

令和元年6月10日現在

機関番号：13301

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2017～2018

課題番号：17K16899

研究課題名(和文) 頭頸部癌PDXモデルを用いた新規バイオマーカーの確立と治療効果予測への応用

研究課題名(英文) Head and neck cancer patient-derived xenografts recapitulate patient tumor properties

研究代表者

上野 春菜 (UENO, HARUNA)

金沢大学・附属病院・医員

研究者番号：80792598

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)：【目的】頭頸部癌の患者腫瘍組織移植モデル(以下PDX)の有用性を検証する。【方法】実際の頭頸部癌患者とPDXモデルでのシスプラチンの薬剤感受性の相関や薬剤耐性にかかわるとされるABC-トランスポーター(MDR-1, MRP-2)の発現の腫瘍の継代や薬剤投与による変化について検討した。【結果】頭頸部癌PDXモデル5例を確立した。患者とPDXで組織型や免疫染色像は相似した。3例について患者とPDXでのシスプラチンの薬剤感受性を検討したところ相関がみられ、薬剤投与によるABC-トランスポーターの発現が増強するものもみられた。【結論】頭頸部癌PDXモデルは実際の癌患者の性質に相似する。

研究成果の学術的意義や社会的意義

頭頸部癌患者の腫瘍とPDXで組織型や免疫染色像が相似した。また実際の癌患者とPDXモデルでのシスプラチンの薬剤感受性も相関することを証明した。これらの結果は他の癌腫でのPDXモデルでの報告と同等の結果をえたことになる。また薬剤耐性にかかわるとされ、抗癌剤などの薬剤を細胞の中から外に排出するABC-transporterの研究モデルとしてもPDXモデルは有用はである可能性が示唆された。頭頸部癌PDXモデルを新薬開発分野やバイオマーカー探索モデルとして活用をすすめたい。

研究成果の概要(英文)：【Objectives】We assessed the utility of PDXs as an oncology research platform for head and neck cancer (HNC). 【Methods】We determined how the PDX responses to anti-cancer drugs mirrored the patients' clinical responses. Moreover, we investigated the expression of adenosine triphosphate-binding cassette (ABC)-transporter in accordance with chemotherapy in the HNC-PDX model. 【Results】Five PDXs from HNC patients were established. These PDXs exhibited high accordance with the histopathological and immunohistochemical features of the original patient specimens. The responses of three PDXs to cisplatin correlated with the patients' clinical response. Augmented ABC-transporter expression was observed in one PDX model after treatment with anti-cancer drugs, but not in passaged PDXs treated with phosphate-buffered saline. 【Conclusion】PDX models are feasible and exhibit similar biological and drug-response characteristics to primary tumors from patients.

研究分野：頭頸部癌

キーワード：患者腫瘍移植モデル 頭頸部癌 ABC-トランスポーター

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19、CK - 19 (共通)

#### 1. 研究開始当初の背景

従来はヒト頭頸部癌から樹立された細胞株 (Cell line) を移植した Cell line-derived xenograft (CDX) モデルを用いて、新規バイオマーカー探索や新薬開発における薬剤感受性試験などの研究が広く行われてきた。しかし頭頸部癌 CDX モデルは癌の heterogeneity が失われており実際の頭頸部癌患者の臨床モデルとしては不完全であるという欠点を抱えていた。このような欠点を克服しうるモデルとして実際の癌患者の腫瘍組織を免疫不全マウスに移植した Patient-derived xenograft (PDX) モデルを用いた研究が近年国内外で行われるようになりつつある。

