

令和 2 年 9 月 15 日現在

機関番号：22701

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2017～2019

課題番号：17K11395

研究課題名(和文) 癌オルガノイドによる高MTV腫瘍における放射線抵抗機序の解明

研究課題名(英文) Assessment of radiation resistance in head and neck cancer with high metabolic tumor volume by using organoid culture method

研究代表者

矢吹 健一郎 (Yabuki, Kenichiro)

横浜市立大学・医学研究科・客員講師

研究者番号：50722774

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,600,000円

研究成果の概要(和文)：研究者らの所属する施設にて、予め同意を得た頭頸部腺様嚢胞癌患者から手術検体の一部を採取した。これを三次元培養法で分離・培養を行うことで細胞株を樹立し、さらに臍帯静脈血管内皮細胞および間葉系胚細胞を用いて癌オルガノイドを作製した。癌オルガノイドを用いて抗癌剤の薬剤感受性試験を施行した。放射線感受性の評価や、薬剤感受性試験結果を利用した患者治療に関しては研究期間内では達成することはできなかった。本研究成果は今後の頭頸部癌に対する病態解明に資するだけでなく、実臨床における癌の個別化治療が実現する可能性を示すものであると思われた。オルガノイド培養法は新規性の高い培養法であり他分野での応用も期待される。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究成果は今後の頭頸部腺様嚢胞癌に対する病態解明や治療法の確立に資するだけでなく、頭頸部癌症例の個別化治療が実現する可能性を示したものであると思われます。特にオルガノイド培養法は新規性の高い培養法であり、他分野での応用も期待されます。

研究成果の概要(英文)：Tumor specimens from surgically resected salivary adenoid cystic carcinoma (ACC) were proceeded for the preparation of patient-derived tumor xenograft (PDX) and organoid culture. The orthotopic transplantation of patient-derived or PDX-derived organoids was demonstrated into submandibular glands of NSG mice and those histology was evaluated. PDX-derived organoid cells were evaluated for the presence of MYB-mediated fusion genes and proceeded for in vitro drug sensitivity assay. Human ACC derived-organoids were successfully generated in three-dimensional culture and confirmed the ability of these cells to form tumors by orthotopic injection. Short term organoid cell cultures from two individual ACC PDX tumors were also established that maintain the characteristic MYB translocation and histological features of the original parent and PDX tumors. Lastly, the establishment of drug sensitivity tests on these short-term cultured cells was confirmed using three different agents.

研究分野：頭頸部癌

キーワード：オルガノイド培養法 頭頸部癌 腺様嚢胞癌 薬剤感受性試験

様式 C-19、F-19-1、Z-19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

頭頸部癌の約85%は口腔・咽頭・喉頭原発であり、その根治治療としては手術療法と放射線治療に大別される。手術療法では患者の音声・嚥下機能が犠牲になることが多いため、機能温存を目的として化学療法同時併用放射線療法が考案され、広く施行されるようになった。しかし治療後の遺残や再発を認める例が少なからずあり、それらに対する救済手術は仮に施行しえたとしても周術期合併症の頻度が高くなるとされている。

申請者は放射線治療を行った頭頸部扁平上皮癌 (HNSCC) 患者に対して治療予後予測因子の探索を後ろ向きに行い、治療前に施行した PET (Positron Emission Tomography) 検査における FDG (Fluoro-deoxyglucose) の集積体積を解析した MTV 値 (Metabolic Tumor Volume) が高値の症例は治療予後が不良であると報告した (Yabuki et al., PLoS One 2015, Yabuki et al., Head Neck 2016)。また、このような高 MTV 値症例に対しては放射線治療よりも手術療法のほうが予後がよいことも示されており (Yabuki et al. Laryngoscope 2016), FDG の集積と、腫瘍の放射線抵抗性との間には何らかの関連があると考えられる。悪性腫瘍の放射線抵抗性については HNSCC に限らず様々な癌種において検討がなされているが、いずれも樹立された細胞株のみでの検討であり、癌周囲に存在する間質が再現されていない。これら細胞株の生物学的特徴は生体内でのそれを正確に反映していないという問題を抱えている。そのため FDG 集積と放射線抵抗性の関連についての基礎研究は十分になされていないのが現状である。

