

論文審査の結果の要旨

博士の専攻分野の名称	博士（ 医学 ）	氏名	鶴飼 翔一
学位授与の条件	学位規則第 4 条第①・2 項該当		
論文題目 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)			
論文審査担当者			
主査	教授	伊藤 公訓	印
審査委員	教授	檜山 英三	
審査委員	准教授	岡本 渉	
〔論文審査の結果の要旨〕			
<p>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は根治が困難であり、腫瘍が抗癌剤に耐性を獲得して不応となる例が多い。一方、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 (5-fluorouracil) 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。5-FU は DNA 合成を阻害する代謝拮抗剤であり、切除不能進行胃癌に対してファーストラインで用いられる抗癌剤である。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。</p> <p>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-</p>			

FU代謝の主要な構成因子である thymidylate synthase、dihydropyrimidine dehydrogenase 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、単変量及び多変量解析の結果、KHDRBS3は胃癌における独立した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 (Tegafur/Gimeracil/Oteracil)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、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と9を含まないバリエーション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 (Oxaliplatin)、FTD (Trifluridine)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が確認された。

以上の結果から、本論文はKHDRBS3が胃癌における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であり、癌幹細胞の維持を介した薬剤抵抗性への関与を示唆した点で高く評価される。

よって審査委員会委員全員は、本論文が著者に博士(医学)の学位を授与するに十分な価値あるものと認めた。