

氏 名	宮本 瞬輔
(ふりがな)	(みやもと しゅんすけ)
学位の種類	博士(医学)
学位授与番号	甲 第58号
学位審査年月日	令和5年1月18日
学位授与の要件	学位規則第4条 第1項該当
学位論文題名	Validation of a Patient-Derived Xenograft Model for Cervical Cancer Based on Genomic and Phenotypic Characterization (ゲノムおよび表現型解析に基づく子宮頸癌患者 由来異種移植モデルの検証)
論文審査委員	(主) 教授 李 相雄 教授 廣瀬 善信 教授 高井 真司

### 学位論文内容の要旨 (案)

#### 【目的】

患者由来異種移植 (Patient-Derived Xenograft; PDX) モデルはマウスを用いて腫瘍組織を増加させることができ、腫瘍組織分析に十分なサンプルを提供できる利点がある。新しい動物モデルである PDX モデルは元腫瘍の生物学的な特徴を保持しているため、前臨床およびトランスレーショナル研究で注目されている。他癌種においてはいくつかの PDX モデルが確立されているが、子宮頸がん PDX モデルの報告は限られている。この研究の目的は子宮頸がん由来の PDX モデルを作製し、元腫瘍で特定された特徴 (病理学的所見、遺伝子変異、および遺伝子発現) が PDX 腫瘍の特徴と一致するかどうかを検証することである。

#### 【方法】

## 1. 患者と組織サンプル

この研究には子宮頸がんと診断された 22 人の患者が登録された。手術後の検体から新鮮な腫瘍組織を採取した。採取された腫瘍を 3 つに分け、移植用、病理学的分析用、遺伝子解析用とした。

## 2. 動物

すべての動物実験は、大阪医科薬科大学動物実験委員会（承認番号 21007-A）によって承認された。この研究では、4 ~ 8 週齢の雌 NOD.CB17-PrkdcSCID/J マウス を使用して、ヒト子宮頸がん組織を移植した。

## 3. 免疫組織化学による病理学的解析

患者腫瘍および PDX 腫瘍からの組織切片は H&E で染色した。免疫組織化学分析では、P16 および Ki-67 抗体を使用して染色した。顕微鏡 (BZ-X700 シリーズ) を使用して画像を撮影した。

## 4. 患者由来の異種移植の確立

腫瘍移植時には、イソフルランガス麻酔を使用した。腫瘍組織を断片 (3 mm<sup>3</sup>) に切り刻み、Matrigel と混合し、免疫不全マウスの背部皮下組織に移植した。生着を確認した後に、マウスを安楽死させた。異種移植腫瘍組織はいくつかの断片に分割し、同様の処置で移植を繰り返すことにより次世代の PDX 腫瘍を作製した。

## 5. 細胞外小胞 (Extracellular Vesicles; EVs) の準備

組織サンプルを、10%FBS を含む 4 ml DMEM / F12 に浸し、48° C で 3 時間保存した。組織に浸した培地を 2,000×g で 30 分間遠心分離し、0.22 μ m フィルターでろ過して細胞破片を除去した。Optima XE-100、および Ultra-Clear チューブを使用して、100,000×g で 90 分間超遠心分離を行った。EVs の存在をウエスタンブロッティング、ナノ粒子追跡分析 (Nanoparticle Tracking Analysis; NTA)、および電子顕微鏡法を使用して確認した。

## 6. ウエスタンブロット分析

EVs サンプルは Laemmli SDS サンプルバッファーで溶解した。タンパク質サンプル

を SDS-PAGE で分離し、ポリフッ化ビニリデン膜に転写した。メンブレンを 1X TBS 中の 10% BSA でブロックし、CD63 および CD9 に対する特異的な一次抗体と共にインキュベートした。4°Cで一晩静置して洗浄後に、メンブレンをマウス免疫グロブリン二次抗体と 1 時間インキュベートした。ECL Plus を使用して、バンドを可視化した。

#### 7. ナノ粒子追跡分析

ナノ粒子追跡分析は NanoSight NS 300 を使用した。収集した EVs ペレットを 1 ml の PBS に再懸濁し、分析前に 1:300 に希釈した。サンプルを装置にロードし分析した。