#### 2. 研究の目的

本研究は頭頸部癌 PDX モデルの preclinical model としての有用性を検証することを目的とする。

#### 3. 研究の方法

2015年12月~2017年9月に本研究参加同意のえられた25名の頭頸部がん患者の腫瘍組織をNOD-SCIDマウスへ移植した。移植した腫瘍が1000mm<sup>3</sup>程度に増大えられた場合、犠牲死の上腫瘍を摘出した。摘出腫瘍はHE染色像で組織型・分化度について患者腫瘍との同一性を確認できた場合、「生着」とした。摘出腫瘍は、5代目まで別のマウスへ継代した。患者腫瘍とPDXの組織型・分化度についてHE染色で評価した。また患者腫瘍とPDXのEGFR・p53発現について免疫組織学的に評価した。また当科で確立した5例の頭頸部癌PDXモデル(下咽頭癌2例、舌癌1例、喉頭癌1例、副鼻腔癌1例)のうち術後シスプラチン併用放射線化学療法のうち、6か月以降に再発またはCR維持の症例をCisplatin responder群、6か月以内に再発した症例をCisplatin non-responder群にわけて、から下咽頭癌PDXモデル1例(P-3)、副鼻腔癌1例(P-5) から下咽頭癌PDXモデル1例(P-2)に対して薬剤感受性試験を行った。また今回抗癌剤等の薬剤を細胞の中から外へ排出する膜タンパクである adenosine triphosphate-binding cassette (ABC) -transporter に着目し、抗癌剤投与によるタンパク発現変化や薬剤耐性への影響を評価した。

#### 4. 研究成果

1)生着率について全症例で5/25(20%)、手術症例で5/18(28%)、生検症例で0/7(0%)であった。

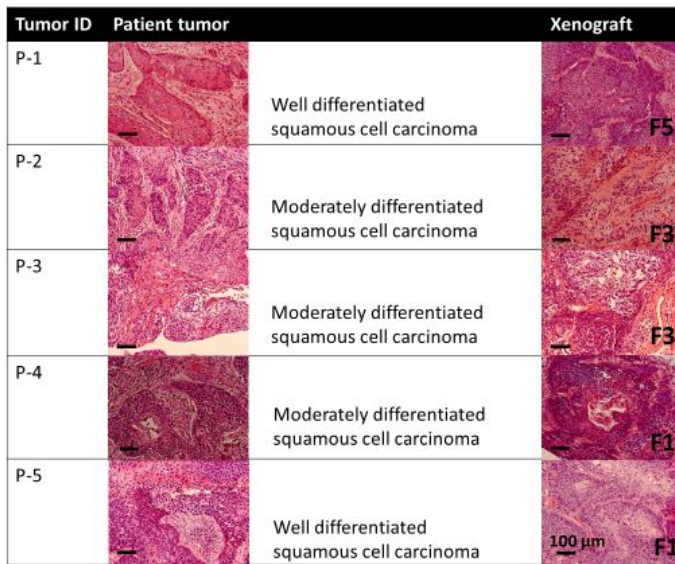
2)手術症例患者背景について生着症例は舌癌1例、下咽頭癌2例、喉頭癌1例、副鼻腔癌1例の5例であった(表1)。手術検体断端陽性、術後CCRTが実施された症例に有意に生着がえられた(P<0.05)。平均年齢、性別、喫煙習慣、検体の部位(原発or転移リンパ節)、組織型(SCC or SCC以外)、TNM、ステージでは患者背景と生着の有無に有意差を認めなかった。

Tumor ID	年齢	性別	初発or再発	TNM, Stage	CCRT終了後の経過
P-1 舌癌	43	男性	再発	T4aN0M0, StageIVA	1か月後に左腋窩・右頸部リンパ節が出現
P-2 下咽頭癌	68	男性	初発	T2N2bM0, StageIVA	2か月後に骨転移が出現
P-3 下咽頭癌	57	男性	初発	T3N3M0, StageIVB	10か月後に肺転移出現
P-4 喉頭癌	55	男性	再発	T4aN2bM0, StageIVA	11か月後に肺転移が出現
P-5 副鼻腔癌	69	男性	初発	T4bN0M0, StageIVB	治療終了6か月時点でCR

(表1): 頭頸部癌 PDX 生着 5 例の臨床データ

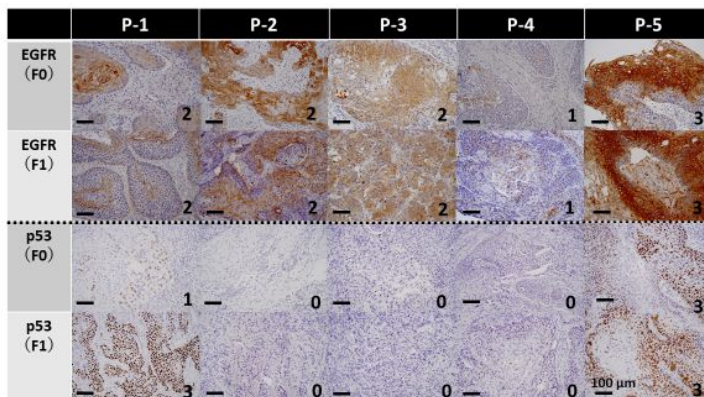
様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19、CK - 19 (共通)

