

肺腺癌 PDX 由来の新規細胞株の生物学的特性とその応用

酒井誠之介、西中栄子、西銘千代子、川井健司、鈴木雅実、秦順一、山本大地

(公財)実中研 トランスレーショナルリサーチ部門

Introduction:

肺腺がんは依然として治療が難しく、予後不良と関連しています。肺腺癌患者の転帰を改善するには、適切な異種移植モデルを開発することが重要です。患者由来異種移植(PDX)を用いた生体内実験では、臨床設定に非常に近い状態で腫瘍病理を観察できますが、移植部位は皮下移植や腹腔内移植などの異所性部位に限定されることがよくあります。新しい実験システムを確立するために、研究所内の肺腺癌 PDX LC06、LC49、LC58 由来の、LC06C、LC49C、LC58C という3系統の新しい細胞株を開発した。本研究では、これらの細胞株の細胞生物学的特性を調査し、肺腺がんの病態生理学の解明における有用性を評価することを目的とした。

Methods:

細胞培養	<ul style="list-style-type: none"> LC06C、LC49C、LC58C は、それぞれ LC06、LC49、LC58 PDX 由来の Cancer Tissue-Originated Spheroids (CTOS) (Kondo et al., PNAS, 2011)をそれぞれ、Accutase (Nacalai Tesque #12679-54) で 37°C, 30 分間処理した。 細胞はコラーゲンコーティングされたディッシュ (IWAKI #4020-010-MYP) で培養した。 STEMPRO hESC SFM kit (Gibco #A10007-01) を培養培地として使用した。
動物	<ul style="list-style-type: none"> PDX と細胞株の移植に重度免疫不全マウス (NOG : NOD/Shi-scid, IL-2Rγ KO) を使用した。
腫瘍細胞移植	<ul style="list-style-type: none"> 異所性移植: 50%マトリゲル (Corning #356234) 中の 1.0×10^5 個の細胞をマウス右腹側部に皮下移植した。 同所性移植: 気管支鏡 (AVSCo. Ltd.#AE-C1) を用いて気管支から 50%マトリゲル中の 1.0×10^5 個の細胞をマウスの左肺に接種した。一定時間経過後、マウスを屠殺し、肉眼的検査を行い、腫瘍、肺、肝臓、脳を採取し、組織学的分析を行った。
組織病理学	<ul style="list-style-type: none"> ヘマトキシリン・エオシン (H&E) 染色および抗ヒトミトコンドリア抗体 (MERCK # MAB 1273) 染色の標準プロトコルに従い、ホルマリン固定パラフィン包埋 (FFPE) 切片を用いて組織学的分析を行った。

結果:

