

## 博士論文の要旨及び審査結果の要旨

氏名 風間 明  
学位 博士 (医学)  
学位記番号 新大院博 (医) 第 1063 号  
学位授与の日付 令和 4 年 3 月 23 日  
学位授与の要件 学位規則第 4 条第 1 項該当  
博士論文名 Development of patient-derived tumor organoids and a drug testing model for renal cell carcinoma.  
(腎細胞癌オルガノイドの樹立と薬剤スクリーニングモデルへの応用)

論文審査委員 主査 教授 西條 康夫  
副査 教授 味岡 洋一  
副査 講師 笠原 隆

### 博士論文の要旨

背景・目的： 現在腎細胞癌の治療法は分子標的薬、免疫チェックポイント阻害剤など多岐にわたり、腎細胞癌患者の生存成績を向上させるためには有効な治療薬を適切に選択することが重要である。また、近年マトリゲルを用いた組織培養技術の進歩により、癌細胞由来の腫瘍オルガノイドモデルを作成することが可能となってきた。腫瘍オルガノイドは、もとの腫瘍の生体内での特性と細胞の不均一性を模倣した、腫瘍組織に由来する 3 次元組織様の癌細胞クラスターであり、これまでに前立腺癌、肺癌、膵癌、膀胱癌などで腫瘍オルガノイド樹立の報告がなされている。本研究の目的は、腎細胞癌患者由来の腫瘍オルガノイドを樹立し、それを用いた *ex vivo* での薬物感受性試験法を開発することである。

方法： 2018 年から 2020 年の間に新潟大学医歯学総合病院で腎細胞癌に対して腎摘除術または腎部分切除術を施行された 20 症例から腫瘍サンプルを採取し、切除した腫瘍組織から生体外で腫瘍オルガノイドを作成培養した。その病理組織学および分子生物学的特徴を HE 染色と免疫組織化学染色、および全エクソーム解析で評価した。また、MTS アッセイ法を用いて、腎細胞癌の治療に用いられる標準的なチロシンキナーゼ阻害剤 (TKI) の腫瘍オルガノイドに対する治療効果を評価した。

結果： 20 例の腎癌症例のうち 1 例を除くすべてが淡明細胞癌であり、約半数 (9/20) は Fuhrman grade  $\geq 3$  の高悪性度の癌であった。20 例のうち 15 例で腫瘍オルガノイド作成、培養することに成功した。また、樹立したオルガノイドは凍結保存後に再培養することも可能であった。オルガノイドは癌細胞が密集したクラスターを形成しながら成長した。HE 染色では原発巣とオルガノイドとの組織学的特徴に高度な類似性が認められた。またアポトーシス関連分子である Bcl-2 の免疫組織化学染色では原発巣、腫瘍オルガノイドともに一致して高発現していることがわかった。さらに、もとの腎細胞癌と作成した腫瘍オルガノイドが移転的特徴を保持しているかどうかを調べるために、NovaSeq 6000 システムを用いて全エクソーム解析を行った。変異遺伝子についてパネル化して評価した結果、遺伝子変異は癌組織とオルガノイドとの間で 94~61% で一致していた。von Hippel-Lindau (VHL) 遺伝子や polybromo 1 (PBRM1) 遺伝子の変異など、腎細胞癌で一般的に認められる遺伝子変異に関しても腫瘍と対応するオルガノイドで保持されていた。これらの結果から、

患者由来の腫瘍オルガノイドは腎癌組織の生体外モデルとなりうることが示唆された。また、4系統の腫瘍オルガノイドを用いて、腎癌治療に用いられる TKI であるスニチニブ、アキシチニブ、パゾパニブ、ソラフェニブ、カボザンチニブについて細胞増殖抑制効果を評価した。その結果、TKI の GI50 値は 2~50  $\mu$ M の範囲にあることがわかった。また、臨床的な有効濃度と各薬剤の GI50 を比較した結果、オルガノイドが一部の TKI に対して耐性を示す可能性が示唆された。

考察・結論：今回申請者らが樹立した腫瘍オルガノイド培養方法と薬剤感受性試験モデルは、腎細胞癌に対する外科的切除後に再発をきたした症例の一次治療法選択や、転移性腎細胞癌の一次治療中に進行した症例の二次治療の決定に大変有用であると考えられる。この新しいアプローチは、腫瘍由来オルガノイドを効率的かつ迅速な培養を可能にし、がん患者に最適な個別化された治療を提供することができる。また、本研究で用いたオルガノイド培養液は高価なサプリメント (Noggin、ガストリン、R-spondin、Wnt3A など) を使用しておらず、シンプルな組成の培養液で腫瘍オルガノイドを樹立培養することに成功した。この結果には腫瘍標本の質や、腎癌組織のもつ腫瘍増殖能などが影響していた可能性が考えられる。本研究は、腫瘍オルガノイドを用いて TKI の細胞増殖抑制効果を評価することにより、腎細胞癌患者に最適な治療法を選択する方法の開発を初めて実証したものである。この腫瘍オルガノイドの限界として、TKI がもつ血管新生阻害作用がもたらす抗腫瘍効果に関しての評価が困難であるという点が挙げられる。腫瘍血管や、がん関連免疫細胞などのがん微小環境を再現した腫瘍オルガノイドモデルの樹立を目指したさらなる研究が待ち望まれる。以上、本研究では腎細胞癌患者の個別化治療法を選択するための薬剤試験モデルとして、患者由来腫瘍オルガノイドの培養法を開発し、治療効果を ex vivo で評価するための新しいアプローチを提示した。

#### 審査結果の要旨

マトリゲルを用いた組織培養技術の進歩により、癌細胞由来の腫瘍オルガノイドモデルを作成することが可能となってきた。本研究の目的は、腎細胞癌患者由来の腫瘍オルガノイドを樹立し、それを用いた ex vivo での薬物感受性試験法を開発することである。腎摘除・腎部分切除術を施行された 20 症例から腫瘍サンプルを採取し、腫瘍オルガノイドを作成培養した。その病理組織学および分子生物学的特徴を HE 染色と免疫組織化学染色、および全エクソーム解析で評価した。また、チロシンキナーゼ阻害剤 (TKI) の腫瘍オルガノイドに対する治療効果を評価した。

20 例のうち 15 例で腫瘍オルガノイド作成、培養することに成功した。HE 染色で原発巣とオルガノイドとの組織学的特徴に高度な類似性が認められた。腎細胞癌と作成した腫瘍オルガノイドを NovaSeq 6000 システムを用いて全エクソーム解析を行った。変異遺伝子についてパネル化して評価した結果、遺伝子変異は癌組織とオルガノイドとの間で 94~61% で一致していた。また、4 系統の腫瘍オルガノイドを用いて、スニチニブ、アキシチニブ、パゾパニブ、ソラフェニブ、カボザンチニブについて細胞増殖抑制効果を評価した。その結果、TKI の GI50 値は 2~50  $\mu$ M の範囲にあり、オルガノイドが一部の TKI に対して耐性を示す可能性が示唆された。

本研究では腎細胞癌患者の個別化治療法を選択するための薬剤試験モデルとして、患者由来腫瘍オルガノイドの培養法を開発し、治療効果を ex vivo で評価するための新しいアプローチを提示しことから、十分に学位論文としての価値があると判断する。