#### 8. 電子顕微鏡での EVs 観察

EVs はポリ-L-リジン溶液でコーティングされたビーズとともにインキュベートした。乾燥後、ビーズを洗浄し 0.1 M リン酸緩衝液 (pH 7.4) 中の 1.25% グルタルアルデヒドで固定した。ビーズをリン酸緩衝液で再度洗浄し、1%四酸化オスミウムで 40 分間固定した。白金-パラジウムを試料の表面に蒸着し、走査型電子顕微鏡で観察した。

#### 9. DNA および RNA の抽出

MagMAX DNA Multi-Sample Ultra 2.0 および MagMAX mirVana Total RNA Isolation Kits を使用して、元腫瘍、PDX (F0 および F2) 腫瘍、および両方の EVs から DNA および RNA を抽出した。

#### 10. Amplicon sequencing

アンプリコン配列決定は、Ion AmpliSeq Cancer Hotspot Panel v2 を使用した。ライブラリーのシーケンスには、Ion GeneStudio S5 シリーズを使用した。Torrent Suite ソフトウェアを使用して、バリエントコールを実施した。IonReporter ソフトウェア 5.10 を使用して、バリエントに注釈を付け、複数のデータベースからの情報を統合した。変異対立遺伝子頻度 (> 10%) を持つ腫瘍特異的な体細胞変異が検出され、その変異データはフィルター処理された。

#### 11. RNA sequencing

遺伝子発現解析のための RNA シーケンスは Ion AmpliSeq RNA Cancer Panel を使用した。テンプレートは、Ion One Touch2 システムを使用して作製された。IonTorrent シーケンシングプラットフォームで RNA 由来のアンプリコンをシーケンシングした後、各遺伝子にマップされた読み取り数をカウントして、サンプルに存在する標的遺伝子の発現レベルを決定した。

## 12. データ分析

すべての配列決定データは Torrent Suite Software v5.12.1 および Ion Reporter 5.0 ソフトウェアを使用して処理した。データは Python v3.9.5 で記述されたスクリプトを使用して処理された。遺伝子変異のアノテーションには ANNOVAR (2019Oct24) のフィルターベースのアノテーションが使用された。描画ツールは Paplot v0.5.5 と matplotlib/seaborn を使用した。スーパーコンピューティングのリソースは東京大学医科学研究所ヒトゲノム解析センターから提供された。

### 【結果】

#### 1. 子宮頸がん PDX モデルの確立

移植の成功率は 50% (11/22) であった。患者の年齢の中央値は 48.5 歳 (33 ~ 70 歳) で、13.6% (3/22) が FIGO ステージ III の子宮頸がんであった。移植率が高い傾向にあったのは腫瘍が大きく (4cm 以上)、血清 SCC および CA-125 値が高く、FIGO 病期が進行した患者腫瘍であったが、その差は統計的に有意ではなかった ( $p = 0.1$ ,  $0.1$ ,  $0.1$ , および  $0.8$ )。PDX モデルの確立に成功した 11 人の患者のうち 5 人が再発した。PDX モデルを確立できなかった 11 人の患者はいずれも再発しなかった。

#### 2. 患者および PDX マウス腫瘍の組織学的評価

PDX 腫瘍 4 症例 (PDX 71、75、81、および 99) を病理組織学的に検討したところ、元腫瘍と同様の構造的および形態学的特徴を保持していた。免疫組織化学的検討においても元腫瘍と PDX 腫瘍は類似のタンパク質発現プロファイルを示した。元腫瘍と PDX のほとんどのがん細胞は p16 の強い発現を示した。元腫瘍と PDX の Ki-67 標識率も類似しており、PDX 71 では 66% と 48%、PDX 75 では 35% と 49%、

PDX81 では 61% と 72%、PDX 99 では 34% と 55% であった。

### 3. 患者腫瘍および PDX 腫瘍のゲノムプロファイリング

患者腫瘍と PDX マウス腫瘍の間の機能獲得/喪失性変異の重複を、10/11 の PDX 腫瘍で解析した。患者腫瘍と F0 腫瘍のバリエントアレル頻度 (VAF) 値をピアソンの相関係数で示すと、PDX 71 で 0.994、PDX 75 で 0.927、PDX 81 で 1.00、PDX 151 で 0.915、PDX 160 で 0.927、PDX 161 で 0.934、PDX 231 で 0.999 および PDX 251 で 0.997 であった。一方、PDX 99 では -0.455、PDX 126 では 0.402 であった。

