

令和 5 年 6 月 28 日現在

機関番号：22701

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2019～2022

課題番号：19K09873

研究課題名(和文) 唾液腺腺様嚢胞癌と腫瘍関連神経を中心とした癌微小環境の相互作用の解明

研究課題名(英文) Eradication of the interaction of adenoid cystic carcinoma of the salivary gland and cancer-associated neurons in the tumor microenvironment

研究代表者

高橋 秀聡 (TAKAHASHI, Hideaki)

横浜市立大学・附属病院・助教

研究者番号：50727196

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,300,000円

研究成果の概要(和文)：我々は世界で初めて唾液腺腺様嚢胞癌を始めとする唾液腺癌の患者由来組織からPDXマウス、癌オルガノイド、PDX由来癌オルガノイドの作製に成功した。また、それらが元の組織と組織学的・分子病理学的に類似し、薬効評価の前臨床モデルとして利用可能であることを証明した。さらに、臨床検体を用いた解析では、唾液腺癌の組織中で交感神経および副交感神経線維数が増加している症例が予後不良であることを見出した。これらの結果から唾液腺腺様嚢胞癌を始めとする唾液腺癌において、癌関連神経を標的とした治療が有望である可能性が示唆され、腫瘍神経学の発展の大きな一歩となった。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究では、従来成功していなかった唾液腺癌の患者由来異種移植モデルや唾液腺癌オルガノイド培養技術を唾液腺腺様嚢胞癌を初めとする多様な組織型の唾液腺癌において確立し、薬効評価に有用であることを示した。こうしたモデルは癌微小環境を標的とした新しい治療法の開発を可能とする。本研究は唾液腺癌の昨今の新規治療の開発を理論的に支持しつつ、新たな有望な薬剤をスクリーニングし、臨床試験への橋渡しをするトランスレーショナルな役割も担う重要な研究であった。

研究成果の概要(英文)：We established patient-derived xenograft (PDX) model, cancer organoids, and PDX-derived organoids of salivary gland cancer (SGC) including adenoid cystic carcinoma (ACC) for the first time in the world. We also demonstrated that these models are similar to the original tumor in terms of histological and molecular pathological findings, and useful as preclinical models of the anticancer treatment. Moreover, we performed immunohistological analysis using the clinical specimens and found that patients with increased density sympathetic and parasympathetic nerves had worse prognosis than those without axonogenesis. These results suggest that the treatment targeting cancer-associated neurons in patients with SGC including ACC is novel and promising, and we made a significant evolution in cancer neuroscience.

研究分野：耳鼻咽喉科頭頸部外科学

キーワード：腫瘍神経学 頭頸部癌 唾液腺癌 がん微小環境 腺様嚢胞癌

## 1. 研究開始当初の背景

唾液腺腺様嚢胞癌は唾液腺癌の中でも発生頻度が高く、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。唾液腺癌の治療法は外科的切除術が唯一の根治治療で、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が存在しなかった。その大きな理由として唾液腺癌は希少癌であるがゆえに製薬企業による新規薬剤の創出の可能性が低いことに加え、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も治療法の開発に大きな影響を与えている。したがって、切除不能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。

研究代表者らのグループはHER2あるいはアンドロゲン受容体陽性の切除不能唾液腺導管癌の患者を対象とした臨床第II相試験を行い、良好な治療成績を報告した（Fushimi C, Takahashi H et al., *Ann Oncol.* 2018, and Takahashi H, Tada Y et al., *J Clin Oncol.* 2019）。これらの研究は例え希少癌であっても本邦において新たな治療法の開発が可能であることを意味し、続いて我々は唾液腺癌の中では比較的頻度が高く、予後不良でありかつ有効な全身治療が存在しない唾液腺腺様嚢胞癌の治療法の開発に取り組むこととした。

