

平成30年 5月30日現在

機関番号：12601

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2015～2017

課題番号：15K20186

研究課題名(和文)患者由来腫瘍異種移植片モデルを用いた腺様嚢胞癌の進展機序の解明

研究課題名(英文) Determination of the invasion mechanism of adenoid cystic carcinoma using patient-derived xenograft model

研究代表者

安藤 瑞生 (Ando, Mizuo)

東京大学・医学部附属病院・講師

研究者番号：60511467

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,100,000円

研究成果の概要(和文)：本研究により腺様嚢胞癌のPDX(patient-derived xenograft)モデル3例が樹立され、うち1例は肺転移を伴う遠隔転移モデルとなった。患者正常血液、患者腫瘍、PDX(皮下)、PDX(肺転移)のゲノムを比較検討することにより、転移性サブクローンに特徴的な遺伝子変異と発現変化を多数抽出した。転移を促進する因子を検索するため、経尾静脈投与や手術操作により遠隔転移が促進されるかどうかを検証したが、有意な結果は得られなかった。新規融合遺伝子の有無も検索したが、発がんに関連するものは同定できなかった。本研究は米国カリフォルニア大学サンディエゴ校との国際共同研究に発展した。

研究成果の概要(英文)：We generated three PDX (patient-derived xenograft) models from patients with adenoid cystic carcinoma. One model has distant pulmonary metastasis which is of substantial importance on deciphering the mechanisms of invasion in adenoid cystic carcinoma. By comparing genome-wide data of patient's peripheral blood, primary tumor, and PDXs (subcutaneous tumor and lung metastasis), we detected characteristic genomic alterations of metastatic tumor cells. To reveal factors promoting metastasis, we examined intravenous administration and invasive surgical procedure to the PDX model but failed to identify any possible factors that might affect metastatic potential. We have also developed the international research project collaborated with University of California, San Diego.

研究分野：頭頸部悪性腫瘍

キーワード：腺様嚢胞癌 動物モデル 遠隔転移

### 1. 研究開始当初の背景

腺様嚢胞癌は涙腺・唾液腺・乳腺などに発生し、細胞異型は高くはないが浸潤傾向が強く、転移性の高い悪性腫瘍である。これまで他癌腫に比較して基礎研究が進捗しなかった一因として、腺様嚢胞癌の有用な細胞株が存在しないことが挙げられる。患者腫瘍検体を用いた網羅的ゲノム解析の報告も存在するが、新たに発見されたゲノム異常がどのように神経周囲浸潤などの悪性形質に寄与するかという機能解析は行われておらず、臨床像との関連も明らかになっていない。

申請者らはこれまで患者腫瘍標本を用いた免疫組織学的研究により、神経栄養因子 NGF (nerve growth factor) およびその受容体 TrkA (tyrosine kinase receptor A) の高発現と神経周囲浸潤とが有意に相関することを突き止め報告した。

### 2. 研究の目的

本研究は、腫瘍異種移植片 (PDX, patient-derived xenograft) を有する疾患動物モデルを活用した実験により、腺様嚢胞癌の特徴的な進展機序を解明することを目的とする。癌細胞の神経親和性と遠隔転移先の臓器親和性に共通の基盤となる因子がある可能性を考え、遠隔転移モデルの解析も実施する。

### 3. 研究の方法

患者由来腫瘍の生細胞をマウス皮下に直接移植して継代する腫瘍異種移植アッセイ系 (PDX, patient-derived xenograft) を利用する。PDX モデルは継代を繰り返しても病理組織学的に臨床での腫瘍組織の特徴が良く保持され、細胞株が存在しない現状において永続的使用かつ *in vivo* 実験が可能な系であり、極めて有用な研究材料である。

症例ごとに患者由来腫瘍 (図 1) とその PDX モデルによって得られた継代腫瘍とを対象として Exome 解析を行い、その差分・重複を検出する。発現解析や融合遺伝子検出のため RNA-seq、FISH (fluorescence in situ hybridization) を実施する。また、腫瘍塊に含まれる多様な細胞の中から転移性サブクローンに特異的な異常を抽出するため、遠隔転移モデルにおいて複数の遠隔転移巣から採取した腫瘍細胞のゲノム解析を行う。