① 肺腺癌 PDX 由来の細胞株 LC06C、LC49C、LC58C の樹立

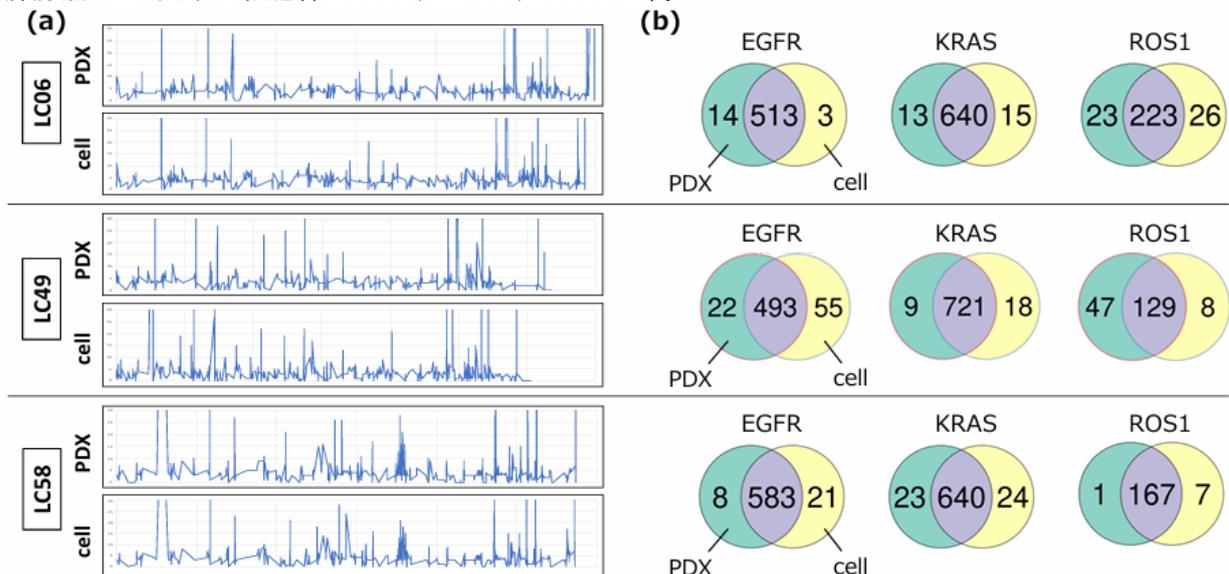


図 1. PDX と細胞株間の (a) 染色体コピー数多型 (CNV) と (b) 各がん遺伝子領域におけるゲノム点変異数比較

② 皮下移植細胞由来腫瘍の組織病理学

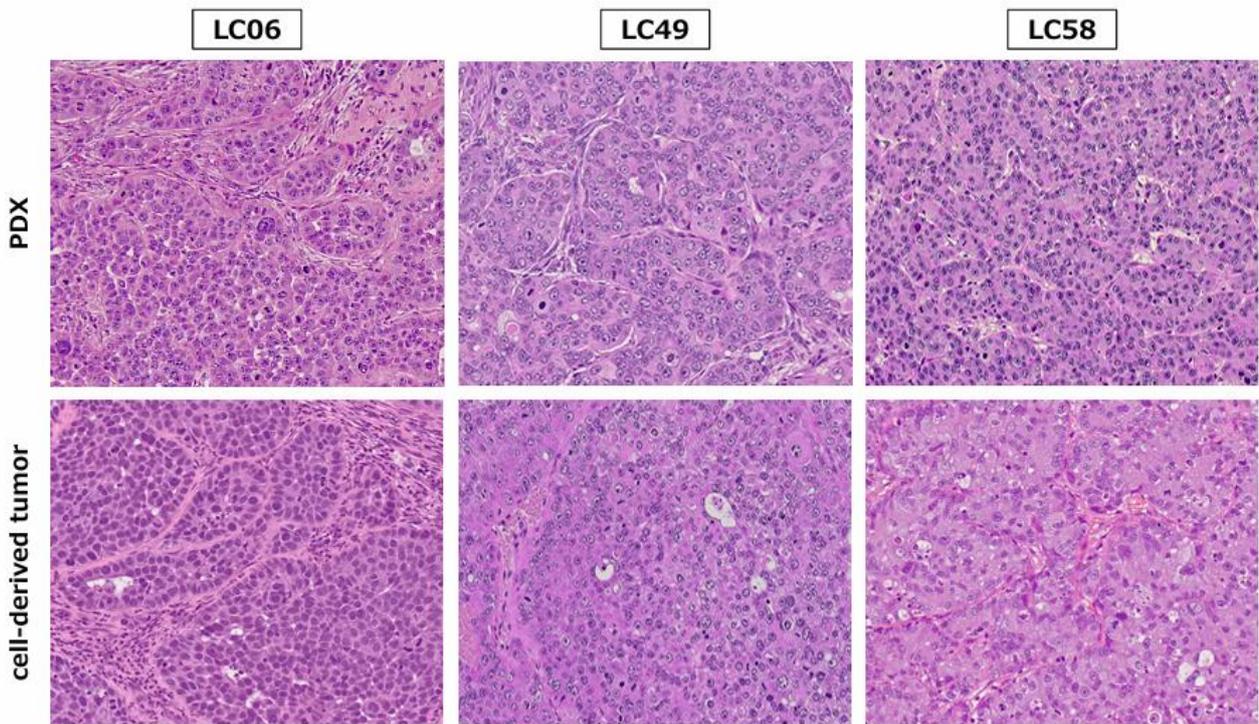


図 2. LC06C、LC49C、LC58C 由来の腫瘍の組織標本。これらの腫瘍は、元の PDX と同様に、低分化腺癌の特徴を示した。

③ LC58 PDX の転移能力は LC58C 細胞株で維持された

