

令和 4 年 6 月 20 日現在

機関番号：82504

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2019～2021

課題番号：19K09816

研究課題名(和文) 卵巣がんの本態解明および治療戦略構築のためのオルガノイド培養を用いた統合的研究

研究課題名(英文) An integrated study using patient-derived organoids toward elucidation of biological feature and development of therapeutic strategy of ovarian cancer

研究代表者

田中 尚武(Tanaka, Naotake)

千葉県がんセンター(研究所)・婦人科・診療部長

研究者番号：80236611

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,400,000円

研究成果の概要(和文)：マウス由来正常上皮細胞に利用していたオルガノイド培養法をそのまま卵巣がんの臨床検体に応用しても患者由来卵巣がんオルガノイドの樹立成功率が低かった。そのため、様々な条件検討を行い一部改変することで、卵巣がんの臨床検体に対する高効率なオルガノイド培養を確立した。樹立したオルガノイドは基本的に元の腫瘍の形態学的特徴や遺伝子変異を保持しており、オルガノイドを用いた薬剤感受性評価では症例間で抗がん剤や分子標的に対する感受性が異なっていた。本手法は子宮体がんや子宮頸がんなどにも応用可能であった。以上のように、患者由来オルガノイドを用いたアプローチは様々な婦人科がん研究を加速することが期待される。

研究成果の学術的意義や社会的意義

卵巣がんには様々な組織型が存在し、悪性度や高頻度の遺伝子異常が異なる。しかし、そうした多様性とは無関係に標準治療は同一であり、治療効果には改善する余地が残されている。治療効果予測や創薬開発における患者由来腫瘍細胞の重要性は明らかだが、近年高い成功率や腫瘍不均一性の保持などの利点からオルガノイドが注目されている。ただし、婦人科領域のオルガノイド研究は遅れていた。我々はいち早くオルガノイド培養技術を婦人科領域に導入し、高効率の卵巣がん臨床検体に対するオルガノイド培養法を確立した。本研究の成果は治療効果予測、治療抵抗性機序の解明、新規治療法の開発など多方面の卵巣がん研究に貢献することが期待される。

研究成果の概要(英文)：We established highly efficient primary organoid culture method for clinical samples of ovarian cancer by modifying the Matrigel bilayer organoid culture protocol that we previously developed for various types of murine epithelial cells. We confirmed that propagated patient-derived organoids basically retained histopathological features and genetic aberrations of the original tumors and could be applicable to drug sensitivity assay. We found that drug sensitivity could be vary among patient-derived organoids, suggesting inter-patient heterogeneity. Furthermore, this organoid culture method could be applied to establishment of patient-derived organoids of various gynecologic cancer such as endometrial cancer and cervical cancer. In conclusion, these organoid-based approaches would likely accelerate researches on gynecologic cancers in many aspects.

研究分野：婦人科腫瘍学

キーワード：卵巣がん 患者由来がんモデル オルガノイド 三次元培養 薬剤感受性

様式 C-19、F-19-1、Z-19（共通）

1. 研究開始当初の背景

(1) 卵巣がんには様々な組織型が起源細胞は未解明な点が多く残されている

卵巣がんの多くは上皮性（90%以上）で、主に4つの組織型（漿液性、類内膜、明細胞、粘液性）に分類される。近年の網羅的なゲノム解析の結果からそれぞれに特有の遺伝子異常の存在が報告されている。また、起源細胞の点では、上皮性卵巣がんは従来卵巣表層上皮を母体とすると信じられてきたが、現在では高悪性度漿液性癌であれば卵管采、明細胞癌や類内膜癌であれば子宮内膜症を母体とする場合が大多数と想定されている。しかし、卵管采に病変を認めない高異型度漿液性癌や子宮内膜症を伴わない明細胞癌や類内膜癌も存在するため、発がん過程や分子機構については未だ不明な点も多く残されている。

(2) 卵巣がんは難治性で治療法の選択肢は限られる

卵巣がんは最も予後不良な婦人科悪性腫瘍で、現在その標準治療は組織型に関わらず手術と化学療法（パクリタキセルとカルボプラチン）が施行されている。そのため、明細胞癌など一部の組織型は感受性が低いことが問題となっていた（Hess et al, J Clin Oncol, 2004; Pectasides, et al, Gynecol Oncol, 2006）。また、血管内皮増殖因子に対するベバシズマブや遺伝性卵巣癌に対するPARP阻害剤など、一部の症例では分子標的治療薬の有効性が確認される場合があるが、大半の症例には依然として選択肢が限られているのが現状である。したがって、卵巣がんに対する新規治療戦略の構築が喫緊の課題である。

