

科学研究費助成事業 研究成果報告書

令和 2 年 6 月 25 日現在

機関番号：22701

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2017～2019

課題番号：17K16936

研究課題名(和文) 唾液腺腺様嚢胞癌オルガノイドの作製および薬剤評価系の構築

研究課題名(英文) Establishment of salivary gland adenoid cystic carcinoma organoid line and drug assay system

研究代表者

荒井 康裕 (Arai, Yasuhiro)

横浜市立大学・医学部・助教

研究者番号：90614818

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)：唾液腺腺様嚢胞癌(ACC)においては安定した細胞培養の欠如により、適切な薬剤感受性評価モデルの構築等十分な基礎研究がなされていない。ACCの新しい基礎研究モデル開発のために、オルガノイド培養と患者由来の腫瘍異種移植(PDX)の技術を用いた。患者由来またはPDX由来のオルガノイドの同所性異種移植にて、NSGマウスの顎下腺に移植した。PDX由来のオルガノイド細胞は、in vitroでの薬物感受性評価に用いた。ヒト由来ACCオルガノイドを同所性移植し、腫瘍形成能を確認した。2種のPDX腫瘍からの短期オルガノイド細胞培養も確立され、これらの短期培養細胞に対する薬物感受性試験の確立が確認された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

唾液腺癌は、これまで細胞株の培養が困難なために基礎研究が進んでおらず、外科的切除以外にエビデンスのある治療法が存在しなかった。今回の唾液腺癌のオルガノイド培養の成功により、前臨床研究として、この方法を用いた唾液腺腺様嚢胞癌の化学療法をはじめとした新規治療方法の探索がすすむことが期待される。また本研究のように、PDXとオルガノイドの技術を複合的に用いることは、唾液腺癌の他の組織型や希少癌の研究において、基礎研究方法のバリエーションを大きく増やすことが期待される。

研究成果の概要(英文)：This research was executed to generate a reliable preclinical model system exhibiting the molecular features of salivary adenoid cystic carcinoma (ACC) which biology is still unclear. To develop novel vitro models of ACC, the techniques of organoid culture and patient-derived tumor xenograft (PDX) were applied. Tumor specimens of salivary ACC were proceeded for the preparation of PDX and organoid culture. The orthotopic transplantation of patient-derived or PDX-derived organoids was demonstrated into the submandibular gland of NSG mice. PDX-derived organoid cells were proceeded for drug sensitivity assay in vitro. Human ACC derived-organoids were successfully generated in three-dimensional culture and confirmed the ability forming tumors in these cells by orthotopic injection. Short term organoid cell cultures from two individual ACC PDX tumors were also established. The establishment of drug sensitivity tests on these short-term cultured cells was confirmed.

研究分野：頭頸部癌

キーワード：唾液腺癌 オルガノイド 三次元培養 ヒト唾液腺癌細胞株 PDX 薬剤評価

1. 研究開始当初の背景

1) 唾液腺腺様嚢胞癌の現状

唾液腺癌は頭頸部癌の 6%、全悪性腫瘍の 0.3%を占め、本邦では毎年およそ 3,000 人が発症する稀な悪性腫瘍である。唾液腺癌の中でも比較的発生頻度の高い唾液腺腺様嚢胞癌は、10 年生存率は 50%程度であるが、約 50%の症例で遠隔転移をきたし、そのうち 30%程度は病状進行に伴い 2 年以内に死亡する。症例によっては非常に不良な経過を辿る難治性の希少癌の一つと言える。腺様嚢胞癌を含めた唾液腺癌の発癌機序の詳細は未だに不明である。唾液腺癌における特徴的な遺伝子変異は組織型によっては存在し、唾液腺腺様嚢胞癌においては *MYB-NFIB* 融合遺伝子が高率に認められているが (Mitani Y et al, Clin Cancer Res. 2016)、そもそも唾液腺癌の細胞株樹立が困難で、信用に足る細胞株が存在しないため、唾液腺癌の十分な基礎研究が行われていないのが現状である。腺様嚢胞癌の治療法は外科的切除術が唯一の根治治療で、切除断端陽性例等に対しては、その有効性が十分に検証されているとは言えないものの、NCCN (National Comprehensive Cancer Network) ガイドラインで術後放射線治療が推奨されている。一方で切除不能な局所進行癌、あるいは再発転移癌に対しては、エビデンスのある治療法は存在しない。その大きな理由として腺様嚢胞癌は稀である上、前述の通り適切な薬剤感受性評価モデルの構築が困難であるなど、基礎研究が大きく立ち遅れていることがあげられる。そのため、これまで腺様嚢胞癌を含めた唾液腺癌について組織型別の前向きランダム化比較試験が行われておらず、標準治療となるような全身化学療法は存在しない。また、希少癌であるがゆえに製薬企業による唾液癌を標的とした新規薬剤の創出の可能性も低く、局所進行あるいは再発・転移唾液腺癌の治療法の開発はアンメットメディカルニーズとなっている。こうした背景の中、唾液腺癌を含む希少癌 10 種類を対象にした免疫チェックポイント阻害薬のペンプロリズマブの臨床第 II 相試験が最近行われ注目されているが、申請者らは、患者会からの要望に基づき 2016 年 1 月より切除不能唾液腺腺様嚢胞癌に対して血管内皮細胞増殖因子受容体 (VEGFR)、線維芽細胞増殖因子受容体 (FGFR) をはじめとするマルチキナーゼ阻害薬であるレンパチニブを用いた世界初の臨床第 I 相試験 (UMIN 試験 ID: UMIN000021080) を院内の先進医療として開始し、現在進行中である。しかしながら、いずれの治療薬においても作用機序解明についての確証が得られていない状態での臨床試験であり、バイオマーカーによる患者層別化も困難なのが現状である。