3) HE 染色像患者腫瘍と PDX において 5 例全例で組織型・分化度が一致した。(図 1)



(図 1) : HE 染色像 ( × 200 ) ( F ~ は継代回数を示す )

4) IHC 像 (EGFR・p53 発現) 患者腫瘍と PDX において 5 例全例で EGFR 発現が相似し、4 例で p53 発現が相似した。舌癌 PDX ( P-1 ) において患者腫瘍と比較して p53 発現の増強を認めた。(図 2)

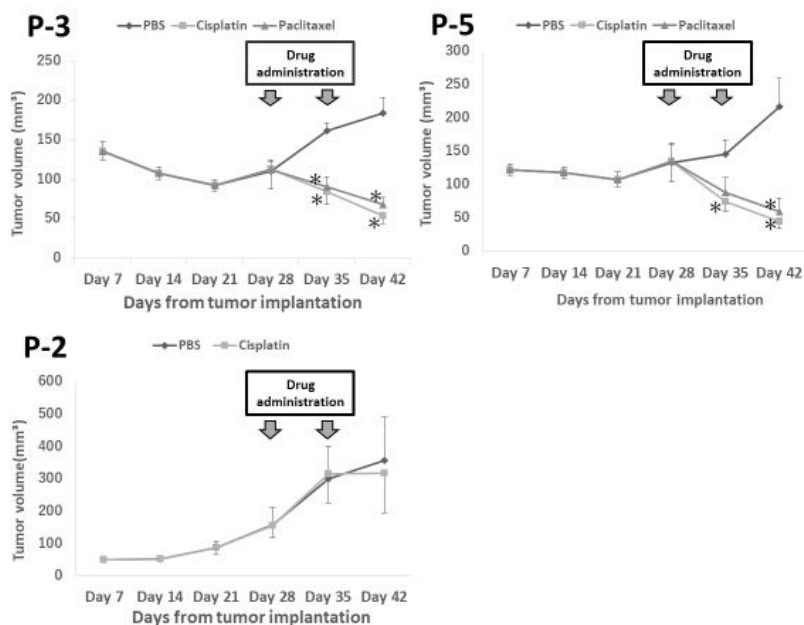


(図 2) : IHC 像 (EGFR・p53 発現) ( × 200 ) ( F0 は患者腫瘍、F1 は 1 代継代した腫瘍 )

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19、CK - 19 (共通)

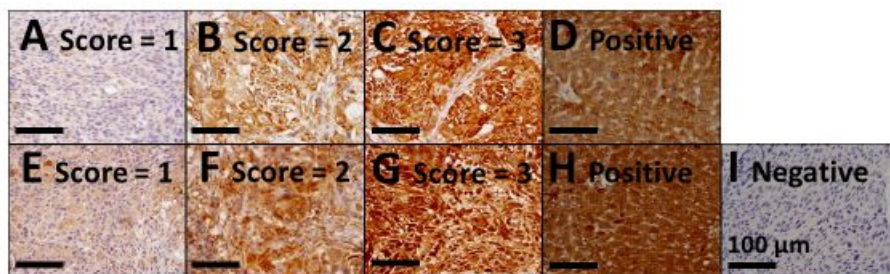
5)薬剤感受性試験の結果 in vivo

図 3 上段 P-3(下咽頭癌 PDX) P-5(副鼻腔癌 PDX)が Cisplatin responder 群、下段 P-2(下咽頭癌 PDX)が Cisplatin non-responder 群である。PDX モデルは 3 代継代したものを使用した。Cisplatin responder 群では Cisplatin, Paclitaxel とともに PBS(コントロール)と比較して有意に腫瘍縮小効果を認めただ一方、Cisplatin non-responder 群では Cisplatin と PBS に有意な腫瘍サイズ変化は認めなかった。