(3) 卵巣がんの安定的な3次元培養法は未確立である

今後、臨床現場においてはクリニカルシーケンスに基づく精密医療が進展することが予想される。しかしながら、同定された変異に対応する阻害剤が必ずしも有効であるとは限らず、患者由来の細胞を用いた感受性評価が可能になれば大きなメリットが期待される。また、有効な薬剤の探索や新規治療標的の同定を行う上でも細胞レベルの評価系の確立は有用性が高い。近年、患者由来の正常およびがん細胞を生理的な状態で半永久的に増殖・維持可能とする3次元培養法が消化器系などの臓器で報告（Sato, et al, Gastroenterology, 2011; Boj, et al. Cell, 2015）され、他臓器への応用も広がっている。しかし、卵巣がんの3次元培養に関する報告は未だ少なく、標準的な手法が十分に確立したとは言えない状況である。

2. 研究の目的

卵巣がんの本態解明、精密医療や新規治療法の開発に資する患者由来がんモデルを確立することを目的とする。具体的には、まず卵巣がんの臨床検体に最適化したオルガノイド培養法を確立する。その後、樹立したオルガノイドを用いて患者由来がんモデルとしての妥当性を多方面から評価する。

3. 研究の方法

(1) 臨床検体からのオルガノイド培養およびその形態学的評価

卵巣がんより採取した組織片を細切し、2 U/ml dispase II・1 mg/ml collagenase P（37℃, 50分）およびAccumax（37℃, 10分）による酵素処理を行った。次に酵素処理後の細胞をPBSで洗浄しピペティング後、無血清培地 Advanced DMEM/F-12（L-glutamine solution, penicillin/streptomycin, amphotericin B suspension, 50 ng/ml human EGF, 250 ng/ml R-spondin1, 100 ng/ml Noggin, 10 μM Y27632, 1 μM Jagged-1）に懸濁した。その後、予めマトリゲルでコートしておいた12 wellプレートに播種し、37℃の培養用インキュベーター内で一晚静置した。翌日マトリゲルに接着している細胞とマトリゲルに接着せずに培地に浮遊している生細胞を確認し、マトリゲルに接着している細胞に対してはマトリゲルを重層し硬化させ、培養用培地を添加しオルガノイド培養を行った。培地中に浮遊している生細胞を多数認める場合は培地を回収しAccumaxによる酵素処理を実施することで再度腫瘍細胞の回収を行った。その後、回収した腫瘍細胞のオルガノイド培養を行った。オルガノイドの継代は、基本的に以前当研究グループが報告したマウス由来正常上皮オルガノイドの継代方法と同様に実施した（Onuma, et al, Proc Natl Acad Sci USA, 2013）。患者由来がん細胞がオルガノイドとして安定的に増殖可能だった場合は、PDOの病理組織学的評価（Hematoxylin and Eosin染色、特殊染色および免疫組織化学染色）を実施し元の腫瘍と比較した。

(2) 次世代シーケンサーを用いた遺伝子異常の検索

樹立した患者由来オルガノイドおよび元の腫瘍のホルマリン固定パラフィン包埋（formalin-fixed paraffin-embedded, 以下FFPE）サンプルからゲノムDNAを抽出し、品質の評価後にIon Proton sequencerを用いてIon AmpliSeq Comprehensive Cancer Panelによる409のがん関連遺伝子に対するターゲットシーケンスを実施した。その際、腫瘍特異的な遺伝子異常を同定するため、正常部のFFPEサンプルからもゲノムDNAを抽出し併せて解析した。

(3) 患者由来腫瘍細胞を用いた薬剤感受性試験

樹立したオルガノイドを回収して酵素処理およびピペッティングで単一細胞に解した後に細胞数をカウントし、PrimeSurface 96U に 5×10^3 cells/well で播き、48 時間後に抗がん剤（パクリタキセル、カルボプラチン、シスプラチン、ドキシソルビシン、SN-38、トポテカン、ゲムシタビン）、分子標的薬（オラパリブ、ニラパリブ）を添加した。その薬剤添加 96 時間後に細胞の生存率を CellTiter-Glo3D Cell Viability Assay による ATP の測定により算出した。