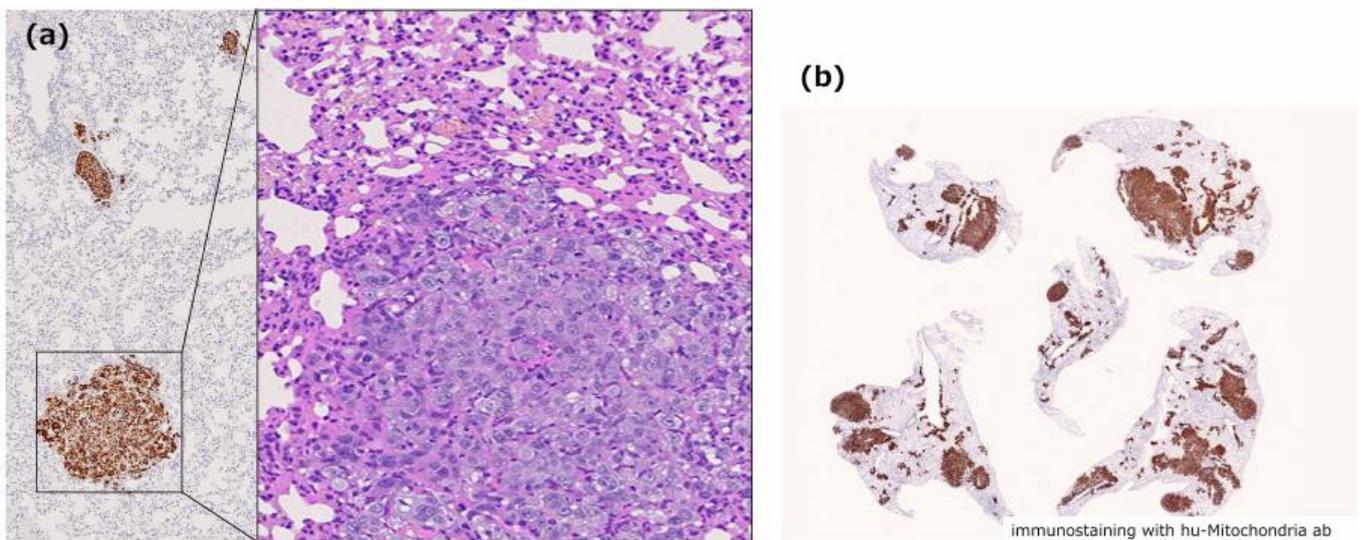
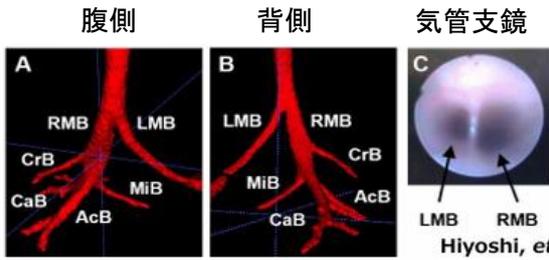


図 3. (a) LC58C を移植したマウス 3 匹のうち 2 匹で肺に複数の転移巣が観察され、移植後 33 日目に皮下腫瘍と同様の組織学的所見を示したのに対し、LC06C または LC49C を移植したマウスの肺には肺転移は検出されなかった(データ未掲載)。(b) LC58 PDX を皮下移植した場合、高頻度(約 90%)の肺転移が観察された(Hata J. et al.、日本病理学会学術集会、2020 年)。

