

# 博士の学位論文審査結果の要旨

申請者氏名 相澤 圭洋

横浜市立大学大学院医学研究科 頭頸部生体機能・病態医科学

## 審査員

主査	横浜市立大学大学院医学研究科	組織学	主任教授	大保 和之
副査	横浜市立大学大学院医学研究科	呼吸器病学	准教授	小林 信明
副査	横浜市立大学大学院医学研究科	血液・免疫・感染症内科学	講師	桐野 洋平

## 博士の学位論文審査結果の要旨

### Establishment of experimental salivary gland cancer models using organoid culture and patient-derived xenografting

(オルガノイド培養法と患者由来異種移植片を用いたヒト唾液腺癌実験モデルの樹立)

#### 【発表要旨】

唾液腺癌は唾液腺に発生する希少癌であり、組織学的サブタイプによっては予後が悪い場合がある。唾液腺癌に対する根治的な治療法は外科的切除のみであり、切除不能な再発・遠隔転移例に対する有効な化学療法は明らかになっていない。前臨床実験モデルが欠落しているため、唾液腺癌の分子細胞学的な病態はほとんど解明されておらず、治療法開発が妨げられている。そこで、最新の手法であるオルガノイド培養法、患者由来異種移植片を用いて唾液腺癌の実験モデルを樹立すること目的として本研究を行った。横浜市立大学附属病院・市民総合医療センターで外科的に切除された唾液腺癌のサンプルを採取し、オルガノイド、患者由来異種移植片の作製を行った。また樹立された患者由来異種移植片からもオルガノイド培養を行った。樹立されたそれぞれの実験モデルに対して、同所性異所移植による腫瘍形成能の評価、病理組織学的評価、RNA シーケンスによる遺伝学的評価、融合遺伝子の検索を行い、唾液腺癌の性質を維持した実験モデルであるかを検証した。結果として、オルガノイドでは唾液腺導管癌、粘表皮癌のモデルを、患者由来異種移植片では唾液腺腺様嚢胞癌、唾液腺導管癌、筋上皮癌、粘表皮癌のモデルをそれぞれ樹立した。樹立されたすべてのオルガノイドは同所性異所移植により生体内に腫瘍を形成した。オルガノイドの同所性異種移植による腫瘍、患者由来異種移植片は元となる腫瘍の組織学的特徴を再現しており、唾液腺癌の特徴を維持していることが確認された。遺伝学的評価では、樹立された実験モデルは由来とする患者・組織学的サブタイプごとにクラスタリングされ、また公共データベースにおける唾液腺癌の遺伝子発現プロファイルと比較しその特徴を共有することが確認された。樹立率は低いものの、唾液腺癌の実験モデルを樹立するという目的を達成した。これらの唾液腺癌の実験モデルは、新しい治療法の開発やこれらの悪性腫瘍の発生機構の解明に有用なリソースとして機能する可能性がある。

審査に当たり上記内容が発表され、続いて以下の質疑応答が行われた。以下回答とともに箇条書きにして記す。

まず副査の小林信明准教授の質問に対し、以下の回答がなされた。

1. 本研究における申請者の contribution はどのようなものか

研究目的に沿った実験内容の策定，培養，動物実験，病理切片の作製と染色，バイオインフォマティクス解析，論文執筆を担当した．培養と動物実験は共同研究者と分担する形で概ね 50%程度分を担当した．

2. 実験モデルが樹立できるものとできないものの間に差はあったか

樹立の成否との関連について，年齢，性別，TNM 分類といった臨床情報や免疫染色結果を対象に検定を行ったが，有意差のあるものは同定されなかった．所感としては病勢が強く患者の生命予後が悪かった症例で主に樹立できており，症例数が増えれば恐らく高悪性度な組織型，または高ステージのもので有意に樹立できるという形になると考えている．

3. 何故オルガノイド培養と患者由来異種移植片の 2 つのモデルを試したか．またそれらの使い分けはどうなるか

唾液腺癌の多くの組織学的サブタイプについては，オルガノイド培養，患者由来異種移植片のいずれも樹立例がなく，双方のモデルの樹立を目指すことに新規性があったために実験を行った．使い分けとしては，オルガノイドは細胞株に近く遺伝子操作がやりやすい，管理が容易といった利点があり，患者由来異種移植片は間質細胞を含むモデルである，腫瘍量を増大させやすいといった利点があり，今後の研究計画に合うものを選択していくということになるだろう．