4. 研究成果

(1) 高効率な婦人科腫瘍由来臨床検体に対するオルガノイド培養法の確立

マウス由来正常上皮細胞のオルガノイド培養に利用していた手法をそのまま卵巣がんの臨床検体に応用しても患者由来卵巣がんオルガノイドの樹立成功率は低かった。そこで、様々な条件検討を行い、最終的に酵素処理の操作と 2 段階で腫瘍細胞を回収する操作をそれぞれ追加することで卵巣がんの臨床検体に対する高効率なオルガノイド培養法を独自に確立した。また、本手法の汎用性を確認するため、他の婦人科がんにも応用したところ、子宮体がんおよび子宮頸がんの患者由来オルガノイドの樹立に成功した。その後、症例数を蓄積していく中で卵巣明細胞癌の培養成功率が他の組織型に比べ低い傾向にあることが明らかとなり、更なる培養法の最適化が必要であることが示唆された。また、化学療法後の臨床検体からのオルガノイド樹立は困難であり、今後の課題と考えられた。一方、腫瘍組織だけでなく正常組織からのオルガノイド樹立も試みたところ、卵管上皮、子宮内膜、子宮頸部扁平上皮・円柱上皮接合部からのオルガノイド樹立が可能であった。今後は正常組織由来オルガノイドに婦人科がんを高頻度の遺伝子異常を再現することで、発がん機構に関する洞察が得られることが期待される。

(2) 患者由来卵巣がんオルガノイドは元の腫瘍の特徴を保持

樹立した卵巣がんオルガノイドが元の腫瘍の特徴をどの程度保持しているかを確認するため、病理組織学的解析および次世代シーケンサーを用いたゲノム解析を実施した。オルガノイドは基本的に元の腫瘍の形態学的特徴（組織像、タンパク発現、粘液産生性）や遺伝子異常を保持しており、長期培養後のオルガノイドにおいても明らかな遺伝子変異の蓄積は確認されなかった。また、同定した遺伝子変異のアレル頻度から卵巣がんオルガノイドがほぼ腫瘍細胞で構成されていることが明らかとなった。卵巣がんの同一腫瘍内の肉眼的に異なる 2 部位から樹立したオルガノイドでは、両オルガノイドに共通と片方のオルガノイドのみで同定される遺伝子変異が存在することを確認した。したがって、同一患者から複数のオルガノイドの樹立はがんの不均一性を理解する上で重要なリソースとなることが示唆された。

(3) 患者由来卵巣がんオルガノイドを用いた薬剤感受性評価系およびスクリーニング系構築

樹立した卵巣がんオルガノイドを用いて抗がん剤および分子標的薬に対する *in vitro* における感受性を、ATP を指標とした生細胞数の測定により評価した。その際、マトリゲル存在下での操作が煩雑なため、オルガノイドからスフェロイドを作製して実施した。症例間で抗がん剤や分子標的薬に関する感受性が異なること、同一症例から樹立した複数のオルガノイド間においても薬剤感受性の異なる症例の存在が確認された。また、オルガノイドを用いた網羅的薬剤・化合物スクリーニングを実施する方法を整備し、卵巣がんを含む複数の婦人科がん症例に対して実施した。妥当性を確認する必要があるが高い抗腫瘍効果を示す化合物を複数同定した。

(4) 患者由来オルガノイドと腫瘍浸潤リンパ球との共培養系のに向けた取り組み

オルガノイド培養は効率的に患者由来腫瘍細胞を増殖・維持可能とするが、がんを取り巻く微小環境（線維芽細胞や免疫細胞など）までは再現できない。そこでより優れた患者由来卵巣がんモデルの確立も視野に入れ、オルガノイドの樹立だけでなく培養条件を変更することで腫瘍浸潤リンパ球の培養にも着手し数例で成功した。今後はオルガノイドと腫瘍浸潤リンパ球の共培養系を確立することで卵巣がんのがん免疫に関わる研究への展開も期待される。

以上のように、我々は卵巣がんを含む様々な婦人科腫瘍に対する高効率のオルガノイド培養法を確立し、様々な研究に利用可能なことを確認した (Maru, et al, Gynecol Oncol, 2019; Maru, et al, Cells, 2019; Maru et al, Cancer Sci, 2019)。また、正常組織からのオルガノイド樹立にも成功した (Maru, et al, Cancers, 2020)。一方で、従来のオルガノイド研究は基本的に 1 症例あたり 1 患者由来オルガノイドの樹立となっており、単一の患者由来オルガノイドがどの程度患者の病態や腫瘍の空間的多様性を反映しているかについては不明な点が多い。現在、同一腫瘍内の複数部位から検体を採取し、1 症例あたり複数の患者由来オルガノイドの樹立とそれを用いた多面的解析に取り組んでいる。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計8件（うち査読付論文 8件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 6件）

