

学位論文審査の結果の要旨

審査区分 (課)・論	第694号	氏名	木下慶亮
審査委員会委員		主査氏名	石井 友理 
		副査氏名	河野 寛司 
		副査氏名	河野 康志 
<p>論文題目</p> <p>Efficient establishment of bile-derived organoids from biliary cancer patients (胆道癌患者から胆汁由来オルガノイドの効率的な樹立)</p> <p>論文掲載雑誌名 Laboratory Investigation</p> <p>論文要旨</p> <p>胆道癌は世界的に増加傾向であり、予後不良の癌の1つである。胆道癌初期は無症候性であるため、早期発見が困難であり、多くの患者が手術不能となり、化学療法の適応になる。現在、胆道癌全般に、殺細胞性抗癌剤や免疫チェックポイント阻害剤で治療する開発も進められている一方で、がんの遺伝子異常を調べて分子標的薬で治療する個別化治療は、様々な胆道部位の癌が混在する胆道癌では大きな期待が寄せられている。そのため、多くの研究者が患者由来の胆道癌細胞を用いたオルガノイドの樹立に注目している。</p> <p>オルガノイドは「ミニ臓器」と言われる三次元構造体であり、従来研究で用いられてきた二次元での細胞培養よりも生体内の細胞状態に近いとされ、患者の癌組織から作り出された癌オルガノイドは、癌モデルとして様々な研究への応用が期待されている。そこで本研究では、本学附属病院を含む6施設で診断・治療のために ERCP を受けた手術不能症例を含む胆道癌 68 症例から採取した胆汁を用いオルガノイド培養が可能であるかについて検証を行った。</p> <p>胆道癌 68 症例から採取した胆汁を用いてオルガノイドの樹立を試みたところ、極めて高確率 (60/68 例 (88.2%)) で樹立することが出来た。樹立したオルガノイドの形態を観察したところ、既報と同様に、単純性嚢胞、多嚢胞性嚢胞、厚被膜によって覆われた嚢胞、充実性集塊など多様な形態のオルガノイドが得られた。これらオルガノイドは、癌細胞由来の癌オルガノイドに加え、正常胆道上皮細胞由来のオルガノイドも含まれていることが判明した。そこで、正常胆道上皮細胞由来のオルガノイドを選択的に除去し、癌細胞由来のオルガノイドを濃縮するために、TP53 変異を有するオルガノイドに対して、継代、免疫不全マウスへの移植、MDM2 阻害薬添加の3方法を検討した。その結果、これらいずれの方法も正常胆道上皮オルガノイドの除去と胆道癌オルガノイド濃縮に有効であることが判明した。</p> <p>本研究では、本論文で用いた手法を用いることで、手術不能例を含むほぼすべての胆道癌患者から採取した胆汁を用いて高純度の癌オルガノイドの樹立が可能であることを報告している。さらに、癌オルガノイドの濃縮方法の確立は、個々の患者の体外モデルとして癌個別化医療への応用に道を拓くとともに、新規薬物療法開発・創薬に大いに資することが期待されるものである。</p> <p>このため、審査員の合議により本論文は学位論文に値するものと判定した。</p>			