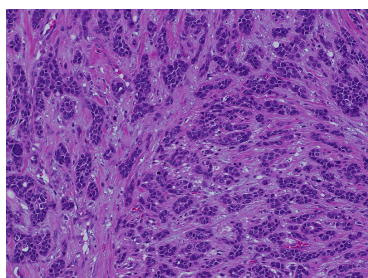


図 1 患者由来腫瘍

### 4. 研究成果

1) 本研究により腺様嚢胞癌の PDX モデル 3 例が樹立され、うち 1 例は肺転移を伴う遠隔転移モデルとなった (図 2)。臨床的に腺様嚢胞癌の遠隔転移は高率に肺に出現するので、遠隔転移メカニズムを解明することには大きな意義がある。患者正常血液、患者腫瘍、PDX (皮下)、PDX (肺転移) のゲノムを比較検討することにより、転移性サブクローンに特徴的な遺伝子変異と発現変化を多数抽出した。

次に転移を促進する因子を検索するため、経尾静脈投与や手術操作により遠隔転移が促進されるかどうかを検証したが、残念ながら有意な結果は得られなかった。

また、本研究の発展として、遠隔転移モデルにおいて複数の遠隔転移巣から採取した腫瘍細胞のゲノム解析を進めている。

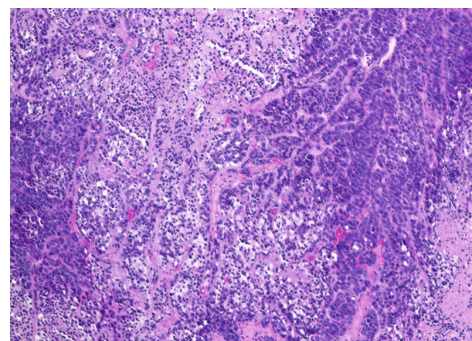


図 2A PDX モデルの皮下移植腫瘍

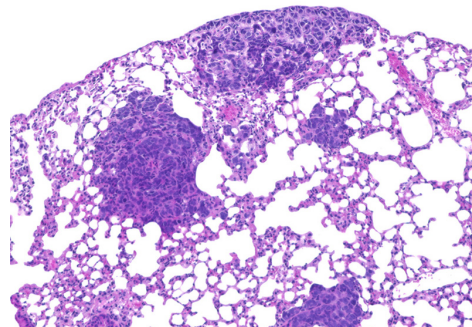


図 2B PDX モデルの肺転移巣

2) RNA-seq による融合遺伝子検出能を検証するため、既知の *MYB-NFIB* 融合遺伝子の FISH を実施した (図 3)。これを用いて新規融合遺伝子の有無も検索したが、発がんに関連すると思われるものは同定できなかった。

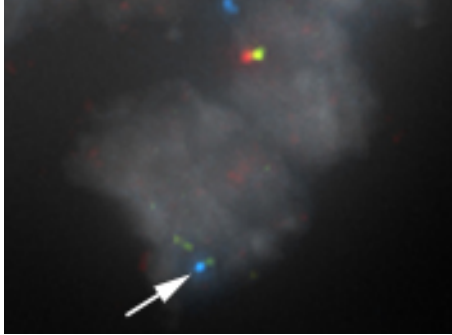


図3 FISHによる *MYB-NFIB* 融合遺伝子検出

3) 本研究でもちいた患者腫瘍検体から腺様嚢胞癌細胞株を新規樹立することを目指した結果、非常に増殖が遅いが継代培養することができている。

4) 本研究は、国際共同研究として米国カリフォルニア大学サンディエゴ校およびサンフランシスコ校、ジョンズ・ホプキンス大学との共同研究に発展した。そこでは腺様嚢胞癌だけでなく、ヒトパピローマウイルス関連中咽頭癌も解析対象としている。選択的スプライシングによって得られる転写産物の多様性(スプライズバリエント)の検出にも成功した。これらを統合的に解釈することによって、発現変動遺伝子における遺伝子変異やクロマチン構造の影響をゲノムレベルで検証することが可能になりつつある。得られたデータ解析結果を検証するため、公共データベースを活用した bioinformatics 解析も実施した。

#### 5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文] (計 11 件)

1. Fukusumi T, Guo T, Sakai A, Ando M, Ren S, Haft S, Liu C, Amornphimoltham P, Gutkind S, Califano J. The NOTCH4-HEY1 pathway induces epithelial mesenchymal transition in head and neck squamous cell carcinoma. *Clin Cancer Res.* 24:619-33, 2018

