

論文の内容の要旨

論文題目 A novel patient-derived pancreatic acinar cell carcinoma cell line shows high sensitivity to bortezomib

(新規患者由来膵腺房細胞癌細胞株はボルテゾミブに高い感受性を示す)

氏名 星 大輔

序文

膵外分泌腫瘍の大半は膵導管腺癌 (pancreatic ductal adenocarcinoma, PDAC) であり、膵腺房細胞癌 (pancreatic acinar cell carcinoma, PACC) は 1% と稀な腫瘍である。組織学的には膵腺房細胞に類似した構築や外分泌酵素の産生が特徴とされる。確立された化学療法は無く、全生存期間 18.1-53 ヶ月と予後不良である。凍結検体や FFPE 検体を用いたゲノム解析検討からは、PDAC で頻度の高い *KRAS*、*DPC4* の変異は比較的稀であること、DNA 修復関連遺伝子の変異(45%)およびこれとは相互排他的な特異的融合遺伝子(23%)が高頻度で認められること、コピー数変化が PDAC より顕著であること、などが報告されている。しかし、疾患の希少さもあり細胞株の報告は 3 つのみであり、いずれも腺房細胞としての形質の検討は不十分で PACC 研究における有用性には疑問が残る。三次元オルガノイド培養は基底膜類似物質であるマトリゲルと種々の因子により幹細胞ニッチを再現することで正常幹細胞の長期培養を可能にした手法である。その有用性から感染症、発生、再生等のモデルとして幅広く使用されており、近年では臨床検体からのがん細胞の培養にも利用されている。胆膵系進行がんの臨床検体から網羅的な培養を試みる過程で PACC の 1 症例に遭遇したことから、本研究においてその三次元オルガノイド培養を試みた。最終的に PACC 細胞株として利用可能なオルガノイドの樹立に成功し、薬剤スクリーニングによる治療候補薬の探索や遺伝子導入による機能解析などを実施し、新規の知見を得ることができた。

方法

各種臨床検体の残余検体から細胞を単離し、三次元オルガノイド培養の一種であるマトリゲル重層オルガノイド培養を施行した。腫瘍原性評価としてヌードマウス皮下にオルガノイドを移植し、形成された腫瘍や残存小片に対し組織学的検討やオルガノイド培養を行った。409 のがん関連遺伝子をターゲットとした次世代シーケンシングを、FFPE 検体およびオルガノイドから抽出したゲノム DNA に対して施行し、正常組織の FFPE 検体で得られず、いずれかの検体で 10% 以上の変異保有率を有したものを有意とした。薬剤感受性試験の際は 96 ウェル U 底プレートに 1 ウェルあたり 5 μ l のマトリゲルを進展、固化後に 5×10^3 個の細胞を播種した。それぞれの薬剤を添加後、CellTiter-Glo3D による ATP 濃度測定ないし Cell³iMager duos による生細胞面積測定で細胞生存率を測定した。

結果

(1)PACC 患者由来の各種臨床検体を用いたオルガノイド培養

症例は腹痛を主訴に来院した 48 歳女性で、画像検査で 30mm 大の膵頭部腫瘍が発見された。診断目的で超音波内視鏡下穿刺吸引法（生検）が施行された他、腫瘍により生じた胆管閉塞の解除と腫瘍浸潤の確認の目的で、内視鏡的逆行性胆管膵管造影と胆汁細胞診（胆汁）も行われた。生検検体は組織学的に両染色の細胞質を持った細胞が充実性構造とわずかに線腔を形成しており、腺房細胞のマーカーである CEL が陽性、神経内分泌マーカーが陰性であったため PACC と診断された。後日、膵頭十二指腸切除術（手術）が施行された。生検、胆汁、手術検体のそれぞれからオルガノイド培養を行なったが、これらの初代培養オルガノイドは凍結解凍後に良好な増殖を示さず、これらのオルガノイドからの直接の細胞株の樹立は断念した。

(2)生検由来オルガノイドの皮下腫瘍化を介した細胞株樹立

生検由来オルガノイドはヌードマウス皮下への移植により 7x5 mm 大の異種皮下移植腫瘍（ゼノグラフト）を形成した。この腫瘍は原発巣と類似の組織像を呈し、PACC の性質を維持した腫瘍であると考えられた。ゼノグラフトから再度オルガノイド培養を行うと、組織像はゼノグラフトや原発巣と類似していた。免疫ブロットでも CEL と同じく腺房細胞マーカーであるトリプシンが高発現、導管細胞のマーカーである CD133 は発現がなく、腺房細胞の性質を保持していた。ゼノグラフトの由来である生検由来オルガノイドは CEL が低発現、トリプシンがやや低発現、CD133 はわずかに発現しており、非腫瘍細胞がある程度混入していたこと、ゼノグラフト形成とオルガノイド培養を経て PACC 細胞、特に CEL 陽性細胞が濃縮された事が示唆された。また、ゼノグラフト由来オルガノイドの培養上清にはトリプシンが多く含まれ、外分泌能を有する事が示唆された。このオルガノイドは凍結解凍後の再培養が可能で半年以上安定的に継代・培養が可能であったため、細胞株として樹立出来たものと判断した。