最終試験
の結果の要旨
~~学力の確認~~

審査区分 (課)・論	第694号	氏名	木下慶亮
審査委員会委員	主査氏名	石崎 敏理 	
	副査氏名	河野 憲司 	
	副査氏名	河野 康志 	
<p>学位申請者は本論文の公開発表を行い、各審査委員から研究の目的、方法、結果、考察について以下の質問を受けた。</p> <ol style="list-style-type: none"> 1. Organoidの作成培地は無血清なのに、胆汁から集めた細胞の wash medium に FBS 添加の理由 2. ひとつの Organoid は胆汁中に浮遊する単一の細胞からできるのか、あるいは複数の細胞塊からできるのか？ 細胞集塊からひとつの Organoid が形成される可能性はないか。 3. Organoid の継代方法について説および継代2代目以降で Organoid の数が増えるのは何故か。 4. XDO には間葉系細胞が入っていないことは確認しているか。 5. Organoid をつくるのに3~5週間を要するとのことであるが、臨床応用する場合にこの期間の治療はどのようにすると考えているか。もしこの期間に化学療法を行えば、Organoid ができる頃には原発腫瘍の性質（抗癌剤感受性など）が変わってしまっているだろう。それについての見解は。 6. 胆管がんの診断はこれまでどのようにしていたのか。胆汁中の細胞診等を行うのか。 7. 培養液に添加する試薬（EGF、Forskolin 等）の必要性とそれを減量した場合の影響。 8. 今後の実験ため、作成された Organoid の保存について。 9. 作成されたオルガノイドの形態と胆道がんの発生部位とは関連があるか。また、Organoid の形態は乳頭状増殖や管腔形成をするがんの形態と関連はあるか。 10. がん組織は上皮細胞と間質細胞から構成されているが、論文では Organoid は上皮のみで構成されている。今後、Organoid を動物実験に用いる場合、間質の有無の影響についての見解。 11. 査読者からのコメントで対応に難渋した点は。 12. このような方法で樹立した Organoid は癌の特性である Heterogeneity が失われてしまうように思えるが、その点に関する見解は。 13. この Organoid は複数の細胞由来であるが故、形態が異なるものが得られるのではないか。 14. 個別化医療に資するということであるが、実際に新しい作用機序の薬物のスクリーニングにどの程度貢献できるのか。また、その成功例（臨床試験に入っている例）はあるのか。 <p>これらの質疑に対して、申請者は概ね適切に回答した。よって審査委員の合議の結果、申請者は学位取得有資格者と認定した。</p>			

(注) 不要の文字は2本線で抹消すること。

学 位 論 文 要 旨

氏名 木下 慶亮

論 文 題 目

Efficient establishment of bile-derived organoids from biliary cancer patients

(胆道癌患者から胆汁由来オルガノイドの効率的な樹立)

要 旨

ア. 緒言

胆道癌は世界的に増加傾向で、予後不良な癌である。また、胆道癌は初期段階では無症候性であり、早期の発見が困難であるため、患者の大半が手術不能となり、化学療法の適応となるため、個々の患者に対してより有効な新しい治療法の需要が高まってきている。そこで、本研究では、ほぼ全ての胆道癌患者から採取される胆汁に着目して、胆汁を用いたオルガノイド培養が可能であるか検討したので報告する。

イ. 研究対象及び方法

今回、我々は、大分大学医学部附属病院を含む計6施設で診断・治療のために内視鏡的逆行性胆管膵管造影（ERCP）を受けた手術不能例を含む胆道癌68症例から採取した胆汁を用いて、症例毎に胆汁由来オルガノイド（BDOs）を樹立できるか検討した。

ウ. 結果

胆道癌患者 68 症例から細胞診目的で採取された胆汁を用いてオルガノイド樹立を試みたところ、60 症例 (88.2%) で成功した。残りの 8 例は、併発していた胆管炎に伴う細菌混入のためオルガノイド樹立できなかった。樹立したオルガノイドは手術組織から胆道癌オルガノイドを樹立した過去の報告と同様に、胆汁由来オルガノイドも単純性嚢胞や多嚢胞性嚢胞、厚い被膜を伴う嚢胞、充実性の集塊など多様な形態を示した。また、その樹立したオルガノイドの KRAS 遺伝子変異と TP53 遺伝子変異の頻度はそれぞれ 15%、55%であった。ほとんどの胆汁由来オルガノイドで、癌細胞由来の癌オルガノイドとともに正常胆道上皮由来のオルガノイドも含まれていた。

そこで、胆汁由来オルガノイドの中に混入している正常胆道上皮オルガノイドを選択的に除去し、癌細胞由来の胆道癌オルガノイドを濃縮するために、TP53 変異を有する胆汁由来オルガノイドに対して、①継代の繰り返し、②免疫不全マウスへの移植、③MDM2 阻害剤添加による選択、の 3 つの方法を試みた。その結果、いずれの方法も正常胆道上皮オルガノイドの除去と胆道癌オルガノイドの濃縮に有効であることを確認した。

エ. 考察

本研究では、手術不能例を含むほぼ全ての胆道癌患者から低侵襲で高純度の胆道癌オルガノイドを樹立できることを示している。今後、胆汁由来オルガノイドの特性解明と濃縮方法の改良を行うことで、個々の患者の体外モデルとして個別化医療に応用できるとともに、進行性・切除不能な胆道癌に対する新規薬物療法の開発に貢献することが期待される。

オ. 結語

胆道癌患者から採取した胆汁を用いて、手術不能例を含むほぼ全ての胆道癌患者から高純度の胆道癌オルガノイドを効率的に樹立できることを示した。