

学位論文の要旨

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)

March, 2024
(2024年3月)

Yoshihiro Aizawa
相澤 圭洋

Otolaryngology, Head and Neck Surgery
Yokohama City University Graduate School of Medicine
横浜市立大学 大学院医学研究科 医科学専攻 頭頸部生体機能・病態医科学

(Doctoral Supervisor : Nobuhiko Oridate, Professor)
(指導教員 : 折館 伸彦 教授)

学位論文の要旨

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)

<https://doi.org/10.1007%2Fs13402-022-00758-6>

1. 序論

唾液腺癌は全悪性腫瘍の 0.3%程度を占める希少癌であり (Carvalho et al., 2005), 組織型によっては生命予後の悪い致死的な疾患であるが (Ali et al., 2013, Boon et al., 2018, Sur et al., 1997), その病態解明は十分でない (Stenman et al., 2014). 癌の病態解明には癌細胞株などの疾患モデルを用いた研究が有用であるが, 唾液腺癌には現在まで確固とした実験モデルが存在しない (Phuchareon et al., 2009). 本研究では, 近年開発された患者腫瘍組織移植モデル (Hidalgo et al., 2014) とオルガノイド培養法 (Kondo and Inoue, 2019) を用いて, 唾液腺癌の実験モデルを新たに創出した.

2. 実験材料と方法

ヒト唾液腺癌検体

横浜市立大学病院または横浜市立大学医療センターで唾液腺癌の診断となり外科的切除を施行された患者より, 切除検体の一部をヒト唾液腺癌検体として採取した. 手術に先立ち, すべての患者から書面によるインフォームド・コンセントを得た. 本研究は, 横浜市立大学の倫理委員会で承認され (承認 ID : A171130010), ヘルシンキ宣言に基づいて実施された.

ヒト唾液腺癌の患者腫瘍組織移植モデル (Patient-derived xenografts ; PDX) の作製

採取したヒト唾液腺癌検体の一部を免疫抑制マウスの皮下に移植し, 増殖させることで, 患者腫瘍組織移植 (PDX) モデルを作製した. すべてのマウスは, 横浜市立大学医学部の動物実験委員会で承認された手順に従って維持され, 取り扱われた (承認 ID : F-A17-048, F-A-20-031).

ヒト唾液腺癌オルガノイドモデルの作製

ヒト唾液腺癌検体あるいは作製に成功した患者腫瘍組織移植モデルを細かく破碎し、リベラーゼを用いて酵素的に分解して、マトリゲル培地で覆った培養皿に播種し、ヒト唾液腺癌オルガノイドモデルを作製・培養した。作製に成功したオルガノイドは免疫抑制マウスの顎下腺あるいは皮下に移植し、腫瘍形成能を評価した。

病理組織学的評価

ヒト唾液腺癌検体、作製した患者腫瘍組織移植モデル、オルガノイドにつき、ヘマトキシリン・エオジン染色と免疫組織化学染色を行い、各モデルの病理組織学的な類似性の評価を行った。免疫組織化学染色にはAR, CK, HER2, α -SMA, p63, S-100, GCDPF-15の抗体を使用した。

次世代シーケンサーを用いたトランスクリプトーム解析 (RNA-seq)

作製したヒト唾液腺癌の患者腫瘍組織移植モデル、オルガノイドにつき、RNA-seqを行い、トランスクリプトームや遺伝子変異の類似性について評価を行った。

3. 結果

ヒト唾液腺癌 PDX モデルとオルガノイドモデルの作製

40 症例の唾液腺癌検体を採取し、PDX モデル、オルガノイド、また PDX モデルの樹立に成功したものからは PDX 由来オルガノイドの樹立を試みた。結果として、PDX モデルでは唾液腺導管癌で 2 系統 (YCU-SDC-14 PDX, YCU-SDC-20 PDX), 筋上皮癌で 1 系統 (YCU-MYEC-16 PDX), 粘表皮癌で 1 系統 (YCU-MEC-24 PDX) を樹立した。ヒト検体を用いたオルガノイドでは唾液腺導管癌で 3 系統 (YCU-SDC-14, YCU-SDC-20, YCU-SDC-32), 粘表皮癌で 1 系統 (YCU-MEC-24) を樹立した。PDX モデルを用いたオルガノイドでは唾液腺導管癌で 2 系統 (YCU-SDC-14X, YCU-SDC-20X), 粘表皮癌で 1 系統 (YCU-MEC-24X) を樹立した。作製されたオルガノイドを免疫不全マウスの皮下および顎下腺に移植したところ、すべての系統で腫瘍の形成が確認された。

ヒト唾液腺癌 PDX モデルとオルガノイドモデルは、元の腫瘍の組織学的特徴を維持している

作製された PDX モデルと、免疫不全マウスにオルガノイドを移植して形成された腫瘍についてヘマトキシリン染色、免疫組織化学染色を行った。作製された各モデルは、唾液腺導管癌における管状病変やコメドネクロシスを伴う篩状構造や、粘表皮癌における粘液細胞や透明細胞に裏打ちされた嚢状構造など、元となった腫瘍の組織重型に特有の性質を維持し、免疫組織化学染色の染色パターンも一致しており、元の腫瘍の性質を再現していることが確認された。