唾液腺腺様嚢胞癌は神経浸潤を来しやすく、その場合予後不良となることが知られている（Daniel RG, et al., *Int J Radiat Oncol Biol Phys.* 2008）。しかし、腺様嚢胞癌と神経細胞の相互作用の詳細は不明である。研究代表者らは頭頸部扁平上皮癌細胞株を使った研究で、p53機能が失われた癌細胞から放出されるエクソソームを詳しく解析した結果、エクソソームに含まれるmiR-21およびmiR-197が神経軸索の成長を促進し、miR-34aがその成長を抑制していることを示した（Amit M, Takahashi H et al. *Nature.* 2020）。p53機能が失われた癌細胞の周囲には多くの神経束が認められ、高濃度のノルアドレナリンが検出された。こうした交感神経刺激は癌の成長を促進することが知られている（Magnon C, et al., *Science.* 2013）。

唾液腺腺様嚢胞癌の研究を行う際の問題点として、唾液腺癌の細胞株樹立は困難であり、信用に足る細胞株が存在しない点が挙げられる。癌オルガノイドは臨床検体からの高い樹立効率が得られる手法で、既に様々な癌種において癌オルガノイドの樹立が報告されている。この手法を用いることで従来困難であった唾液腺癌の生物学的特性の解析や薬剤のスクリーニングが*in vitro*で可能になると期待されている。研究代表者らはヒト頭頸部扁平上皮癌組織の初代培養からオルガノイドを作製することに成功し、さらにそれをBalb/c(*nu/nu*)マウスに移植することで*in vivo*での生物学的特性の解析も可能になることを明らかにした（Tanaka N, Takahashi H et al., *Oral Oncol.* 2019）。

## 2. 研究の目的

本研究では、従来成功していなかった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、唾液腺腺様嚢胞癌細胞と神経細胞の相互作用を明らかにすると同時に、こうした癌微小環境を標的とした新しい治療法の開発を目的とする。本研究は腺様嚢胞癌の昨今の新規治療の開発を理論的に支持しつつ、新たな有望な薬剤をスクリーニングし、臨床試験への橋渡しをするトランスレーショナルな役割も担う重要な研究である。

### 3. 研究の方法

研究協力者らが開発した方法 (Takebe T, et al., Nature. 2013, Takebe T, et al., Cell stem cell. 2015) に基づき, 唾液腺様嚢胞癌手術検体を用いた初代培養から初代ヒト唾液腺様嚢胞癌オルガノイドを作製した。

唾液腺様嚢胞癌オルガノイドをメスの免疫不全マウス (NOD/scid マウス) の顎下腺に同所移植して腫瘍の形成能力をみた。また, 唾液腺様嚢胞癌オルガノイドと切除不能唾液腺癌の治療で用いられるシスプラチンと共培養し, 薬剤感受性を評価した。また, 化学療法剤に代わる薬剤のスクリーニングの一環として, 耐性化の機序が限られている癌微小環境を標的とした薬剤を用いて唾液腺癌モデルの治療効果を *in vitro* および *in vivo* で検討した。このような薬剤の例としてレンバチニブやレゴラフェニブが挙げられる。レンバチニブは本邦で開発された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り, 放射性ヨウ素耐性の甲状腺癌のほか, 肝細胞癌や腎細胞癌に対する開発も進んでいる。