### 4. 患者腫瘍および PDX 腫瘍の RNA 発現解析

患者腫瘍と PDX 腫瘍の遺伝子発現は類似のプロファイルを示し、高発現群と低発現群はクラスター化していた。検討症例 (PDX 71, 75, 81, 151, 160, 161, 231, 251) では、患者 (P) 腫瘍と PDX (F0) 腫瘍の腫瘍遺伝子の発現に関するピアソンの相関係数はそれぞれ 0.898, 0.768, 0.910, 0.669, 0.837, 0.808, 0.852, 0.907 であった。F0 腫瘍の遺伝子発現は P 腫瘍の遺伝子発現とよく相関していた。PDX 99 および 126 では、P 腫瘍と F0 腫瘍の遺伝子発現に関するピアソンの相関係数はそれぞれ 0.804 および 0.739 であった。一方、P 腫瘍-F2 腫瘍間の遺伝子発現の相関係数はそれぞれ 0.653 と 0.699 であった。

### 5. 患者腫瘍および PDX 腫瘍における EV の RNA 発現解析

患者腫瘍の EV (P-EV) と PDX 腫瘍のそれ (F-EV) は類似のプロファイルを示し、高発現群と低発現群はクラスター化していた。PDX 99、126、151 では、P-EV と F0-EV 間の遺伝子発現に関するピアソンの相関係数は、それぞれ 0.766、0.714、0.734 であり、P-EV と F0-EV の遺伝子発現はよく相関していた。一方、PDX 99、126 における P-EV と F2-EV の遺伝子発現相関係数はそれぞれ 0.740 と 0.676 であった。

## 【結論】

試みた症例の半数 (11/22) において、子宮頸がんの PDX モデルが樹立できた。病理所見およびゲノム所見の解析結果においても、患者腫瘍と PDX 腫瘍の間に強い類似性が認められた。また、EVs における遺伝子発現も両群間で類似していた。子宮頸がん

を用いた本 PDX モデルは、原発腫瘍の表現型を概ね保持していると考えられ、がんの  
トランスレーショナル研究にとって有用なツールとなる可能性がある。

## 論文審査結果の要旨 (案)

新しい動物モデルである患者由来異種移植 (Patient-Derived Xenograft; PDX) モデルは元腫瘍の生物学的な特徴を保持しているため、前臨床およびトランスレーショナル研究で注目されている。他癌種においてはいくつかの PDX モデルが確立されているが、子宮頸癌 PDX モデルの報告は限られている。本研究は、子宮頸癌 PDX モデルを作製し、それが元腫瘍の特徴を再現できているかの検証を行ったものである。

申請者は、22 人の子宮頸癌患者から手術時に摘出された腫瘍を用い、免疫不全マウスの皮下に異種移植を行うことで、PDX モデルを作製した。腫瘍の生着率は 50% (11/22) であり、報告されている他癌腫 PDX モデルと比較しても遜色のない成績であった。次に作製された PDX モデルが元腫瘍の特徴を再現できているかの検証を行った。病理組織解析では、H&E 染色、P16 および Ki-67 抗体を使用して免疫組織化学染色を行い、元腫瘍と PDX 腫瘍が同様の形態および染色性を示したことを確認した。次に各腫瘍から抽出した DNA、RNA を用いて次世代シーケンサーによる遺伝子的特徴の比較を行った。DNA 解析による遺伝子変異比較では、元腫瘍と PDX 腫瘍は類似したゲノムプロファイリング結果を示した。また、変異アレル頻度 (Variant Allele Frequency; VAF) 値を比較したところ、ほとんどの例で統計学的に強い相関を示した。RNA 解析による遺伝子発現比較では、元腫瘍と PDX 腫瘍の遺伝子発現は強い相関関係を示した。本研究において新規性があるのは、元腫瘍と PDX 腫瘍から抽出した細胞外小胞 (Extracellular Vesicles; EVs) に含有される RNA 解析を行った点である。この結果においても元腫瘍 EVs と PDX 腫瘍 EVs の遺伝子発現は強い相関関係を示した。以上の結果は、作製された子宮頸癌 PDX モデルが元腫瘍の特徴を広範囲かつ高度に保持していることを示している。従って、本 PDX モデルはがんのトランスレーショナル研究のための有用なツールとなる可能性を示唆している。

以上により、本論文は本学大学院学則第 13 条第 1 項に定めるところの博士 (医学) の学位を授与するに値するものと認める。

(主論文公表誌)

Cancers 2022 Jun 16;14(12):2969.

doi:10.3390/cancers14122969