

論文内容要旨

Molecular biological analysis of 5-FU-resistant gastric cancer organoids; KHDRBS3 contributes to the attainment of features of cancer stem cell
(5-FU 耐性胃癌オルガノイドの分子生物学的解析；
KHDRBS3 は癌幹細胞性の獲得に寄与する)
Oncogene, in press.

主指導教員: 安井 弥教授
(医系科学研究科 分子病理学)
副指導教員: 武島 幸男教授
(医系科学研究科 病理学)
副指導教員: 大上 直秀准教授
(医系科学研究科 分子病理学)

鵜飼 翔一

(医歯薬保健学研究科 医歯薬学専攻)

胃癌は我が国で罹患数 2 位死亡数 3 位の癌である。診断・治療技術の進歩に伴い治療成績は改善してきているが、化学療法の適応となる切除不能な進行例や切除術後の再発例では、抗癌剤化学療法に腫瘍が耐性を獲得して不応となる例が多い。5-FU は胃癌に対して 1st line として用いられる抗癌剤であり DNA 合成を阻害する代謝拮抗剤である。

癌においても正常の組織と同様に幹細胞が存在し、自己複製能及び多分化能を有することが知られている。癌幹細胞は抗癌剤投与時にフェノタイプを変化させながら生存することで化学療法に耐性を示すほか、転移巣成立の起源ともなるため、癌幹細胞の生物学的特性の解明は新規治療標的の開発につながるものと考えられる。

近年確立された幹細胞を中心とする組織培養法であるオルガノイドは、癌幹細胞を対象とした実験のモデルとして有用である。本研究ではこれまで報告のない胃癌幹細胞における薬剤耐性の機序について考察するため、5-FU に対する耐性を獲得したオルガノイドを作成し、遺伝子網羅解析を含む分子生物学的な解析を行った。胃癌細胞株に 5-FU 耐性を付与し、解析した報告はなされているが、オルガノイドについて人為的に薬剤耐性を付与し解析した研究結果の報告はこれまでにない。

本研究では、ヒト胃癌手術症例 10 例についてオルガノイドを樹立し、5-FU の IC50 を測定した。次に、5-FU に対して感受性のある胃癌オルガノイドに対して 5-FU を徐々に濃度を上げながら胃癌オルガノイドに曝露させ、4 例の 5-FU 耐性胃癌オルガノイドの樹立に成功した。5-FU 耐性胃癌オルガノイドにおいて、元となった胃癌オルガノイドと比較した際に、形態像の変化と 5-FU 代謝の主要な構成因子である TS、DPD の発現上昇を確認した。

続いて樹立した 3 症例の 5-FU 耐性胃癌オルガノイドとその親株の胃癌オルガノイドを材料にマイクロアレイを用いた網羅的遺伝子発現解析を行った。5-FU 耐性胃癌オルガノイドにおいて 2 倍以上の有意な発現上昇を認めた遺伝子は 23 個あり、そのうち特に 5-FU 耐性胃癌オルガノイドにおける発現が高い KHDRBS3 に着目した。KHDRBS3 の発現を 2 種類の 5-FU 耐性胃癌細胞株とその親株において検討した際に、耐性細胞株での発現上昇をほとんど認めないことから、KHDRBS3 は単に 5-FU 耐性に関与するのみでなく、幹細胞特異的に上昇する遺伝子であると考えられた。

胃癌 121 症例の腫瘍部において免疫組織化学的に KHDRBS3 の発現を検討し、5%以上の核に染色の認められた症例を陽性としたところ、59 例(49%)が陽性となった。KHDRBS3 の発現と臨床病理学的因子との有意な相関はなかった。一方、KHDRBS3 陽性症例は陰性症例と比べ有意に予後不良であり、単変量多変量解析の結果、KHDRBS3 は胃癌における独立予後不良因子であった。また、5-FU のプロドラッグであり本邦で広く使用されている TS-1 を術後投与された 50 例においても同様の結果が得られた。

KHDRBS3 を胃癌オルガノイドにおいて強制発現し、または 5-FU 耐性胃癌オルガノイドにおいてノックアウトして機能解析を行ったところ、KHDRBS3 は胃癌幹細胞マーカーである CD44 のエクソン 8,9 を含まないバリエント及び癌細胞の多剤耐性に関わる MRP1(ABCC1)を発現上昇させることが明らかになった。また、KHDRBS3 は 5-FU への耐性に加え、胃癌における主要な抗癌剤である L-OHP、FTD への耐性をも付与し、オルガノイド形成を促進することを示された。また、KHDRBS3 のノックアウトを行った 5-FU 耐性オルガノイドとコントロールの 5-FU 耐性オルガノイドを免疫不全マウスに異種移植した結果、KHDRBS3 のノックアウトによる腫瘍形成能及び肺転移巣形成能の低下を確認した。

以上より、KHDRBS3 は 5-FU を中心とする化学療法の効果及び予後予測のバイオマーカーとして有用とみなされた。In vitro, In vivo での検討結果から、幹細胞の維持を介した薬剤抵抗性への関与が示唆されたことから、化学療法抵抗性胃癌の治療標的としても有用であると考えられた。