1. 著者名 Maru Yoshiaki, Tanaka Naotake, Tatsumi Yasutoshi, Nakamura Yuki, Itami Makiko, Hippo Yoshitaka	4. 巻 10
2. 論文標題 Kras activation in endometrial organoids drives cellular transformation and epithelial-mesenchymal transition	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Oncogenesis	6. 最初と最後の頁 46
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1038/s41389-021-00337-8	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -

1. 著者名 Maru Yoshiaki, Tanaka Naotake, Tatsumi Yasutoshi, Nakamura Yuki, Yao Ryoji, Noda Tetsuo, Itami Makiko, Hippo Yoshitaka	4. 巻 255
2. 論文標題 Probing the tumorigenic potential of genetic interactions reconstituted in murine fallopian tube organoids	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 The Journal of Pathology	6. 最初と最後の頁 177 ~ 189
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1002/path.5752	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Maru Yoshiaki, Hippo Yoshitaka	4. 巻 12
2. 論文標題 Two-Way Development of the Genetic Model for Endometrial Tumorigenesis in Mice: Current and Future Perspectives	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Frontiers in Genetics	6. 最初と最後の頁 798628
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.3389/fgene.2021.798628	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -

1. 著者名 Maru Yoshiaki, Hippo Yoshitaka	4. 巻 13
2. 論文標題 Twists and turns in Kras-driven tumor initiation	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Aging	6. 最初と最後の頁 24477 ~ 24479
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.18632/aging.203726	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -

1. 著者名 Maru Yoshiaki, Tanaka Naotake, Itami Makiko, Hippo Yoshitaka	4. 巻 154
2. 論文標題 Efficient use of patient-derived organoids as a preclinical model for gynecologic tumors	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Gynecologic Oncology	6. 最初と最後の頁 189 ~ 198
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.ygyno.2019.05.005	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Maru Yoshiaki, Hippo Yoshitaka	4. 巻 8
2. 論文標題 Current Status of Patient-Derived Ovarian Cancer Models	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Cells	6. 最初と最後の頁 505 ~ 505
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3390/cells8050505	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -

1. 著者名 Maru Yoshiaki, Tanaka Naotake, Ebisawa Keiko, Odaka Akiko, Sugiyama Takahiro, Itami Makiko, Hippo Yoshitaka	4. 巻 110
2. 論文標題 Establishment and characterization of patient derived organoids from a young patient with cervical clear cell carcinoma	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Cancer Science	6. 最初と最後の頁 2992 ~ 3005
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1111/cas.14119	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -

1. 著者名 Maru Yoshiaki, Kawata Akira, Taguchi Ayumi, Ishii Yoshiyuki, Baba Satoshi, Mori Mayuyo, Nagamatsu Takeshi, Oda Katsutoshi, Kukimoto Iwao, Osuga Yutaka, Fujii Tomoyuki, Hippo Yoshitaka	4. 巻 12
2. 論文標題 Establishment and Molecular Phenotyping of Organoids from the Squamocolumnar Junction Region of the Uterine Cervix	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Cancers	6. 最初と最後の頁 694 ~ 694
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3390/cancers12030694	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -

〔学会発表〕 計22件（うち招待講演 11件 / うち国際学会 1件）

1. 発表者名 丸喜明
2. 発表標題 病理検体からの患者由来オルガノイドの樹立とその利用
3. 学会等名 第62回日本臨床細胞学会総会春期大会（招待講演）
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 丸喜明、田中尚武
2. 発表標題 MET遺伝子のコピー数異常を伴う患者由来子宮頸部腺癌オルガノイドの樹立
3. 学会等名 第62回日本臨床細胞学会総会春期大会（招待講演）
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 丸喜明、筆宝義隆
2. 発表標題 子宮癌肉腫の発症機構解明と治療戦略構築に向けたマウスおよび患者由来オルガノイドの活用
3. 学会等名 第17回日本病理学会カンファレンス
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 丸喜明
2. 発表標題 マウスex vivo婦人科がんモデルを用いた発がん促進的な遺伝的相互作用の包括的検証
3. 学会等名 2021年度若手支援技術講習会（招待講演）
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 丸喜明、筆宝義隆
2. 発表標題 Banking of patient-derived gynecologic cancer organoids toward implementation of precision medicine
3. 学会等名 1ST JCA-AACR PRECISION CANCER MEDICINE INTERNATIONAL CONFERENCE (国際学会)
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 丸喜明、筆宝義隆
2. 発表標題 Probing pro-tumorigenic genetic interactions using murine fallopian tube organoids
3. 学会等名 第80回日本癌学会学術総会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 丸喜明
2. 発表標題 婦人科がんの克服を目指したオルガノイドの活用
3. 学会等名 患者由来がんモデル研究会2021 (招待講演)
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 筆宝義隆
2. 発表標題 オルガノイドを用いたex vivo発がんモデルの確立とがん予防への応用
3. 学会等名 第27回日本がん予防学会総会 (招待講演)
4. 発表年 2020年～2021年

