生存細胞

数を測定した。

【方法3】TC0 クローンの追跡と運命決定

タイムラプスイメージングを用いて化学療法薬抵抗性株由来の単一癌細胞の運命を追跡し、増殖を続けるクローンが化学療法薬処理中にどのような画像上の特徴を示すかを検討した。

【方法4】DTP 亜集団の精巧なピッキング方法の確立

DTP に含まれる CPs と non-CPs 亜集団の遺伝子発現プロファイルと比較解析するため、CELL HANLER™ (YAMAHA) を用いて、3D Matrigel 培養プレートから個々のオルガノイドを直接ピッキングする手法の確立を試みた。

【方法5】CPs および non-CPs の遺伝子発現プロファイルの比較

ピッキングした CPs と non-CPs から RNA-seq 用ライブラリーを調整し RNA-seq を行った。また遺伝子発現プロファイルの比較からそれらを特徴づけた。

3 研究成果

【結果1】化学療法薬暴露後の TC0 クローンの多様性

化学療法薬感受性 TC0 株を CDDP 存在下で培養すると、エンドポイント（7 日目）まで生き延びたほぼ全てのオルガノイドクローンは増殖を停止した「静止」状態であった。一方、化学療法薬抵抗性 TC0 株では、同条件下で様々なサイズのオルガノイドの出現を認め、増殖を続けるクローンが多く含まれることが明らかとなった。

【結果2】化学療法薬暴露による CPs の可視化

CDDP 存在下での培養 4 日目では、化学療法薬感受性 TC0 株の癌細胞クローンの大部分は単細胞のままであったが、化学療法薬抵抗性 TC0 株の一部のクローンは、2～8 個の細胞からなるオルガノイドを形成していることが判明した。

【結果3】TC0 クローンの追跡と運命決定

タイムラプスイメージングでのクローン追跡の結果、クローンごとに成長率が著しく異なっていた。また、同一クローンの培養 4 日目と 7 日目のオルガノイドサイズは正の相関を持つことが判明した。さらに、個々のクローンの遡及的追跡により CPs と non-CPs を特定し、それらのサイズ分布を解析することで、4 日目で CPs と non-CPs を正確に識別し得るオルガノイドサイズの境界値を見出した。この層別方法により CDDP 暴露下での化学療法薬抵抗性 TC0 株の CPs、non-CPs を早期かつ高精度に同定することが可能となった。

【結果4】DTP 亜集団の精巧なピッキング方法の確立

CELL HANLER™ のピッキング成功率（ピッキング成功数/ピッキング総数）は 48.2%～98.8%、平均成功率は 85.9% で、目的のオルガノイドを高精度にピッキングすることが可能であった。また、化学療法薬抵抗性 TC0 株から各株あたり合計 960 個の CPs と合計 1440 個の non-CPs を、化学療法薬感受性株から合計 1380～1440 個の non-CPs を回収した。

【結果 5】 CPs および non-CPs の遺伝子発現プロファイルの比較

CDDP 抵抗性との関連が報告されているトランスポーター関連遺伝子や DNA 修復関連遺伝子において、CPs と non-CPs 間でこれらの DNA 修復関連遺伝子の発現に差は認めなかった。Gene Set Enrichment Analysis では、CPs で細胞周期やコレステロール合成経路が促進していることが示され、一方で IFN 経路や低酸素シグナル伝達経路が抑制されていることが明らかとなった。これらの生物学的経路の変化は、同一 TC0 株内の CPs と non-CPs を比較した場合にも観察された。

4 考察

本研究では、舌癌患者ごとの癌細胞集団の特徴と不均一性を再現する TC0 ライブラリーを用いて、化学療法薬存在下で CPs の発生を同定し、その性質の解明を目指した。CPs は化学療法薬抵抗性 TC0 株を化学療法薬存在下で培養した時でのみ出現したが、non-CPs は化学療法薬感受性 TC0 株と抵抗性 TC0 株どちらにも出現した。CPs は化学療法薬処理中も増殖し、除去後さらに大きなオルガノイドに成長した。対照的に、non-CPs は小さいままであった。遺伝子発現解析の結果、non-CPs と比較して、CPs で IFN 経路と低酸素シグナル伝達経路が不活化されていることが明らかとなった。即ち、これら生物学的プロセスが確率的に抑制されることによって、化学療法薬曝露時に一部の癌細胞が CPs となっている可能性が示唆された。CPs は癌再発メカニズムを解明する上で鍵となる細胞亜集団と考えられ、今後、単一細胞レベルの遺伝子発現解析やエピジェネティック解析などによって CPs を誘導する上流分子メカニズムを明らかにできる可能性がある。将来的には、CPs を治療標的とする新薬の開発、CPs を指標とする患者ごとの予後予測等、個別化医療への応用が期待できる。

今回、我々の研究では、多様性を持つ癌細胞集団から特定のクローンを任意のタイミングで評価するため、CELL HANDLER™を使用した。この方法は、様々な癌オルガノイドモデルの解析に応用することが可能であり、また様々な抗腫瘍薬処理後に出現する DTP の増殖・生存メカニズム解明に極めて有用と考えられる。