4. RNA-seq による遺伝子変異解析ではドライバー変異となるような候補が拾われていないようだった．唾液腺癌の遺伝子変異に関する報告はどのようなものがあるか．また本研究ではゲノムシーケンスは行えなかったか

本研究では同定されなかったが，PIK3CA 変異，HRAS 変異，PTEN 欠失といったドライバー変異が報告されている．本研究では倫理審査を受ける際に血液などの正常サンプル採取を盛り込まない研究計画であったため，ゲノムシーケンスによる遺伝子変異同定を行わなかった．一定の既知の変異のみを捕捉するパネルシーケンスによる検索は実施可能と思われるので，今後の課題としたい．

続いて副査の桐野洋平講師の質問に対し、以下の回答がなされた。

1. 今後これらのモデルの使い道や、研究の発展はどのようなものになるか

臨床に近い利用法としては，オルガノイド，患者由来異種移植片に対する薬剤感受性試験を行う研究が考えられる．また唾液腺癌の病態解明を目的とし，遺伝子に操作を加えて反応を見るような，細胞株を使って行われるタイプの癌研究をなぞることができるようにと考えている．

## 2. 本研究の対象を唾液腺癌とした理由はなにか

肺癌や乳癌などの主要な癌腫，また耳鼻咽喉科が主に臨床で接する頭頸部扁平上皮癌には，細胞株をはじめとした実験モデルは既に存在し，研究に利用され，かつそれぞれの癌に対する化学療法にも一定の知見がある．一方で，唾液腺癌は利用可能な実験モデルが欠落しており，治療法の模索や病態解明のための研究も十分に行われておらず，このようなモデルを作製し研究を推進する有益性が高いと考えたため．

## 3. 培養や継代を続けていくと癌の mutation が起きてくると思われる．今回のモデルが唾液腺癌のモデルとして使える基準や目安はどのようなものか

一般的には患者検体から培養開始して passage 10 程度までが患者腫瘍の形質を維持しているプライマリー培養と受け入れられるラインと思われる．今回は passage 20 程度のものを用いて移植ほか各種の実験をしているが，モデルは p50 程度まで伸びている．passage 50 程度でも組織学的特徴を維持した生体内腫瘍形成能，増殖能，細胞の見た目の 3 点に大きな違いがないので，根本的な性質は維持されていると考えており，それらに大きな変化がない間は唾液腺癌のモデルとして使用はできると考えている．

最後に主査の大保和之教授の質問に対し，以下の回答がなされた．

### 1. 実験モデルの遺伝子発現に対する主成分分析では各モデルが由来する組織型ごとにグループ分けされていたが，癌の体細胞をそのまま培養した以上当然の結果ではないか．また，同じ組織型の中でサブグループに分けられるような結果はあったか

前者については，線維芽細胞などの正常組織でなく目的とする癌細胞が培養・増殖され，かつ性質を大きく変異させていないことを確認するための実験であり，今回望まれる結果が得られたものである．後者については，自検体では組織学的サブタイプごとおよび全体としても検体数が十分でなく，サブグループを明確に同定できるような結果は得られなかった．

### 2. 培養液に添加するサイトカイン類の組成について工夫した点はあるか

オルガノイド培養で一般的に用いられるサイトカインをほぼ網羅的に含む点を重視し，膵臓癌オルガノイド培養の組成を流用するところから始めた．研究の過程では，唾液腺の正常幹細胞の研究で FGF2 が使用されていることを参考に FGF10 を FGF2 に変更したり，AR 陽性の検体に対してアンドロゲン添加を試みたり，各サイトカインの添加量を微調整したりといくつかの調整を試みたが，それらの分岐した培養法で特にモデルの樹立率や増殖効率に差が見られなかったため，結果の段階では膵臓癌オルガノイド培養と同じ組成で行ったものを報告する形となった．

3. 今回の研究のゴールはどのようなものになるか？ また次の研究計画は？

今回の研究のゴールは、実験モデルが欠落している研究背景からそれ自体に新規性はあると考えてはいるものの、唾液腺癌の実験モデルの作製法という methodology の提示に留まる。今後の研究計画としては、今回作製したモデルを用いて、どのような遺伝子が唾液腺癌の発展に関わっているかを明確するといった唾液腺癌の病態の解明、あるいはより一般的な発癌・進展機構の解明といったレベルの研究を目指したい。具体的には唾液腺導管癌における HER2 の関与およびその経路に関する研究が進行している。

以上、審査発表、質疑応答は適切になされた。結果、本論文は横浜市立大学・医学博士（甲号）の学位に値する研究成果を示したものと判断された。