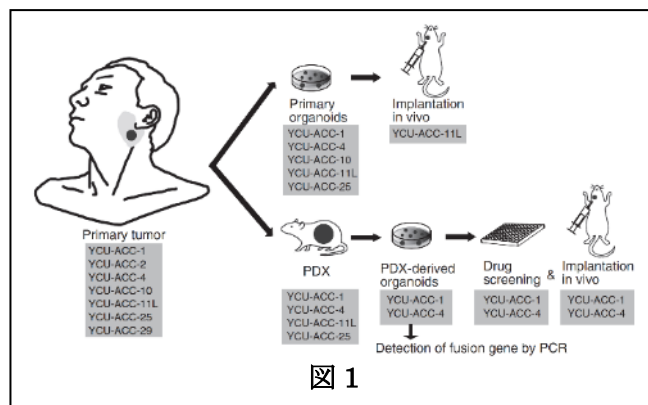


図 1

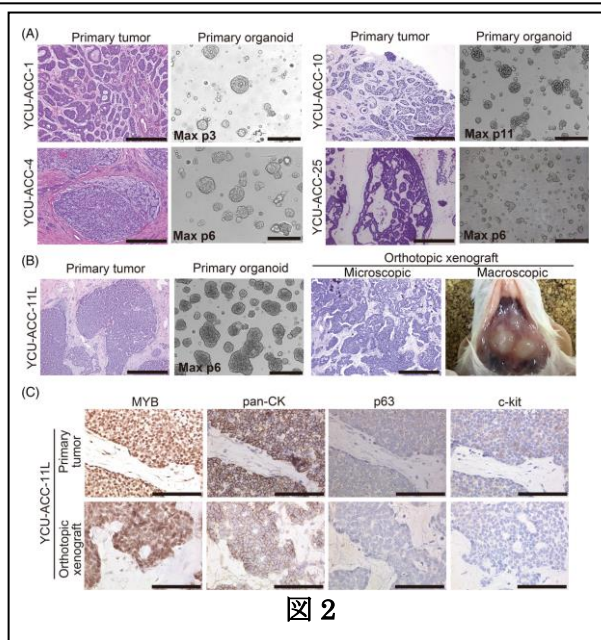


図 2

この方法を他の唾液腺癌の組織型にも応用し, PDX や癌オルガノイドを作製した。これらの遺伝子発現パターンを網羅的に解析し, 既存のデータベースと照合することで, 我々の作製した唾液腺癌モデルの遺伝子発現パターンが元となるヒト唾液腺癌組織のものと類似しているかどうかを検証した。続いて, これらのモデルが薬効評価系として利用可能であるかどうかを検証した。

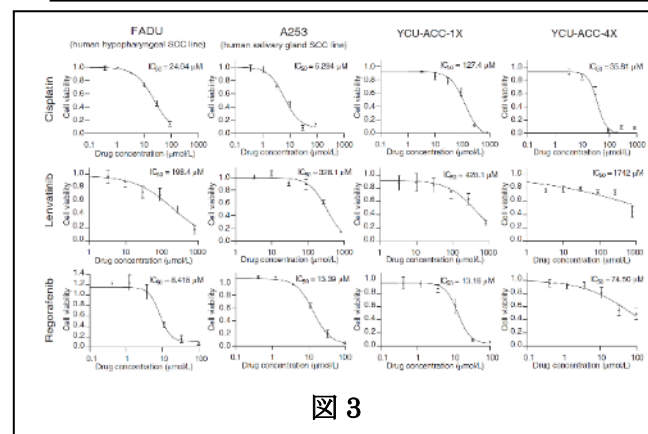


図 3

### 4. 研究成果

我々はオルガノイド培養法を用いることで, 唾液腺様嚢胞癌の種々のモデル作製に世界で初めて成功した (Takada K, Takahashi H, Sano D, Oridate N et al. Int J Cancer. 2020)。

この研究では腫瘍内の不均一性が保たれるとされる Patient-derived xenograft (PDX) モデル (ACC PDX) の樹立の他に, ACC 患者由来オルガノイド, ACC PDX からの短期培養したオルガノイド, および同オルガノイドをマウスに移植することで ACC 動物モデルを樹立した (図 1)。

ACC PDX モデルならびに ACC 動物モデルではオリジナルの組織学的特徴を再現していることを確認し (図 2), さらに ACC オルガノイドを用いた薬剤スクリーニング評価が可能であることを示した (図 3)。

この手法を他の組織型へも拡充し、唾液腺導管癌，筋上皮癌，粘表皮癌においてオルガノイド継代培養，オルガノイド細胞株移植によるマウスモデル，PDXモデルの作製が可能であり（図4），それぞれのモデルの遺伝子発現パターンが元となる組織型のヒト由来の組織のものと近似していることを示した（図5, Aizawa Y, Takahashi H, Sano D, Oridate N et al. Cell Oncol. 2023）。