2. 研究の目的

近年、ヒト癌細胞と、ヒト臍帯静脈内皮細胞 (HUVEC; Human Umbilical Vein Endothelial Cells), およびヒト間葉系幹細胞 (hMSC; human Mesenchymal Stem Cells) を共培養する癌オルガノイド培養が開発された。これは癌細胞周囲の間質を含む癌組織が再構成されており、従来の細胞株と比べてより生体内組織に近い環境での解析を *in vitro* で行なえる可能性があることが明らかになった (Boj SF et al. Cell 2015)。本研究では治療前 MTV 値が高値の HNSCC 症例における手術検体から癌オルガノイドを作成し、その分子生物学的特徴を検索することを目的とする。

具体的には、まず既存の頭頸部癌細胞株、ヒト間葉系幹細胞 (hMSC)、ヒト臍帯静脈内皮細胞 (HUVEC) を共培養し、間質を有したヒト頭頸部扁平上皮癌組織 (プライマリヒト頭頸部扁平上皮癌オルガノイド) を作製するための基盤技術を確立する。

次に実臨床における頭頸部癌症例での手術検体から癌オルガノイドを作製し、その分子生物学的特性を解析する。具体的には、治療前 MTV が高値であった癌細胞から作成した癌オルガノイドと、MTV 値が低値であった癌細胞から作成した癌オルガノイドについて放射線や抗腫瘍薬に対する感受性の差異を評価する。さらに放射線抵抗性を示した癌オルガノイドにおいて、その放射線抵抗性に寄与するバイオマーカーを同定するとともに、放射線感受性を改善せしめる因子について探索を行う。

3. 研究の方法

・ヒト頭頸部癌の患者検体

研究対象の検体として、2016年12月から2019年3月に横浜市立大学病院と横浜市立大学医療センターで外科的切除を受けた頭頸部癌の患者から検体を得た。すべての実験は、横浜市立大学のヒトゲノム・遺伝子研究等倫理委員会によって承認されている。(承認 ID: A171130010) 収集された標本は4つの部分に分割され、ホルマリン固定、解析用凍結保存、PDX (PDX; patient derived xenograft) 作成、オルガノイド培養のために使用した。

・ヒト頭頸部癌由来オルガノイド培養

得られた腫瘍は細かく刻んだ後、TrypLE™ Express Enzyme を用いて酵素処理し、70µm のセルストレーナーを用いて濾過した。EGF や FGF, wnt3a などのサイトカインを用いて調整した完全培地に懸濁液を作成し、growth-factor-reduced (GFR) Matrigel でコーティングしたプレート上にのせた。翌日、マトリゲル上のメディアムを除去し、マトリゲルで再度コーティングすることで癌細胞を3次元培養した。

・患者由来の異種移植 (PDX; patient derived xenograft)

術後12時間以内に得られた腫瘍を細かく刻み、NSG マウス (免疫不全マウス) の皮下に移植した。腫瘍を最大直径1.5~2.5 cm まで成長させ、外科的に採取した。得られた PDX 検体は、オルガノイド培養、新しい PDX への継代、解析用の凍結ストック、およびパラフィンブロックに使用した。

・PDX 由来オルガノイド

得られた PDX 検体の周辺のマウス組織をできるだけ多く切除した後、ヒト唾液腺腫瘍オルガノイド培養と同じ手順で処理して、PDX 由来のオルガノイドを作成した。

・癌オルガノイドの作成

①癌細胞 (既存の頭頸部癌細胞株, 作成したヒト頭頸部癌由来オルガノイド, 作成した PDX 由来オルガノイド), ②ヒト臍帯静脈内皮細胞 (HUVEC; Human Umbilical Vein Endothelial Cells), ③ヒト間葉系幹細胞 (hMSC; human Mesenchymal Stem Cells) を濃度調整された Matrigel コーティングされた well 上で共培養する。約24時間後に凝集した癌オルガノイドが確認され、これを回収し NSG マウスに同所性異種移植した。さらに①~③をクラレプレートで培養し、極小の癌オ

