

氏名	いのまた ゆうし 猪股 優志
学位の種類	博士(医学)
学位授与年月日	2023年3月24日
学位授与の条件	学位規則第4条第1項
研究科専攻	東北大学大学院医学系研究科(博士課程)医科学専攻
学位論文題目	3次元オルガノイド培養モデルを用いた大腸腫瘍と線維芽細胞の相互関係の検討
論文審査委員	主査 教授 正宗 淳 教授 布施 昇男 教授 伊藤 明宏

## 論文内容要旨

氏名：猪股 優志

本文：

### 1) 研究背景

癌関連線維芽細胞は大腸癌微小環境の代表的な構築因子であり、その起源は正常線維芽細胞が有力視される。大腸癌は前癌病変である腺腫を経る adenoma-carcinoma-sequence が立証された癌腫であり、長い発育過程の中で腺腫、早期大腸癌とどのような相互関係を構築しているかは不明である。2009年に三次元オルガノイド培養システムが報告され、これまで用いられてきた大腸癌細胞株のみならず正常腸管上皮や大腸腺腫も培養することが可能となり、正常線維芽細胞と組み合わせることで早期病変を含めた大腸腫瘍との腫瘍形成早期からの微小環境応答の解析が可能であると考えた。

### 2) 目的

三次元構造を形成し in vitro で生体内に近い状態となるオルガノイド長期培養システムを用い、大腸オルガノイドと大腸正常線維芽細胞との共培養系を構築し、腫瘍発育に伴う線維芽細胞の応答を明らかとすること。

### 3) 研究方法

内視鏡的切除検体、及び外科切除検体から大腸正常上皮オルガノイド、大腸腺腫オルガノイド、大腸癌オルガノイド、及び大腸正常線維芽細胞(3症例)を樹立し、オルガノイドと正常線維芽細胞に対してトランスウェルインサートを介した共培養を行った。共培養後のオルガノイドを観察し細胞生存能を評価し、更に正常線維芽細胞のマイクロアレイ解析を行った。共培養を行った大腸腫瘍オルガノイドの腫瘍進行度に沿って発現が亢進する遺伝子を候補として、non-advanced adenoma 27例、advanced adenoma 25例、進行癌 56例に対して免疫組織化学染色を行い組織中の発現を解析した。腫瘍発育早期から組織学的発現を認めた DKK1 に対して、advanced adenoma 患者 17症例、進行癌患者 32症例の血清を用いた発現の解析、及びヒト大腸癌細胞株 HCT116 細胞を用いた機能解析を行った。

### 4) 研究結果

オルガノイドの平均径は、正常上皮オルガノイドでは単独培養で 146.2 $\mu$ m、3種類の正常線維芽細胞との共培養でそれぞれ 338.9 $\mu$ m、205.8 $\mu$ m、236.3 $\mu$ m となり、腺腫オルガノイドでは単独培養で 86.5 $\mu$ m、共培養でそれぞれ 308.3 $\mu$ m、242.9 $\mu$ m、227.1 $\mu$ m と、いずれも共培養群で増大を認めた。一方癌オルガノイドでは単独培養では 138.1 $\mu$ m、共培養では 140.2 $\mu$ m、133.5 $\mu$ m、115.9 $\mu$ m といずれも変化を認めなかった。オルガノイドの細胞生存能は、正常上皮単独を 1 とすると、3種類の正常線維芽細胞と共培養後の平均値は順に 2.78、1.56、2.24、腺腫単独を 1 とすると共培養後の平均

(書式 1 2)