さらに，これらのモデルを用いた *in vitro*（図6），*in vivo*（図7）の薬効評価が可能であることを示した（Aoyama J, Takahashi H, Sano D, Oridate N et al. Head Neck. 2023）。

このオルガノイド培養と PDX モデルを用いたアプローチは，唾液腺癌のように希少癌であるが故，また適切な前臨床試験モデルが存在しなかった故に今まで企業による新規治療薬開発が行われてこなかった悪性腫瘍の個別化治療開発に有用と考え，更なる検証を重ねている。現在は協力研究機関と共に唾液腺癌組織中の自律神経密度が唾液腺癌患者の予後と関連していることを見出し（梶原真奈美，高橋秀聡，長尾俊孝ら. 第66回 日本唾液腺学会学術集会. 2022），癌関連神経が唾液腺癌の進展に重要な役割を果たしていると考えている。

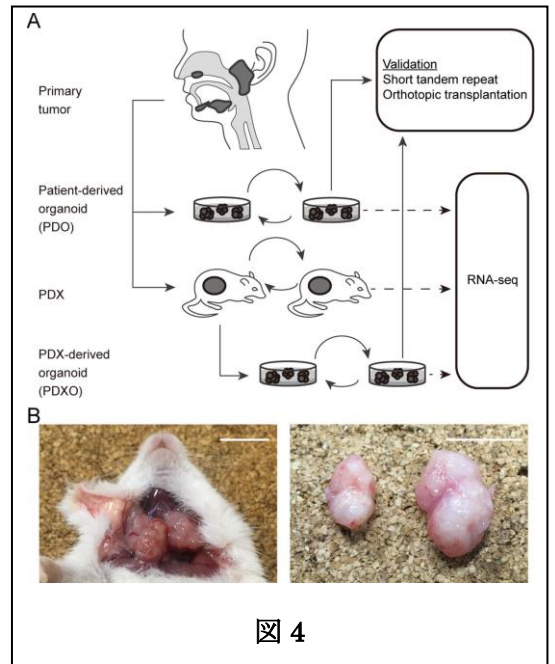


図4

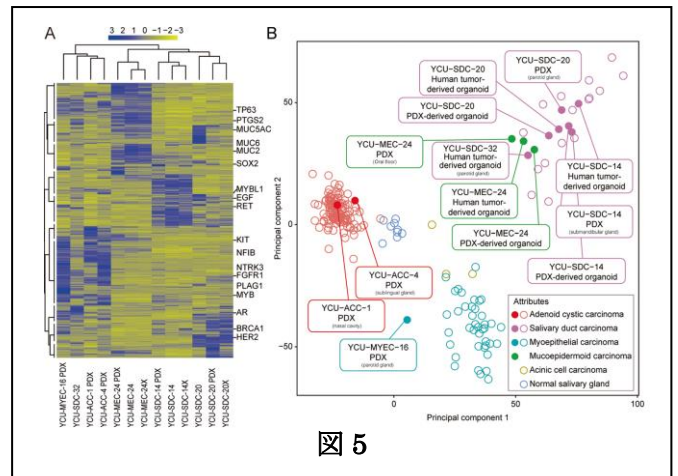


図5

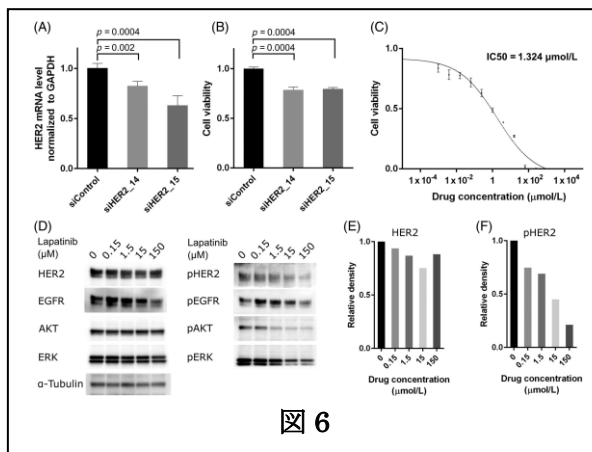


図6

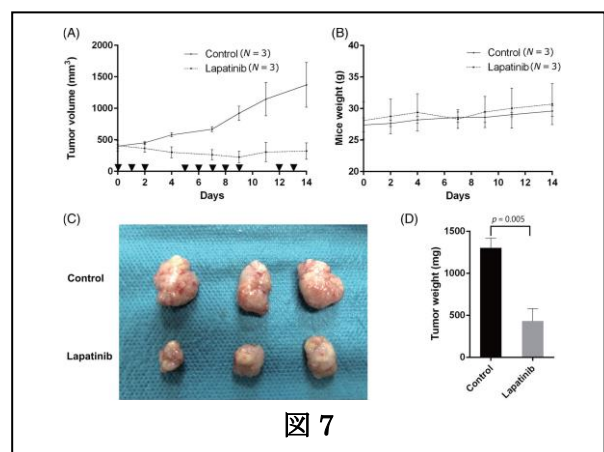


図7

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計6件（うち査読付論文 3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 Takada Kentaro, Aizawa Yoshihiro, Sano Daisuke, Okuda Ryo, Sekine Keisuke, Ueno Yasuharu, Yamanaka Shoji, Aoyama Jun, Sato Kaname, Kuwahara Tatsu, Hatano Takashi, Takahashi Hideaki, Arai Yasuhiro, Nishimura Goshi, Taniguchi Hideki, Oridate Nobuhiko	4. 巻 148
2. 論文標題 Establishment of PDX derived salivary adenoid cystic carcinoma cell lines using organoid culture method	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 International Journal of Cancer	6. 最初と最後の頁 193~202
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1002/ijc.33315	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 高橋秀聡, 佐野大佑, 折館伸彦	4. 巻 48
2. 論文標題 Head and Neck Tumor 頭頸部腫瘍 診断・治療に向けた新技術の展開 p53変異による癌関連神経の再プログラミング	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 癌と化学療法	6. 最初と最後の頁 900-902
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 -

1. 著者名 高橋秀聡, 佐野大佑, 折館伸彦	4. 巻 39