ルガノイドを作成し、薬剤評価 (IC50) に用いた。

・STR 解析

作成したヒト頭頸部癌由来オルガノイド、ヒト頭頸部癌 PDX 由来オルガノイドを、ヒト原発頭頸部癌組織・PDX と遺伝子的に比較し、その相同性を確認した。

・オルガノイドおよび PDX 由来オルガノイド、癌オルガノイドの同所性異種移植

PDX の作成時と同じ方法でマウスに麻酔をかけ、NSG マウスの前頸部に約 1cm の横切開を入れて顎下腺を表出し、オルガノイド、PDX 由来のオルガノイド、あるいはクラレプレートで作成した癌オルガノイドを Matrigel に懸濁してから、左右の顎下腺にその懸濁液を 27~29G の針を用いて注射 1 カ所ずつ移植した。毎週 1~2 回、腫瘍形成を確認した。癌オルガノイド移植は、顎下腺自体に切開を入れて切開に挟み込むように移植した。最後にマウス頸部の横切開は絹糸で縫合して閉じている。

・薬物感受性アッセイ

オルガノイドは継代の 10~14 日後に収集され、TrypLE™ による酵素処理によって 1 塊当たり 2~5 個細胞の細胞塊に解離させた。少量の完全培地に懸濁したオルガノイドを、GFR マトリゲルをコーティングした 96well 細胞培養プレートの各 well に乗せた。継代の時のみ、完全培地にロックインヒビター (Y-27632) を追加した。24 時間後、上澄みの培地を除去し、各 well をさらに GFR マトリゲルでコーティングし、その後、抗がん剤の各濃度に調整した完全培地を分注した。抗がん剤投与から 72 時間後に、CellTiter-Glo 3D (Promega) を使用して細胞生存率の評価を行った。

4. 研究成果

研究開始当初において、ヒト頭頸部扁平上皮癌の三次元培養 (オルガノイド培養) の手技についての報告はなく、技術的には確立されていなかった。そのため、まずは既存のヒト頭頸部扁平上皮癌の細胞株として FaDu (2 次元培養で作成され、販売されている下咽頭癌細胞株) を用いて、その 3 次元培養を行った。さらに HUVEC と hMSC を合わせて共培養を行い、癌オルガノイドを作成した。この癌オルガノイドの性質の評価のために、作成したヒト頭頸部扁平上皮癌の細胞株を用いた癌オルガノイド (FaDu+HUVEC+hMSC) と既存の頭頸部扁平上皮癌細胞株 (2 次元培養した FaDu のみ) を免疫不全マウスの舌や耳下腺に同所性異種移植して、組織再現性や転移について比較した。しかし、癌オルガノイドも細胞株のみも、移植により腫瘍は形成するもの微小な頸部リンパ節転移しか再現できなかった。(Figure 1, 2)

一方で、頭頸部癌の中でも唾液腺癌は培養が難しく、これまで *in vitro* や *in vivo* 研究で使用可能な癌細胞株はほとんど存在しなかったが、我々が新規に行ったオルガノイド培養法では唾液腺癌からいくつかのオルガノイド細胞株と PDX 由来オルガノイド細胞株を作成することができた。さらに樹立したこれらのオルガノイド細胞株の再現性と有用性を確かめるために、同所性異種移植、薬剤アッセイ (IC50 の算出)、STR 解析にて作成したオルガノイド細胞株と PDX 由来オルガノイドが、組織学的・遺伝学的に非常に再現性が高く、薬剤評価などの *in vitro*、*in vivo* 研究が可能であることが確認された。