④ 肺腺癌 PDX 由来細胞株を用いた同所性移植モデルの確立

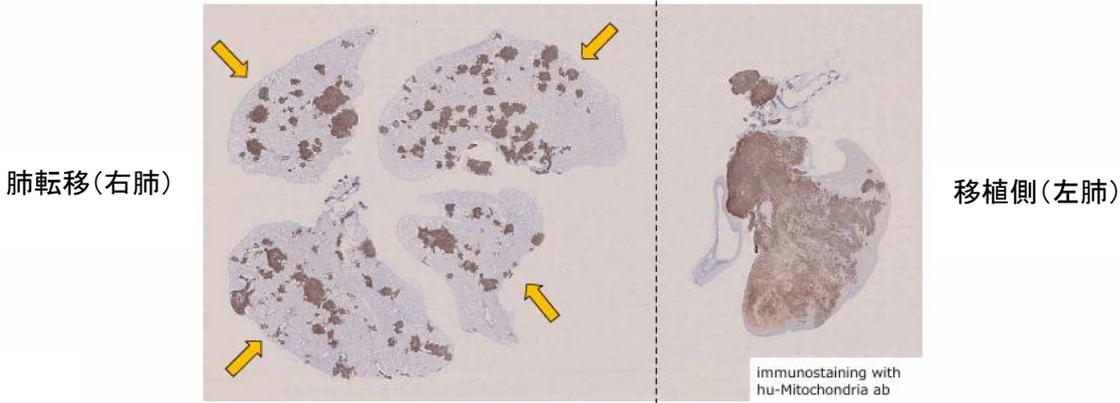
(a) マウス気管イメージ



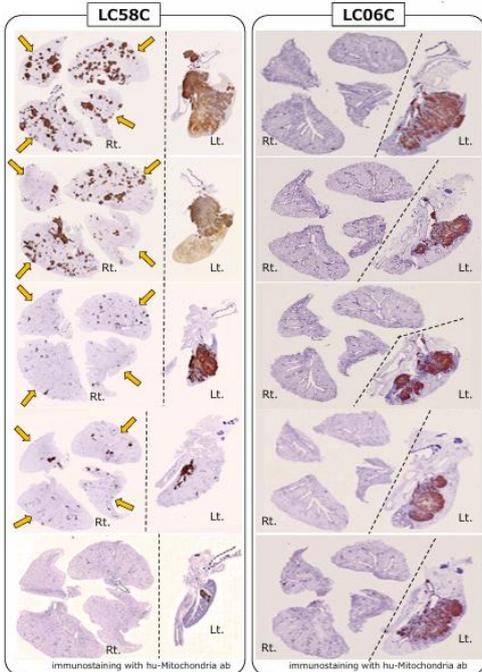
Hiyoshi, et al., J Toxicol Pathol, 2023

LMB: 左主気管支、RMB: 右主気管支

(b) 同所移植 (LC58C)



(c)



(d)

CDX Strain	生着	肺転移	脳転移
LC06C	19/20	1/19	0/19
LC58C	14/15	9/14	1/14

(e)



図 4. (a)マウス気管支のマイクロ X 線 CT 画像と同所移植に使用した気管支スコープ。(b)LC58C の同所移植から 81 日後、腫瘍が左肺の葉全体を占めているのがわかる。矢印は接種部位(左)の反対側(右)の肺にある複数の転移巣を示す。(c)LC06C と LC58C を同所移植したマウスの肺の比較。どちらの細胞株も左肺に広範囲に移植されたが、右肺への複数の転移は LC58C を移植したマウスでのみ観察された。(d)細胞株間の移植率と転移率を示す表。(e) LC58C 由来腫瘍を有するマウスの大脳の垂直断面では、1 匹のマウスに巨大な転移性腫瘍が見られる。

Discussion & Conclusion:

我々は肺腺癌 PDX から 3 つの細胞株、LC06C、LC49C、LC58C を確立した。

1. これらの新しく確立された細胞株は、染色体 CNV や特定のドライバーオンコジーンのゲノム点変異など、元の PDX のゲノム特性をほぼ保持していた。
2. 我々は以前、LC58 株が皮下接種後に高頻度に肺転移を示したことを報告した。これらの結果と一致して、LC58C も同じ条件下で複数の肺転移巣を発達させたが、LC06C と LC49C は発達させなかった。これらの結果は、LC58 PDX の肺転移能力が LC58C で保持されている可能性があることを示唆している。
3. 我々は新しい細胞株を使用して、気管支を介してマウス肺に同所移植システムを確立することに成功した。驚くべきことに、同所移植された LC58C は反対側の肺に複数の転移を示したが、LC06C 移植モデルではそのような顕著な転移は観察されなかった。したがって、同所移植モデルにおける顕著な転移能力は LC58C に特有のものであると思われる。結論として、私たちが確立した細胞株は、肺腺癌の病態生理学を解明するための有用なツールとなる可能性がある。将来的には、LC58C を使用した同所モデルは、転移の進行における臨床的関連性が高いため、治療研究に価値あるものとなる可能性がある。