5 結論

本研究は、これまで認識されていない化学療法後の癌再発メカニズムの存在と、それらを標的とする効果的な治療戦略の可能性を示唆するものである。

論文審査の結果の要旨

【研究内容】 がん細胞株を用いた研究では再現困難ながん微小環境におけるがん細胞の多様性をオルガノイドで再現することに成功した。そのオルガノイドを用いて薬物治療に伴い出現する Drug-tolerant persister (DTP) に関する研究手法を新たに確立した。DTP を示すオルガノイドは cycling persisters (CPs) を維持し、Interferon 経路と低酸素シグナル伝達経路が不活化されていることを新たな知見として発見した。

【学問的意義・新規性・独創性】 多様性を示すがん細胞が含まれるがん微小環境の生物学的活性の研究は従来のがん細胞株を用いた研究では限界があった。がん微小環境のがん細胞の生物学的活性の研究を進めるため、申請者の研究グループでは口腔がんのオルガノイド樹立に成功した。申請者はオルガノイドを用いて薬剤感受性の DTP の機序を研究し、新たな知見を見つけた。

【指摘事項】 1：研究方法の手法の記載が一部不十分である。他の研究者が追試を行う場合に再現がで

きない。十分な記載が必要。2：オルガノイドの化学療法薬接触時間の設定根拠の説明が不十分。根拠を示す経緯の説明が必要。3：DTP 集団の精巧な細胞 picking を証明するにあたり、分別回収した細胞の全ゲノム解析が必要ではないか。検討していただきたい。4：略語が多く読みにくい。略語一覧を作成する必要がある。5：結語を記載した方がよい。6：今回薬剤処理後も CPs を示すオルガノイドの解析を行い新たな知見を得たことは評価する。その一方で薬剤処理後に non-cycling persisters (non-CPs) を示すオルガノイドはがん幹細胞様生物学的活性を持ち合わせ、臨床的がん再発に関与していることも考察し、将来の研究課題として説明すべきである。7：細かな誤字の訂正。

【判断】合格：理由；がん細胞株を用いた研究では再現困難ながん微小環境におけるがん細胞の多様性をオルガノイドで再現することに成功した。そのオルガノイドを用いて薬物治療に伴い出現する DTP に関する研究手法を新たに確立した。薬剤接触後に示す CPs と non-CPs オルガノイドを picking で高精度に分離する手法は将来の様々な研究の一助となる。今回 DTP を示すオルガノイドは CPs を維持し Interferon 経路と低酸素シグナル伝達経路が不活化されていることを新たな知見として発見した。薬剤耐性機序の新たな知見である。non-CPs を示すオルガノイドは休眠状態のがん細胞を示すものであり、がん幹細胞類似の生物学的機序をもつ可能性がある。本研究において確立された手法と新たな知見は、将来的な発展性が強く期待されるものである。

最終試験の結果の要旨

【研究内容】がん細胞株を用いた研究では再現困難ながん微小環境におけるがん細胞の多様性をオルガノイドで再現することに成功した。そのオルガノイドを用いて薬物治療に伴い出現する Drug-tolerant persister (DTP) に関する研究手法を新たに確立した。DTP を示すオルガノイドは cycling persisters (CPs) を維持し、Interferon 経路と低酸素シグナル伝達経路が不活化されていることを新たな知見として発見した。

【学問的意義・新規性・独創性】多様性を示すがん細胞が含まれるがん微小環境の生物学的活性の研究は従来のがん細胞株を用いた研究では限界があった。がん微小環境のがん細胞の生物学的活性の研究を進めるため、申請者の研究グループでは口腔がんのオルガノイド樹立に成功した。申請者はオルガノイドを用いて薬剤感受性の DTP の機序を研究し、新たな知見を見つけた。

【指摘事項とその回答】1：研究方法における手技の記載が不十分な箇所がある。→適切な説明がされた。学位論文においては修正を指示した。2：オルガノイドに対する化学療法薬接触時間の設定根拠の説明が不十分。→先行研究の結果にもとづき適切な説明がされた。3：DTP 集団の精巧な細胞 picking を証明するにあたり、分別改修した細胞の全ゲノム解析が必要ではないか。→全ゲノム解析に代わり本研究で行われた手法の妥当性につき適切な説明がされた。4：略語が多く読みにくい。→略語一覧の作成を指示した。5：結語の記載を指示した。6：今回薬剤処理後も CPs を示すオルガノイドの解析を行い新たな知見を得たことは評価する。その一方で薬剤処理後に non-cycling persisters (non-CPs) を示すオルガノイドはがん幹細胞様生物学的活性を持ち合わせ、臨床的がん再発に関与している可能性がある。将来の研究課題として説明すべきである。→今後の研究テーマとしたい点が述べられた。7：細かな誤字の訂正を指示した。

【本学学位論文としての可否の判断】合格：理由；がん細胞株を用いた研究では再現困難ながん微小環境におけるがん細胞の多様性をオルガノイドで再現することに成功した。そのオルガノイドを用いて薬物治療に伴い出現する DTP に関する研究の新たな手法と新たな知見を発見した。薬剤接触後に示す CPs

と non-CPs オルガノイドを picking で高精度に分離する手法は今後の様々な研究の一助となる。DTP を示すオルガノイドは CPs を維持し Interferon 経路と低酸素シグナル伝達経路が不活化されていることを新たに発見した。いわゆる薬剤耐性機序の新たな知見を発見した。non-CPs を示すオルガノイドは休眠状態のがん細胞を示すものであり、がん幹細胞類似の生物学的機序をもつ可能性がある。本研究の将来的な発展性を強く期待するものである。

【総合的評価】学位論文内容と発表時におけるわかりやすい説明と質問に対する適切な回答は医学博士を授与するに十分値する。