ヒト唾液腺癌 PDX モデルとオルガノイドモデルは、元の腫瘍の遺伝子発現プロファイルや遺伝学的を維持している

作製された PDX モデルとオルガノイドについて RNA-seq を行い、遺伝子発現プロファイルを行った。遺伝子の発現パターンは元となった患者ごとや組織亜型ごとに類似しており、公共データベースから入手した唾液腺癌の遺伝子発現パターンと比較しても組織型ごとに類似性を持っていた。このことから、作製された各モデルは唾液腺癌の特徴を維持していると考えられた。

4. 考察

この研究では、PDX モデルとオルガノイド培養法を用いて、複数の組織型でヒト唾液腺癌の前臨床モデルを作製した。作製したヒト唾液腺癌 PDX モデル、オルガノイドモデルの組織学的、遺伝的な相同性と再現性を確認した。特筆すべきことに、唾液腺導管癌の PDX モデル、オルガノイドモデルの樹立は世界初である。

この研究の限界や欠点として、検体の不足のために患者検体と直接的に遺伝子発現プロファイルや遺伝子変異を比較することができなかった点や、PDX 由来オルガノイドについてはヒト唾液腺癌モデルを維持するのに有用である一方でマウス細胞の混入が危惧される点が挙げられる。

これらのモデルは、唾液腺癌の病因を解明するための *in vitro* および *in vivo* モデルとして、また将来の前臨床医薬品開発のためのモデルとして機能する可能性がある。

引用文献

Ali, S., Sarhan, M., Palmer, F. L., Whitcher, M., Shah, J. P., Patel, S. G., and Ganly, I. (2013). Cause-specific mortality in patients with mucoepidermoid carcinoma of the major salivary glands. *Ann Surg Oncol*, 20(7), 2396–2404.

Boon, E., Bel, M., van Boxtel, W., van der Graaf, W. T. A., van Es, R. J. J., Eerenstein, S. E. J., Baatenburg de Jong, R. J., van den Brekel, M. W. M., van der Velden, L. A., Witjes, M. J. H., Hoeben, A., Willems, S. M., Bloemena, E., Smit, L. A., Oosting, S. F., Jonker, M. A., Flucke, U. E., and van Herpen, C. M. L. (2018). A clinicopathological study and prognostic factor analysis of 177 salivary duct carcinoma patients from The Netherlands. *Int J Cancer*, 143(4), 758–766.

Hidalgo, M., Amant, F., Biankin, A. V., Budinská, E., Byrne, A. T., Caldas, C., Clarke, R. B., de Jong, S., Jonkers, J., Mælandsmo, G. M., Roman-Roman, S., Seoane, J., Trusolino, L., and Villanueva, A. (2014). Patient-derived Xenograft models: An emerging platform for translational cancer research. *Cancer Discov*, 4(9), 998–1013.

Kondo, J., and Inoue, M. (2019). Application of Cancer Organoid Model for Drug Screening and Personalized Therapy. *Cells*, 8(5), 470.

Phuchareon, J., Ohta, Y., Woo, J. M., Eisele, D. W., and Tetsu, O. (2009). Genetic profiling reveals cross-contamination and misidentification of 6 adenoid cystic carcinoma cell lines: ACC2, ACC3, ACCM, ACCNS, ACCS and CAC2. *PLoS ONE*, 4(6), 6–13.

Stenman, G., Persson, F., and Andersson, M. K. (2014). Diagnostic and therapeutic implications of new molecular biomarkers in salivary gland cancers. *Oral Oncol*, 50(8), 683–690

Sur, R. K., Donde, B., Levin, V., Pacella, J., Kotzen, J., Cooper, K., and Hale, M. (1997). Adenoid cystic carcinoma of the salivary glands: A review of 10 years. *Laryngoscope*, 107(9), 1276–1280.

Thompson, L. D. R. (2006). World health organization classification of tumours: Pathology and genetics of head and neck tumours. *Ear Nose Throat J*, 85(2), 74.

論文目録

I 主論文

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

Aizawa, Y., Takada, K., Aoyama, J., Sano, D., Yamanaka, S., Seki, M., Kuze, Y., Ramilowski, J. A., Okuda, R., Ueno, Y., Nojima, Y., Inayama, Y., Hatakeyama, H., Hatano, T., Takahashi, H., Nishimura, G., Fujii, S., Suzuki, Y., Taniguchi, H., & Oridate, N.

Cell Oncol, 46(2): 409–421

II 副論文

なし

III 参考論文

Establishment of PDX-derived salivary adenoid cystic carcinoma cell lines using organoid culture method.

Takada, K., Aizawa, Y., Sano, D., Okuda, R., Sekine, K., Ueno, Y., Yamanaka, S., Aoyama, J., Sato, K., Kuwahara, T., Hatano, T., Takahashi, H., Arai, Y., Nishimura, G., Taniguchi, H., & Oridate, N.

Int J Cancer, 148(1), 193-202, 2021