2 Omura G, Ando M, Saito Y, Yoshida M, Akashi K, Ebihara Y, Asakage T, Yamasoba T. The prognostic value of *TP53* mutations in hypopharyngeal squamous cell carcinoma. *BMC cancer.* 17:898, 2017

3. Shimura T, Tada Y, Hirai H, Kawakita D, Kano S, Tsukahara K, Shimizu A, Takase S, Imanishi Y, Ozawa H, Okami K, Sato Y,

Sato Y, Fushimi C, Takahashi H, Okada T, Sato H, Otsuka K, Watanabe Y, Sakai A, Ebisumoto K, Togashi T, Ueki Y, Ota H, Ando M, Kohsaka S, Hanazawa T, Chazono H, Kadokura Y, Kobayashi H, Nagao T. Prognostic and histogenetic roles of gene alteration and the expression of key potentially actionable targets in salivary duct carcinomas. *Oncotarget.* 9:1852-67, 2017

4. Saito Y, Omura G, Yasuhara K, Rikitake R, Akashi K, Fukuoka O, Yoshida M, Ando M, Yamasoba T. Prognostic value of lymphovascular invasion of the primary tumor in hypopharyngeal carcinoma after total laryngopharyngectomy. *Head Neck.* 39:1535-1543, 2017

5. Saito Y, Ushiku T, Omura G, Yasuhara K, Yoshida M, Takahashi W, Ando M, Fukayama M, Yamasoba T. Clinical Value of the Epstein-Barr Virus and p16 Status in Patients with Nasopharyngeal Carcinoma: A Single-Centre Study in Japan. *ORL J Otorhinolaryngol Relat Spec.* 78:334-343, 2017

6. Saito Y, Ando M, Omura G, Yasuhara K, Yoshida M, Takahashi W, Yamasoba T. Induction chemotherapy for p16 positive oropharyngeal squamous cell carcinoma. *Laryngoscope Investigative Otolaryngology.* 1:28-32, 2016

7. Omura G, Ando M, Saito Y, Kobayashi K, Yoshida M, Ebihara Y, Kanaya K, Fujimoto C, Sakamoto T, Kondo K, Asakage T, Yamasoba T. Association of the upregulated expression of focal adhesion kinase with poor prognosis and tumor dissemination in hypopharyngeal cancer. *Head Neck.* 38:1164-9, 2016

8. Saito Y, Ando M, Fujimoto C, Omura G, Kobayashi K, Sakamoto T, Asakage T, Yamasoba T. Human papillomavirus 16 physical status and *TP53* codon 72 polymorphism in Japanese p16-positive oropharyngeal cancer patients. *ORL J Otorhinolaryngol Relat Spec.* 78:46-54, 2016

9. Omura G, Ando M, Saito Y, Kobayashi K, Yamasoba T, Asakage T. Comorbidity as predictor poor prognosis for patients with advanced head and neck cancer treated with major surgery. *Head Neck.* 38:364-9, 2016

10. Kobayashi K, Ando M, Omura G, Saito Y, Kondo K, Yamasoba T, Ushiku A, Fukayama M, Asakage T. Nerve growth factor signals as possible pathogenic biomarkers for perineural invasion in adenoid cystic carcinoma. *Otolaryngol Head Neck Surg.* 153:218-24, 2015

11. Ando M, Saito Y, Morikawa T, Omura G, Kobayashi K, Akashi K, Yoshida M, Ebihara Y, Fujimoto C, Fukayama M, Yamasoba T, Asakage T. Maxillary carcinosarcoma: Identification of a novel *MET* mutation in both carcinomatous and sarcomatous components through next generation sequencing. *Head Neck.* 37:E179-85, 2015

〔図書〕（計 1 件）

安藤瑞生. 遺伝子診断-頭頸部腫瘍. 耳鼻咽喉科頭頸部外科研修ノート第2版, 診断と治療社, 2016

〔学会発表〕（計 1 件）

Ando M, Saito Y, Omura G, Yoshida M, Asakage T, Yamasoba T. A case of maxillary carcinosarcoma: Identification of a MET mutation by next generation sequencing. 頭頸部癌学会 2015. 6. 5

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

安藤瑞生 (ANDO, Mizuo)

東京大学・医学部附属病院・講師

研究者番号 : 60511467

### (2) 研究分担者

なし

### (3) 連携研究者

なし

### (4) 研究協力者

河津正人 (KAWAZU, Masahito)

松本有 (MATSUMOTO, Yu)