(3)ゲノム解析による原発巣、初代培養オルガノイド、細胞株の比較

原発巣とオルガノイドの遺伝的形質の類似性を確認するため、409 の癌関連遺伝子をターゲットとした次世代シーケンシングを行なった。原発巣の FFPE 検体には *ARNT* にミスセンス変異 c.2170G>A (p.Gly724Ser)、*MYC* にノンセンス変異 c.148C>T (p.Gln50Ter)、*CDKN2A* に 9 塩基欠失 c.117_125del (p. Ala40_Asn42del)、*EP400* にミスセンス変異 c.2644C>T (p.Pro882Ser)、*ATRX* に 1 塩基欠失 c.1691delA (p.Asn564fs)を認めた。手術由来オルガノイドではこれと比較して *HOOK3* にミスセンス変異 c.1042A>G (p.Met348Val)、*CSMD3* にミスセンス変異 c.2962G>C (p.Asp988His)が生じ、*MYC* の変異は消失し、その他の変異は頻度が増加していた。ゼノグラフト由来オルガノイドでは手術由来オルガノイドと比較して *ARNT*、

HOOK3、*CDKN2A* の変異が消失し、*EP400*、*ATRX*、*CSMD3* の変異は保持されていた。この間、頻度 50% の SNP が 0% ないし 100% 近くに変化する LOH をゲノムワイドに認めたため、手術・ゼノグラフト由来オルガノイドに対しアレイ CGH を追加した。いずれもゲノムワイドな異数性があり傾向は一致していたものの、ゼノグラフト由来オルガノイドのみで *CDKN2A* を含む 9 番染色体短腕の両アレル欠損が見られ、細胞株の樹立に寄与したと考えられた。融合遺伝子は最も頻度の高い *SND1-BRAF* を逆転写 PCR で検索したが、検出しなかった。

(4)PACC 細胞株を用いた治療薬スクリーニング

細胞株樹立の利点を活かし、新規治療候補薬探索および腫瘍の本態解明のため薬剤スクリーニングを試みた。まず膀胱癌治療に頻用される薬剤について検討すると、細胞生存率は最大で約 80% 減少したが、高濃度でも完全には死滅しなかった。364 種の薬剤によるスクリーニングを濃度 1 μ M で施行すると、完全に死滅する薬剤が非常に多数で候補薬探索や本態解明には不適であったが、生細胞面積が ATP 濃度と高度に相関する事を見出し、以降の生存率検討は生細胞面積で行なった。同スクリーニングを濃度 10nM で行うと、数種類で十分な効果を得た。そのうち 6 つを単剤で使用し薬効を確認すると、ボルテゾミブとバフィロマイシン A1 は 30nM 以下でもほぼ 100% の殺細胞効果を得た。ボルテゾミブは血液腫瘍で臨床利用されている薬剤であり、PACC の治療候補薬になりうると考えた。

(5)PACC 細胞株における CD133 の機能解析

遺伝子導入による機能解析も細胞株樹立により初めて可能であり、導管細胞マーカーかつがん幹細胞マーカーである CD133 について検討を行なった。分化や腫瘍形成能に影響が生じることを予想し、コントロールと野生型、恒常活性化型、恒常不活性型の 4 種のベクターをレンチウイルスによって導入した。いずれの株もヌードマウス皮下で形成した腫瘍の組織像や径に有意な差は無かった。ただし、一部の株では CEL や CD133 の発現消失が生じており、CEL が PACC の絶対的な指標ではない事、PACC において CD133 発現が腫瘍維持に不利な可能性がある事が示唆された。

考察

本研究では PACC の新規患者由来細胞株を樹立し、免疫ブロット、組織学的検索、次世代シーケンシング、アレイ CGH を用いることで、この細胞株が腺房細胞の性質を保持している事、原発巣とも高い類似性を示す事を示した。PACC のオルガノイド細胞株樹立は調べた範囲で既報がなく、新規性の高い報告と考えられた。原発巣で検出し、手術由来オルガノイドでも見られた *CDKN2A* の変異や、これらに加えてゼノグラフト由来オルガノイドでも見られた *ATRX* の変異は、データベース上で近傍の領域に似た変異を生じた例が多数報告されており、ドライバー変異である可能性が示唆された。また、細胞株樹立の利点を生かして薬

剤スクリーニングや遺伝子導入による機能解析を行った。スクリーニングではボルテゾミブを治療候補薬として同定した。ボルテゾミブの抗腫瘍効果は NF- κ B 経路の阻害、血管新生の抑制、小胞体ストレスの増強の 3 種が知られているが、他の薬剤の結果や培養環境から、本細胞株においては小胞体ストレスの増強が主な抗腫瘍作用と想定された。機能解析としては CD133 を導入し、分化や腫瘍形成能に有意な影響を見出せなかったが、PACC における CEL 発現の柔軟性や、CD133 が腫瘍維持に不利な可能性について知見が得られた。

結論

PACC 患者検体からオルガノイドとして細胞株を樹立し、PACC としての性質を保持していることを確認した。貴重な研究資源として PACC の基礎および橋渡し研究における有用性が期待される。