

論文内容要旨

Establishment of a novel overlay culture method that enables immune response assessment using gastric cancer organoids

(免疫応答の評価を可能とする胃癌オルガノイドの新規培養法の確立)

Heliyon,10(1),2024, in press.

主指導教員：大段 秀樹教授

(医系科学研究科 消化器・移植外科学)

副指導教員：安達 伸生教授

(医系科学研究科 整形外科学)

副指導教員：田邊 和照教授

(医系科学研究科 周手術期・クリティカル開発学)

太田 浩志

(医歯薬保健学研究科 医歯薬学専攻)

胃癌の治療成績は手術手技や化学療法の発展により向上しつつあるが、未だ改善の必要がある。近年、免疫チェックポイント阻害薬の開発によりさらなる予後改善が期待されているが、免疫チェックポイント阻害薬は効果を認める患者には大きな治療効果をもたらす反面、効果を示さない患者にはほぼ治療効果がなく、バイオマーカーの同定もいまだ十分ではない。近年、*in vitro*で患者胃癌組織を3次元的に再現できるオルガノイドの研究が発展してきており、オルガノイドと免疫細胞の共培養の報告もなされてきている。しかし、オルガノイドを3次元培養するためには基底膜を模した細胞外マトリックスにオルガノイドを完全包埋する必要があり、その細胞外マトリックスが免疫細胞の侵入を阻害し、免疫細胞と胃癌オルガノイドが十分な接触できないという問題がある。

この度、我々は胃癌オルガノイドをマトリゲルの内部に包埋するのではなく、あえてwell底をマトリゲルでコーティングした表面で胃癌幹細胞を培養したところ、マトリゲルに包埋しなくても上方に向かって3次元的に成長することを発見した。この培養法での胃癌オルガノイドはマトリゲル表面に露出するように成長しており、免疫細胞と共培養すると、胃癌オルガノイドと免疫細胞が自由に、さらに十分に接触できることを確認し、この新規オルガノイド培養方法をオーバーレイ培養法と名付けた。

オーバーレイ培養法の胃癌オルガノイドは通常培養法の胃癌オルガノイドと同様に3次元構造を維持しており、またこの二つの培養法の胃癌オルガノイドはマイクロアレイにおいても解析遺伝子のうち17,818/17,834 (99.91%)が同様のmRNA expression levelを示しており、HE染色や免疫染色においても同じ表現型を呈しており、オーバーレイ培養法の胃癌オルガノイドは通常培養法の胃癌オルガノイドとほぼ同等の性質を維持していることも証明した。さらにこれらは手術時に採取した胃癌検体とも同一の表現型を維持していることも証明した。

この患者の胃癌の性質を再現したオーバーレイ培養法での胃癌オルガノイドを用いて免疫細胞との共培養を行い、組織傷害性試験を行った。まずは健常人のPeripheral Blood Mononuclear Cell (PBMC) と胃癌オルガノイドを共培養したところ、PBMCにより66.1%の胃癌オルガノイドの組織破壊を呈した。続いて、同様に健常人のNatural Killer (NK) 細胞と胃癌オルガノイドを共培養したところ、55.1%の胃癌オルガノイドの組織破壊を呈した。最後に、胃癌患者から胃癌オルガノイドを樹立し、その同一胃癌患者血液由来のNK細胞と共培養したところ、患者由来NK細胞により91.6%の胃癌オルガノイドの組織障害性を呈することを証明した。さらに、その組織障害の様子をタイムラプスでも撮影することに成功し、時間の経過に伴う免疫応答と組織破壊のリアルタイムでの観察が可能となった。

また一方で胃癌患者の正常胃粘膜組織由来のオルガノイドに対しては胃癌NK細胞が傷害性を呈さないことも証明し、このオーバーレイ培養法は免疫細胞による組織障害性の評価には有用なモデルであると考えられる。

本研究において患者血液を用いて検討したのはNK細胞との共培養のみであり、免疫細胞の機能評価も行っていないが、他の免疫細胞との共培養も可能であり、このオルガノイド培養法での胃癌オルガノイドと免疫細胞の共培養により体内で起こりうる免疫応答での組織破壊を*in vitro*において繰り返し評価が可能となった。

今後は免疫チェックポイント阻害薬などの治療効果予測やバイオマーカーの検索への応用ができる可能性もあるモデルであると考えている。