2. 論文標題 【がん微小環境に1細胞レベルで挑む 技術革新で見えてきた腫瘍内の細胞と免疫応答の多様性、がん悪性化・治療抵抗性の鍵】(第1章)がん幹細胞を支えるがん微小環境の多様性 神経によるがんの進展	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 実験医学	6. 最初と最後の頁 1881-1886
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 -

1. 著者名 高橋秀聡, 佐野大佑, 折館伸彦	4. 巻 37
2. 論文標題 【口腔癌診療の最前線】口腔癌とその周辺 口腔癌と神経	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 JOHNS	6. 最初と最後の頁 529-532
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 -

1. 著者名 Aizawa Y, Takada K Aoyama J, Sano D, Yamanaka S, Seki M, Kuze Y, Ramilowski JA, Okuda R, Ueno Y, Nojima Y, Inayama Y, Hatakeyama H, Hatano T, Takahashi H, Nishimura G, Fujii S, Suzuki Y, Taniguchi H, Oridate N	4. 巻 46
2. 論文標題 Establishment of experimental salivary gland cancer models using organoid culture and patient-derived xenografting	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Cellular Oncology	6. 最初と最後の頁 409 ~ 421
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1007/s13402-022-00758-6	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 Aoyama Jun, Nojima Yusuke, Sano Daisuke, Hirai Yuri, Kijima Natsumi, Aizawa Yoshihiro, Takada Kentaro, Hatano Takashi, Takahashi Hideaki, Nishimura Goshi, Oridate Nobuhiko	4. 巻 45
2. 論文標題 Effect of HER2 targeted therapy on PDX and PDX derived organoids generated from HER2 positive salivary duct carcinoma	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 Head & Neck	6. 最初と最後の頁 1801 ~ 1811
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1002/hed.27395	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 -