値は 3.03、2.98、2.33 であり、いずれにおいても共培養群で亢進を認めた。一方、癌単独を 1 とすると、3 種類の正常線維芽細胞と共培養後の平均値は順に 1.42、0.91、0.59 となり変化は認めなかった。正常線維芽細胞のマイクロアレイ解析では、腺腫オルガノイドとの共培養、癌オルガノイドとの共培養とで段階的に発現が亢進する 18 遺伝子を認め、この中で **Wnt signaling** に関連する **DKK1** に着目した。内視鏡切除標本、外科切除検体に対する免疫組織化学染色により、**DKK1** が腫瘍発育早期から腫瘍間質で発現していることを認めた。平均の血清中 **DKK1** 濃度は、進行癌患者群 1863.5 pg/mL、対照群 504.8 pg/mL と進行癌患者で高値であり、また、advanced adenoma の段階でも内視鏡的切除後に低下することを認めた。**HCT116** 細胞に対して **DKK1 recombinant protein** を添加したところ、平均の **OD value** は添加群、非添加群それぞれ 1.34、1.66 と細胞増殖能の低下を認め、**DKK1** の **siRNA** トランスフェクションを行うことで **siRNA** 群、コントロール群で平均の **OD value** がそれぞれ 0.93、0.74 と上昇を認めた。

#### 5) 結論

大腸腫瘍の発育過程において、腫瘍の進行度により、線維芽細胞から受ける影響が異なることが示唆された。また、腫瘍形成早期から線維芽細胞は **DKK1** を発現し腫瘍抑制的に機能する可能性が示された。

## 審査結果の要旨

博士論文題目 3次元オルガノイド培養モデルを用いた大腸腫瘍と線維芽細胞の相互関係の検討

所属専攻・分野名 医科学専攻 ・ 消化器病態学分野

氏名 猪股 優志

【研究背景】癌関連線維芽細胞は大腸癌微小環境の代表的な構築因子であり、その起源は正常線維芽細胞が有力視されるが大腸癌の長い発育過程の中でどのような相互関係を構築しているかは不明である。近年三次元オルガノイド培養が報告され、大腸癌細胞株のみならず正常腸管上皮や大腸腺腫も培養することが可能となり、正常線維芽細胞と組み合わせることで早期病変を含む大腸腫瘍との腫瘍形成早期からの微小環境応答の解析が可能と考えた。

【目的】大腸オルガノイドと大腸正常線維芽細胞との共培養系を構築し、腫瘍発育に伴う線維芽細胞の応答を明らかとすること。

【研究方法】臨床検体から大腸正常上皮、大腸腺腫、大腸癌由来のオルガノイド、及び大腸正常線維芽細胞を樹立し、各オルガノイドと正常線維芽細胞に対して共培養を行った。共培養後のオルガノイドを観察し細胞生存能を評価し、更に正常線維芽細胞のマイクロアレイ解析を行った。共培養を行った大腸腫瘍オルガノイドの腫瘍進行度に沿って発現が亢進する遺伝子を候補として、腺腫、癌の切除標本に対して免疫組織化学染色を行い組織発現を解析した。腫瘍発育早期から発現を認めた DKK1 に対し、advanced adenoma 患者、進行癌患者の血清を用いた発現の解析、及びヒト大腸癌細胞株 HCT116 細胞を用いた機能解析を行った。

【研究結果】オルガノイドの平均径や細胞生存能は、正常上皮オルガノイドと腺腫オルガノイドでは各正常線維芽細胞と共培養を行うことで増大していた一方、癌オルガノイドでは変化を認めなかった。正常線維芽細胞のマイクロアレイ解析では 18 の候補遺伝子を同定し、この中で DKK1 に着目し免疫組織化学染色では DKK1 が腫瘍発育早期から腫瘍間質で発現していることを認めた。血清中 DKK1 濃度は、進行癌患者群は対照群と比較して高値であり、更に advanced adenoma の段階でも内視鏡的切除後に低下することを認めた。HCT116 細胞に対して DKK1 recombinant protein を添加したところ細胞増殖能の低下を認め、DKK1 の siRNA を行うことで細胞増殖能の上昇を認めた。

【結論】大腸腫瘍の発育過程において、腫瘍の進行度により線維芽細胞から受ける影響が異なることが示唆された。また、腫瘍形成早期から線維芽細胞は DKK1 を発現し腫瘍抑制的に機能する可能性が示された。

第一次審査によって指摘された点に関しては適切に修正されている。本研究は、オルガノイドと正常線維芽細胞を用いた共培養を行うことで DKK1 を含む腫瘍早期段階の応答について解析した意義深い論文である。よって、本論文は博士（医学）の学位論文として合格と認める。