

論文内容要旨

論文題目

超音波内視鏡下穿刺吸引生検より得られた患者由来膵癌オルガノイドにおける薬剤感受性試験の有用性の検討

責任講座： 内科学第二 講座
氏名： 小山 創志

【内容要旨】(1,200字以内)

【背景】近年、膵癌に対する術前化学療法が切除単独治療と比較して予後の改善に寄与する事が示され、膵癌診療における化学療法の重要性がさらに高まっている。オルガノイドは、人為的に創出された臓器に類似した組織体であり、組織学的性質を維持したまま培養・継代が可能である。オルガノイドを作成するために膵癌組織を採取する方法として、超音波内視鏡下穿刺吸引生検 (EUS guided fine needle aspiration: EUS-FNA) があるが、近年、EUS-FNA 検体由来の膵癌オルガノイドに化学療法薬を投与することで薬剤感受性評価が可能と報告されており、個別化医療への応用が期待されている。今回私は、膵癌の EUS-FNA 検体より作成したオルガノイドを用いた薬剤感受性評価、およびトランスクリプトーム解析を行い、化学療法薬の感受性評価に用いる新規マーカーを同定する事を目的とした。

【方法】2020年3月～2023年3月の期間に当院で診療した膵癌症例15例の EUS-FNA 検体から膵癌オルガノイドを作成した。オルガノイドより DNA を抽出し、Comprehensive Cancer Panel (CCP) で評価可能な約400遺伝子に関して次世代シーケンサーによる変異解析を行った。また、オルガノイドに化学療法薬を投与し、得られた細胞生存率から用量反応曲線を導き曲線化面積 (Area Under the Curve : AUC) を計算し、薬剤感受性の指標とした。また、次世代シーケンサーでトランスクリプトーム解析を行い、膵癌オルガノイドの発現遺伝子データと薬剤感受性結果においてピアソンの相関解析を行い、P value < 0.001 の条件で遺伝子を絞りこみ NMF 解析を行った。NMF 解析の結果から、Normalized AUC 値と対応が見られた遺伝子群に対して、GO enrichment 解析、Pathway enrichment 解析 (FDR による adjusted P value < 0.05) を行い、得られた遺伝子に対して、Normalized AUC 値と回帰解析を行った。

【結果】CCP ではすべての膵癌オルガノイドに KRAS 変異が発現しており膵癌の遺伝子変異を反映していると考えられた。各種 enrichment 解析では、Gemcitabine (以下 GEM) 抵抗性と関連する遺伝子として BARD1 と RAD50、Gemcitabine+Paclitaxel (以下 GEM+PTX) 抵抗性と関連する遺伝子として SLC25A10 と MAP3K9 が同定された。回帰解析でもそれぞれの遺伝子の発現量が増加すると各化学療法薬の抵抗性が上昇する傾向を認めた。

【結論】EUS-FNA 検体より樹立した膵癌オルガノイドを用いた薬剤感受性評価は安定して施行可能であった。GEM および GEM+PTX の抵抗性に関連する遺伝子として BARD1、RAD50 および SLC25A10、MAP3K9 が同定された。治療薬選択に有益な情報となりうるか、今後は臨床結果とあわせた検討が必要である。

山形大学大学院医学系研究科長 殿

学位論文審査結果報告書

申請者氏名：小山 創志

論文題目：超音波内視鏡下穿刺吸引生検より得られた患者由来膵癌オルガノイドにおける
薬剤感受性試験の有用性の検討

審査委員：主審査委員 杵本 昌彦



副審査委員 浅尾 裕信



副審査委員 山口 浩明



審査終了日： 令和5年 12月 18日

【 論 文 審 査 結 果 要 旨 】

近年、膵癌に対する術前化学療法が切除単独療法と比較して予後改善に寄与することが示され、膵癌治療における化学療法の重要性が再認識されている。オルガノイドは人為的に創出された臓器に類似した組織体であり、その性質を維持したまま培養・継代が可能であるが、申請者は超音波内視鏡下穿刺吸引生検(EUS guided fine needle aspiration: EUS-FNA)により採取された検体から作成したオルガノイドを用いて薬剤感受性評価と同時にトランスクリプトーム解析を行い、新たな薬剤感受性評価に応用可能な新規マーカーの同定を目的として本研究を立案した。

2020年3月-2023年3月までに当院で診療した膵癌症例15例のEUS-FNA検体からオルガノイドを作成した。これらに対し、実臨床で化学療法に用いられるgemcitabine (GEM)、paclitaxel (PTX)ならびにGEM+PTXを9段階の濃度に分けて投与し、細胞生存率を算出した。細胞生存率を元に用量反応曲線を導出し、曲線下面積(area under curve :AUC)を算出し、薬剤感受性指標とした。また、オルガノイドから抽出したDNAをcomprehensive cancer panel (CCP)で評価可能な約400遺伝子に関し、次世代シーケンサーによる変異解析を行った。同時にトランスクリプトーム解析を行い発現遺伝子と薬剤感受性結果とのピアソン相関解析を行った。さらに候補遺伝子を絞り込み、NMF解析にて対応が見られた遺伝子群に対しGC enrichment解析・pathway enrichment解析を行った。この結果、得られた複数の候補遺伝子に対してnormalized AUC値との回帰解析を行った。

CCPではすべての膵癌オルガノイドにKRAS変異が発現しており、膵癌の遺伝子変異を反映していた。各種enrichment解析ではGEM感受性低下に関与する遺伝子としてBARD1とRAD50が、GEM+PTX感受性低下に関与する遺伝子としてSLC25A10とMAP3K9が同定された。遺伝子とnormalized AUC値との回帰解析ではそれぞれの遺伝子発現量増加とともに各化学療法の薬剤感受性が低下する傾向を認めた。

申請者の研究はEUS-FNA由来検体から構築された膵癌オルガノイドが薬剤感受性評価に有用であり、またオルガノイドを用いて薬剤感受性に関連する複数の遺伝子を明らかにすることができた。古典的な薬剤感受性試験を新たにオルガノイドを用いてに行うことに留まらず、発現遺伝子解析を行うことでより詳細な検討がなされた点で本研究は意義深い。今後の膵癌治療の発展に寄与しうる内容であり、本審査委員会は本研究が学位(医学)の授与に値するものと全員一致で判定した。

(1, 200字以内)