〔学会発表〕 計12件 (うち招待講演 6件 / うち国際学会 1件)

1. 発表者名 高橋秀聡
2. 発表標題 頭頸部癌研究のニューパラダイム p53が癌微小環境に及ぼす影響
3. 学会等名 第45回日本頭頸部癌学会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 多田雄一郎, 長尾俊孝, 梶原真奈美, 川北大介, 高橋秀聡
2. 発表標題 唾液腺導管癌における自律神経(交感神経・副交感神経)の臨床・分子病理学的意義
3. 学会等名 第11回国際医療福祉大学学会学術大会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 高橋秀聡
2. 発表標題 癌と神経 そしてアメリカ留学で学んだメンタリティー
3. 学会等名 第83回耳鼻咽喉科臨床学会総会・学術講演会（招待講演）
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 高橋秀聡
2. 発表標題 がん・緩和医療における神経可塑性・オピオイド受容体 がんと神経リプログラミング
3. 学会等名 第43回日本疼痛学会（招待講演）
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 高橋秀聡，西村剛志，佐野大佑，荒井康裕，波多野孝，折館伸彦
2. 発表標題 頭頸部扁平上皮癌の癌微小環境における神経の役割
3. 学会等名 第121回日本耳鼻咽喉科学会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 梶原 真奈美，高橋 秀聡，川北 大介，平井 秀明，内海 由貴，浦野 誠，中黒 匡人，佐藤 由紀子，塚原 清彰，加納 里志，大上 研二，小澤 宏之，富樫 孝文，岡田 拓朗，多田 雄一郎，長尾 俊孝
2. 発表標題 唾液腺導管癌における自律神経(交感神経・副交感神経)の臨床・分子病理学的意義
3. 学会等名 第 66 回 日本唾液腺学会学術集会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 佐野 大佑, 相澤 圭洋, 青山 準, 野島 雄介, 高田 顕太郎, 高橋 秀聡, 折館 伸彦
2. 発表標題 オルガノイド培養技術とPatient-derived xenograftモデルを用いた唾液腺癌モデル作製
3. 学会等名 第 66 回 日本唾液腺学会学術集会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 青山 準, 野島 雄介, 相澤 圭洋, 高田 顕太郎, 鬼島 菜摘, 平井 友梨, 波多野 孝, 高橋 秀聡, 佐野 大佑, 藤井 誠志, 折館 伸彦
2. 発表標題 ヒトHER2陽性唾液腺導管癌由来オルガノイドによるin vitro/in vivoでの薬効評価
3. 学会等名 第81回 日本癌学会学術総会（国際学会）
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 高橋秀聡
2. 発表標題 ここまで進んだ！新時代の口腔・咽頭・唾液腺治療 唾液腺癌に対する標的治療の進歩
3. 学会等名 第35回 日本口腔・咽頭科学会 総会ならびに学術講演会（招待講演）
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 高橋 秀聡, 西村 剛志, 佐野 大佑, 荒井 康裕, 波多野 孝, 折館 伸彦
2. 発表標題 基礎研究会からの発表 p53変異による癌関連神経の再プログラミング
3. 学会等名 第44回日本頭頸部癌学会（招待講演）
4. 発表年 2020年



1. 発表者名 佐野大佑
2. 発表標題 シンポジウム7「オルガノイド培養による基礎と臨床の橋渡し」 唾液腺癌研究における患者由来モデルの有用性
3. 学会等名 日本患者由来がんモデル学会2022学術集会（招待講演）
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 佐野大佑, 折館伸彦
2. 発表標題 シンポジウム6「頭頸部癌基礎研究の深化」 オルガノイド培養技術とPatient-derived xenograftモデルを用いた唾液腺癌に対する個別化治療開発
3. 学会等名 第46回日本頭頸部癌学会（招待講演）
4. 発表年 2022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・准教授   (22701)	
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)	

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8 . 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------