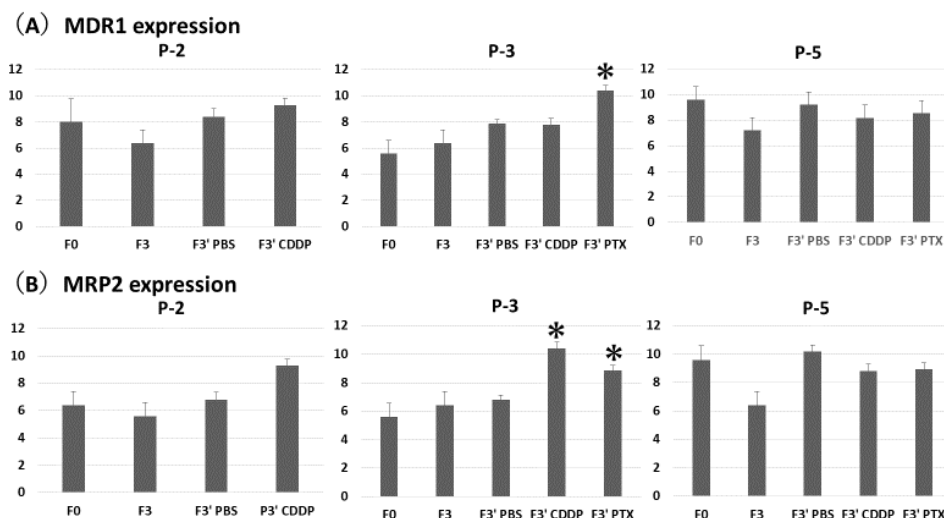
(図 3) : 薬剤感受性試験

6)ABC-transporter 発現変化について 今回は ABC-transporter のうち、Paclitaxel を基質とする MDR-1 と Cisplatin を基質とする MRP-2 に着目した。図 4 は MDR-1 と MRP-2 の免疫組織学的染色像である。図 4 に示すように MDR-1 強度スコア(A~C)とポジティブコントロール(D)、MRP-2 強度スコア(E~G)とポジティブ コントロール(H)、ネガティブコントロールは(I)とし、範囲スコアを 0 (0~10%)、1 (11~25%)、2 (26~50%)、3 (51~75%)、4 (76~100%) とした。発現スコアを強度スコアと範囲スコアの積として、その平均値を図 5 に示す。F0 が患者腫瘍、F3 が 3 代継代した PDX、F3 が薬剤投与後 (PBS, Cisplatin(CDDP), Paclitaxel (PTX)) の PDX の発現スコアである。いずれの症例も患者腫瘍と比較して、継代腫瘍およびコントロールでは有意な発現スコアの変化はなかったが、P-3 でのみ患者腫瘍と比較して Paclitaxel 投与後の MDR-1 発現スコア上昇および Paclitaxel 投与後および Cisplatin 投与後の MRP-2 発現スコア上昇を認めた。



(図 4): MDR-1、MRP-2 強度スコア)

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19、CK - 19 (共通)



(図 5): ABC-トランスポーター発現スコア

考察

Izumuchenko (Annals of Oncology, 2017) らが種々の固形癌 (1 例頭頸部扁平上皮癌含む) の PDX が実際の患者の薬剤感受性によく相関することを示したが、本研究でも PDX と実際の頭頸部癌患者 3 例の Cisplatin の効果は相関していた。また ABC-transporter 発現については少なくとも患者腫瘍の性質を継代腫瘍が受け継いでいることが示唆され、ABC-transporter の研究モデルとしても有用である可能性がある。しかしながら今回の研究では薬剤耐性と ABC-transporter 発現変化との関連を見出すことはできなかったため、さらに検討する症例を増やし PDX モデルを確立していく必要がある。

今後の展望

- ・頭頸部の希少癌 (唾液腺癌、上咽頭癌など) の PDX モデル確立
- ・PDX を利用した新薬開発

5 . 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計 0 件)

本研究の成果を Auris Nasus Larynx に論文投稿中

〔学会発表〕(計 3 件)

上野春菜、吉崎智一、当科における頭頸部癌 PDX モデル 5 例の検討、日本耳鼻咽喉科免疫アレルギー学会、2018

上野春菜、遠藤一平、笠原善弥、石川和也、上野貴雄、中西庸介、近藤悟、脇坂尚宏、後藤典子、吉崎智一、当科における頭頸部癌 PDX モデル 5 例の検討【第 2 報】、日本耳鼻咽喉科学会、2018

牧田春菜、吉崎智一、頭頸部癌での PDX モデルの確立と応用、日本耳鼻咽喉科免疫アレルギー学会、2019

〔図書〕(計 0 件)

〔産業財産権〕

出願状況 (計 0 件)

取得状況 (計 0 件)

〔その他〕

6 . 研究組織

(1) 研究分担者

(2) 研究協力者

科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属されます。