2) 癌オルガノイドについて

近年、癌の周囲に存在する豊富な間質が癌の進展機構に深く関与するのみならず、抗癌剤の浸透不良や癌細胞のアポトーシス耐性の付与にも関与することが見出され、癌間質による腫瘍微小環境がヒト癌の治療抵抗性に重要な役割を持つことが明らかとなりつつある。このように生体内の癌組織では、癌幹細胞とそこから派生する細胞の増殖・分化の動的平衡により多様性が維持されていると考えられているが、従来の癌細胞単独の 2 次元培養に基づく研究は、癌周囲に存在する癌関連繊維芽細胞や腫瘍血管の内皮細胞などからなる間質と癌細胞とのネットワークを再現しているとはいえず、生体の正確な反映に限界がある。

このような背景のもと、近年開発された消化管組織の 3 次元培養 (オルガノイド培養) では、従来の 2 次元培養に比べて、より生体内組織に近い環境での解析を *in vitro* で行える可能性がある事が明らかになっている。オルガノイドは腸管のみならず肺、肝臓、膵臓等の様々な臓器でも作製可能であり、正常細胞で形成されたオルガノイドに特定の遺伝子変異を導入して実験動物に移植することで癌を生ずることも可能であるとされる。本研究は、この腫瘍微小環境

構築技術を唾液腺腺様嚢胞癌に適用して薬剤評価系を確立することでより正確な抗腫瘍効果の評価を可能にする, という発想に基づいている。これにより現在有効な化学療法が存在しない唾液腺腺様嚢胞癌に対して治療効果の高い薬剤の開発を推進させ, 機能温存可能な治療につながるという臨床還元性の高い研究であると考える。

2 . 研究の目的

唾液腺癌の中でも発生頻度の高い腺様嚢胞癌は, 約 50% の症例で遠隔転移をきたす悪性度の高い腫瘍であるが, 根治治療は外科的切除のみで, 切除不能な進行癌, 再発癌症例に対しては, エビデンスのある化学療法が存在しない。腺様嚢胞癌を含め, 唾液腺癌の発癌機序の詳細は未だに不明であるが, 唾液腺癌の細胞株樹立が困難で, 信用に足る細胞株が存在しないため, 適切な薬剤感受性評価モデルの構築等十分な基礎研究がなされていないのが現状である。本研究では, より生体内組織に近い環境での解析を *in vitro* で可能にする 3 次元培養(オルガノイド培養) 技術を唾液腺腺様嚢胞癌において確立し, 将来的に同技術を用いた薬剤評価系の確立を目指すことが目的である。

3 . 研究の方法

- 1) ヒト唾液腺癌細胞株を用いたヒト唾液腺癌オルガノイド作製のための最適条件検討
- 2) ヒト唾液腺癌ゼノグラフトの作製と, 患者検体との比較による唾液腺癌微小環境再現性の評価
- 3) プライマリヒト唾液腺腺様嚢胞癌細胞の分離・培養, プライマリヒト唾液腺腺様嚢胞癌オルガノイドの創出
- 4) プライマリヒト唾液腺腺様嚢胞癌オルガノイドから作製したヒト唾液腺腺様嚢胞癌ゼノグラフトを用いた *in vivo* 薬剤評価系の構築

4 . 研究成果

唾液腺腺様嚢胞癌 7 例の検体を用いてオルガノイド培養(3 次元培養)を行い, 5 例において癌組織から培養が可能であった。また, その内 2 例において, 培養したオルガノイド(癌細胞)を免疫不全マウスの顎下腺に同所性異種移植を行ったところ, 1 例において組織学的に再現性の高い腫瘍形成を認めた。ヒト唾液腺腺様嚢胞癌組織を免疫不全マウスの皮下に直接移植し, 5 例で腺様嚢胞癌の PDX(Patient-Derived Xenograft)の作成を試みて, 2 例で作成に成功した。さらに 2 例の PDX それぞれから癌細胞を取り出しオルガノイド培養し, 2 例とも培養に成功している。この 2 例の PDX 由来のオルガノイド細胞株を, 免疫不全マウスに同所性異種移植したところ, 原発腫瘍と比べて組織再現性の高い腫瘍を形成した。特にそのうち 1 例では, 腺様嚢胞癌で特徴的に報告されている MYBL1-NFIB の融合遺伝子を有しており, RT-PCR でその PDX と PDX 由来オルガノイド細胞株からもその融合遺伝子を検出できている。ただし, ヒト唾液腺腺様嚢胞癌由来オルガノイド細胞株と, PDX 由来オルガノイド細胞株はどちらも増殖が遅く, PDX から取り出して 10 回程度の継代で増殖が落ちてゆくという問題点を認めた。

そこで、追加実験として PDX から取り出して早い段階でシスプラチンなどを用いて IC50 の薬剤評価を行った。結果は、PDX 由来オルガノイド細胞株は、既存の扁平上皮癌に比べて IC50 が高く、こうした唾液腺癌に対するシスプラチンの有効性の低さはこれまで臨床的傾向に矛盾しない結果であった。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計1件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 1件）

1. 発表者名 Kentaro Takada, Yoshihiro Aizawa, Daisuke Sano, Ryo Okuda, Keisuke Sekine, Yasuharu Ueno, Jun Aoyama, Takashi Hatano, Yasuhiro Arai, Hideki Taniguchi, Nobuhiko Oridate
2. 発表標題 Establishment of PDX-derived salivary gland adenoid cystic carcinoma cell lines using organoid culture method.
3. 学会等名 The 78th Annual Meeting of the Japanese Cancer Association (国際学会)
4. 発表年 2019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
--	---------------------------	-----------------------	----