1. 発表者名 丸喜明、筆宝義隆
2. 発表標題 オルガノイド発がんモデルが明らかにする子宮内膜の発がんおよび転移促進的な遺伝学的相互作用
3. 学会等名 第79回日本癌学会学術総会
4. 発表年 2020年～2021年

1. 発表者名 筆宝義隆、丸喜明、田中尚武
2. 発表標題 患者由来オルガノイドの婦人科正常組織および腫瘍性病変の研究への利用
3. 学会等名 第79回日本癌学会学術総会
4. 発表年 2020年～2021年

1. 発表者名 丸喜明、筆宝義隆
2. 発表標題 婦人科がん研究における患者由来オルガノイドの活用
3. 学会等名 第24回日本がん分子標的治療学会
4. 発表年 2020年～2021年

1. 発表者名 筆宝義隆
2. 発表標題 婦人科領域における患者由来オルガノイド研究の新展開
3. 学会等名 第4回患者由来がんモデル講演会（招待講演）
4. 発表年 2020年～2021年

1. 発表者名 筆宝義隆
2. 発表標題 3次元オルガノイド培養を用いたがんの本態解明と個別化医療・創薬への応用
3. 学会等名 (株)情報機構 細胞培養セミナー(招待講演)
4. 発表年 2020年～2021年

1. 発表者名 筆宝義隆
2. 発表標題 マウスおよび患者由来のがんオルガノイドモデル確立と創薬への応用
3. 学会等名 日本学術会議シンポジウム「創薬を加速させる革新的な細胞・臓器・個体モデル」(招待講演)
4. 発表年 2020年～2021年

1. 発表者名 筆宝義隆
2. 発表標題 オルガノイド培養技術の婦人科がん領域への応用
3. 学会等名 第21回日本再生医療学会総会(招待講演)
4. 発表年 2020年～2021年

1. 発表者名 丸喜明、田中尚武、伊丹真紀子、筆宝義隆
2. 発表標題 オルガノイド培養を用いた婦人科腫瘍の統合的研究
3. 学会等名 第108回日本病理学会総会
4. 発表年 2019年～2020年

1. 発表者名 丸喜明、田中尚武、小高亜紀子、伊丹真紀子、筆宝義隆
2. 発表標題 細胞診検体からのオルガノイド培養
3. 学会等名 第60回日本臨床細胞学会総会（招待講演）
4. 発表年 2019年～2020年

1. 発表者名 丸喜明、田中尚武、伊丹真紀子、筆宝義隆
2. 発表標題 患者由来卵巣がんからのオルガノイド培養
3. 学会等名 第61回日本婦人科腫瘍学会学術講演会
4. 発表年 2019年～2020年

1. 発表者名 丸喜明、筆宝義隆
2. 発表標題 オルガノイドを用いた婦人科がんの統合的研究
3. 学会等名 第78回日本癌学会学術総会
4. 発表年 2019年～2020年

1. 発表者名 丸喜明、田中尚武、伊丹真紀子、筆宝義隆
2. 発表標題 患者由来婦人科がん検体からのオルガノイド培養
3. 学会等名 第37回日本ヒト細胞学会学術集会
4. 発表年 2019年～2020年

1. 発表者名 丸喜明、筆宝義隆
2. 発表標題 マウスおよび患者由来オルガノイドを用いた婦人科がんの統合的研究
3. 学会等名 第7回細胞凝集研究会（招待講演）
4. 発表年 2019年～2020年

1. 発表者名 丸喜明、筆宝義隆
2. 発表標題 オルガノイドを用いた婦人科がんの統合的研究
3. 学会等名 第1回日本癌学会若手の会
4. 発表年 2019年～2020年

〔図書〕 計1件

1. 著者名 佐々木博己編集（丸喜明、筆宝義隆分担執筆）	4. 発行年 2019年
2. 出版社 羊土社	5. 総ページ数 294
3. 書名 患者由来がんモデルを用いたがん研究実践ガイド	

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
研究 分担 者	丸 喜明 (Maru Yoshiaki) (30742754)	千葉県がんセンター（研究所）・発がん研究グループ 発がん制御研究部・研究員 (82504)	

6. 研究組織（つづき）

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
研究 分 担 者	筆宝 義隆 (Hippo Yoshitaka) (30359632)	千葉県がんセンター（研究所）・発がん制御研究部・部長 (82504)	

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関