このように新規の培養法によって、これまで基礎研究が進んでいなかった組織型で頭頸部癌の *in vitro*、*in vivo* 研究モデルを作成することができた。この培養方法の確立については、現在論文投稿中である。今回、同意を得られた研究に適切な手術件数が少なく、7 例中 4 例でオルガノイド培養は可能であったものの、研究継続ができるまで安定したものは 2 例であった。また本研究開始から十分な件数の検体が入るまでに時間を要したために、放射線治療抵抗性等の評価にまで研究を進めることができなかった。今後も症例数を増やしつつ、放射線治療抵抗性等の評価も行い、論文投稿にて結果を報告する予定である。(Figure 3)

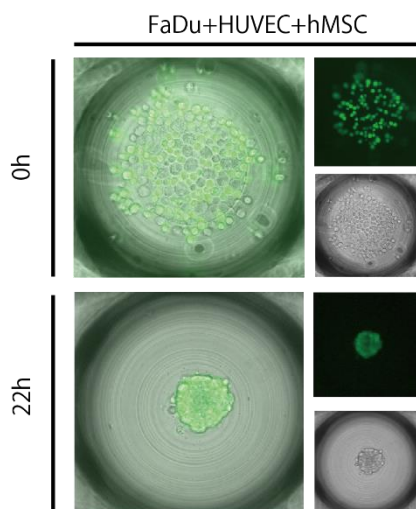


Figure 1. クラレプレートを用いて頭頸部扁平上皮癌細胞株 (FaDu) + HUVEC + hMSC の共培養後、凝集して癌オルガノイドを形成している。頭頸部扁平上皮癌細胞 (FaDu) は GFP にて緑色に発光している。

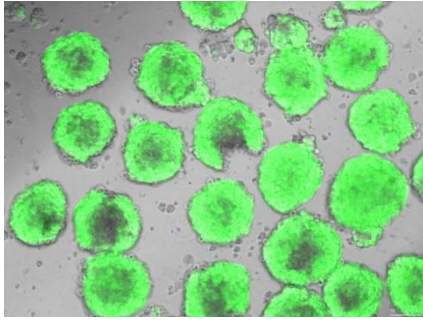


Figure 2. 免疫不全マウスに移植前の癌オルガノイド(頭頸部扁平上皮癌細胞株 (FaDu) +HUVEC+hMSC)の懸濁液.

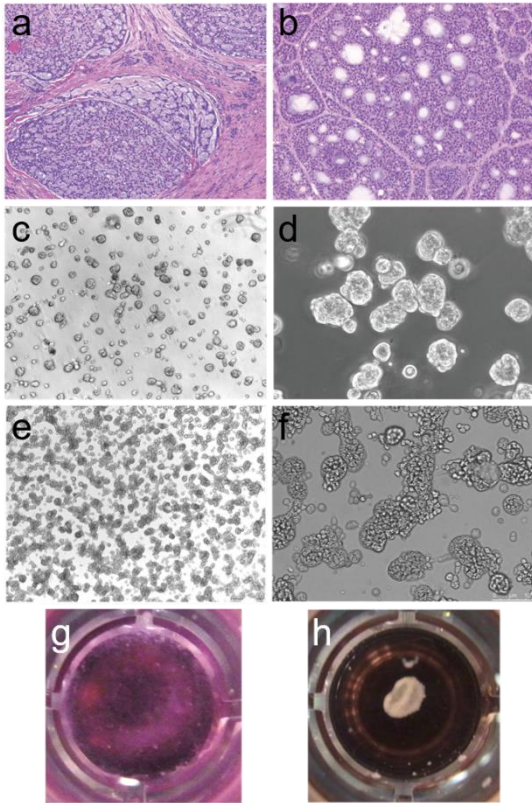


Figure 3. ヒト唾液腺腺様嚢胞癌

- (a) 原発腫瘍
- (b) PDX 腫瘍
- (c) ヒト原発腫瘍由来のオルガノイド(x100)
- (d) ヒト原発腫瘍由来のオルガノイド(x400)
- (e) PDX 由来オルガノイド(x100)
- (f) PDX 由来オルガノイド(x400)
- (g) PDX 由来オルガノイド+HUVEC+hMSC の共培養直後(0 時間経過)
- (h) PDX 由来オルガノイド+HUVEC+hMSC の共培養から 24 時間経過し, 癌オルガノイド形成後

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計9件（うち査読付論文 8件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 0件）

1. 著者名 Yabuki Kenichiro, Sano Daisuke, Shiono Osamu, Arai Yasuhiro, Chiba Yoshihiro, Tanabe Teruhiko, Nishimura Goshi, Takahashi Masahiro, Taguchi Takahide, Kaneta Tomohiro, Hata Masaharu, Oridate Nobuhiko	4. 巻 127
2. 論文標題 Surgery-based versus radiation-based treatment strategy for a high metabolic volume laryngeal cancer	5. 発行年 2017年
3. 雑誌名 The Laryngoscope	6. 最初と最後の頁 862 ~ 867
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) DOI: 10.1002/lary.26233	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -
1. 著者名 矢吹健一郎	4. 巻 44
2. 論文標題 Head and Neck Tumor 頭頸部腫瘍局所進行喉頭・下咽頭癌における喉頭温存. 喉頭癌におけるMetabolic Tumor Volumeと予後との関係	5. 発行年 2017年
3. 雑誌名 癌と化学療法	6. 最初と最後の頁 564-568
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) なし	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -
1. 著者名 Sano D, Yabuki K, Takahashi H, Arai Y, Chiba Y, Tanabe T, Nishimura G, Oridate N.	4. 巻 45
2. 論文標題 Lymph node ratio as a prognostic factor for survival in patients with head and neck squamous cell carcinoma.	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Auris Nasus Larynx.	6. 最初と最後の頁 846-853
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) doi: 10.1016/j.anl.2017.11.015.	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -
1. 著者名 Sano D, Yabuki K, Arai Y, Tanabe T, Chiba Y, Nishimura G, Takahashi H, Yamanaka S, Oridate N.	4. 巻 45
2. 論文標題 The applicability of new TNM classification for humanpapilloma virus-related oropharyngeal cancer in the 8th edition of the AJCC/UICC TNM staging system in Japan: A single-centre study.	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Auris Nasus Larynx.	6. 最初と最後の頁 558-565
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) doi: 10.1016/j.anl.2017.07.010.	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Nishimura G, Sano D, Yabuki K, Arai Y, Chiba Y, Tanabe T, Oridate N.	4. 巻 6
2. 論文標題 The Second-Look Procedure for Transoral Videolaryngoscopic Surgery for T1 and T2 Laryngeal, Oropharyngeal, and Hypopharyngeal Cancer Patients: Protocol for a Nonrandomized Clinical Trial.	5. 発行年 2017年
3. 雑誌名 Auris Nasus Larynx	6. 最初と最後の頁 e235
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) doi: 10.2196/resprot.8907.	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 ishimura G, Shiono O, Sano D, Yabuki K, Arai Y, Chiba Y, Tanabe T, Oridate N	4. 巻 80
2. 論文標題 Efficacy and safety of postoperative bio-chemoradiotherapy using cetuximab and docetaxel for high-risk head and neck cancer patients in Japan.	5. 発行年 2017年
3. 雑誌名 Cancer Chemother Pharmacol.	6. 最初と最後の頁 203-207
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) doi: 10.1007/s00280-017-3352-3.	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 矢吹健一郎	4. 巻 112
2. 論文標題 B型肝炎ウイルス再活性化の予防	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 耳鼻咽喉科臨床	6. 最初と最後の頁 704-705
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) なし	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Nishimura G, Hatakeyama H, Shiono O, Taguri M, Komatsu M, Sano D, Sakuma N, Yabuki K, Arai Y, Shibata K, Chiba Y, Tanabe T, Oridate N.	4. 巻 7
2. 論文標題 Postoperative bio-chemoradiotherapy using cetuximab and docetaxel in patients with cis-platinum-intolerant core high-risk head and neck cancer: protocol of a phase 2 nonrandomized clinical trial.	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 JMIR Research Protocols	6. 最初と最後の頁 e11003
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.2196/11003.	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 矢吹健一郎.	4. 巻 34
2. 論文標題 ちょっと気になる頭頸部癌化学療法	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 JOHNS	6. 最初と最後の頁 1041-1044
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) なし	査読の有無 無
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

〔学会発表〕 計6件 (うち招待講演 0件 / うち国際学会 1件)

1. 発表者名 矢吹健一郎, 佐野大佑, 池宮城秀崇, 田辺輝彦, 千葉欣大, 荒井康裕, 高橋優宏, 西村剛志, 折館伸彦
2. 発表標題 高MTV(Metabolic Tumor Volume)値を示した喉頭癌における治療戦略
3. 学会等名 第118回日本耳鼻咽喉科学会総会
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 Kenichiro Yabuki, Daisuke Sano, Yasuhiro Arai, Hideaki Takahashi, Yoshihiro Chiba, Teruhiko Tanabe, Hidetaka Ikemiyagi, Daiki Morishita, Yohei Hiiragi, Goshi Nishimura, Tomohiro Kaneta, Masaharu Hata and Nobuhiko Oridate
2. 発表標題 Prognostic significance of MTV in patients with piriform sinus carcinoma treated by radiotherapy.
3. 学会等名 The 12th Asia Oceania Congress of Nuclear Medicine and Biology(AOCNM) (国際学会)
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 波多野 孝, 佐藤 要, 佐野 大佑, 矢吹 健一郎, 桑原 達, 和田 昂, 磯野 泰大, 荒井 康裕, 西村 剛志, 折館 伸彦.
2. 発表標題 根治的放射線治療を施行した下咽頭扁平上皮癌症例の予後予測におけるCRP/アルブミン比の有用性.
3. 学会等名 第120回 日本耳鼻咽喉科学会総会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 田辺輝彦, 池宮城秀崇, 荒井康裕, 矢吹健一郎, 佐野大佑, 西村剛志, 折館伸彦.
2. 発表標題 切除不能唾液腺腺様嚢胞癌に対してレンパチニブを使用した3症例の報告.
3. 学会等名 第119回日本耳鼻咽喉科学会総会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 波多野 孝, 佐藤 要, 矢吹 健一郎, 和田 昂, 田辺 輝彦, 佐野 大佑, 西村 剛志, 折館 伸彦.
2. 発表標題 根治的放射線治療を施行した下咽頭扁平上皮癌症例の予後予測における治療後NLRの有用性.
3. 学会等名 第43回 日本頭頸部癌学会総会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 池宮城 秀崇, 西村 剛志, 佐野 大佑, 矢吹 健一郎, 荒井 康裕, 千葉 欣大, 田辺 輝彦, 森下 大樹, 柊 陽平, 相澤 圭洋, 高尾 なつみ, 野島 雄介, 折館 伸彦.
2. 発表標題 当科における高齢者頭頸部癌症例の治療選択.
3. 学会等名 第119回 日本耳鼻咽喉科学会総会
4. 発表年 2018年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
研究 分担者	佐野 大佑 (SANO Daisuke) (10620990)	横浜市立大学・医学部・講師 (22701)	

6. 研究組織（つづき）

	氏名 (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
研究分担者	上野 康晴 (UENO Yasuharu) (60375235)	東京大学・医科学研究所・特任助教 (12601)	
研究分担者	谷口 英樹 (TANIGUCHI Hideki) (70292555)	東京大学・医科学研究所・教授 (12601)	
研究分担者	折館 伸彦 (ORIDATE Nobuhiko) (90312355)	横浜市立大学・医学研究科・教授 (22701)	