

令和 5 年 6 月 4 日現在

機関番号：32612

研究種目：若手研究

研究期間：2020～2022

課題番号：20K18174

研究課題名（和文）卵巣癌の微小残存病変に対する解析研究

研究課題名（英文）Analysis of minimal residual disease in ovarian cancer

研究代表者

増田 健太（Masuda, Kenta）

慶應義塾大学・医学部（信濃町）・助教

研究者番号：30773460

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,100,000円

研究成果の概要（和文）：卵巣癌の再発を抑制する治療法を開発するためには、化学療法後の微小残存病変が化学療法抵抗性を有するメカニズムを解明する必要がある。本研究課題により、オルガノイド培養法を応用した新たな卵巣癌モデルマウスの開発、微小残存病変モデルの作成、ヒト卵巣癌サンプルを用いた空間的遺伝子発現解析を実行し、卵巣癌微小残存病変の特徴的な遺伝子発現パターンの同定に成功した。これらの結果を統合することにより、新たな治療方法の提案につながる成果が得られた。今後、開発したモデル動物を用いて、同定した治療標的に対する新たな治療戦略の開発やPOC取得に向けた研究開発を進める。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究課題で開発した卵巣癌モデルマウスは、BRCA1/2遺伝子野生型の特徴を持ち、卵巣癌の中でも予後不良群を模倣している。BRCA1/2遺伝子野生型の特徴を有する卵巣癌は、既存の細胞障害性薬剤や分子標的薬への感受性が低く、アンメットメディカルニーズが高い。そのため今後非臨床試験を計画する上でも有用な動物モデルとなり得る。またオルガノイド培養法を応用して作成した微小残存病変モデルは、*in vitro*スクリーニングによる治療候補薬剤の同定が期待できる。またヒト卵巣癌検体に対して、空間的遺伝子発現解析の有用性を示したことにより、今後普遍的な卵巣癌MRDシグネチャの同定が期待できる。

研究成果の概要（英文）：In order to develop therapies that inhibit recurrence of ovarian cancer, it is necessary to elucidate the mechanism by which minimal residual disease after chemotherapy is resistant to treatment. With this research project, we developed a new ovarian cancer mouse model based on the organoid culture method, created an *in vitro* model of minimal residual disease, performed the spatial gene expression analysis using human ovarian cancer samples, and succeeded in identifying characteristic gene expression patterns in ovarian cancer minimal residual disease. By integrating these data, we obtained results that lead to the proposal of a new treatment strategy. Using the developed model animals, we will proceed with research and development toward the POC acquisition and the development of new therapeutic strategies.

研究分野：癌研究

キーワード：卵巣癌 治療抵抗性 動物モデル

## 様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

### 1. 研究開始当初の背景

現在、進行卵巣癌に対しては、手術に加えて術後化学療法として細胞障害性薬剤であるパクリタキセルとカルボプラチンを併用する TC 療法、その後 PARP 阻害薬もしくは血管新生阻害薬による維持療法が行われている。しかしながら卵巣癌の中でも、BRCA1/2 遺伝子野生型を含む homologous recombination proficient の特徴を有する卵巣癌は、プラチナ製剤や PARP 阻害薬に対する感受性が低く、集学的治療により一旦は寛解に至った場合でも、高率に再発し致死的となる。つまり化学療法後に、微小残存病変 (minimal residual disease; MRD) が体内に生存し続けることで、再発に至ると考えられる。そのため難治性卵巣癌の予後を改善するためには、TC 療法後に残存している卵巣癌 MRD を標的とした新たな治療戦略を開発する必要がある。

### 2. 研究の目的

本研究では、卵巣癌 MRD が化学療法抵抗性を有するメカニズムを解明し、卵巣癌 MRD に対する新規標的分子探索を進めるため、(1) 卵巣癌に対する新たな治療戦略の開発や POC 取得に有用なモデル動物の開発、(2) 卵巣癌微小残存病変を模倣した in vitro モデルの開発、(3) 化学療法前後の臨床検体の収集およびそれらを用いた網羅的遺伝子発現解析を実施し、新たな治療戦略を立案するための基礎データを得ることを目的とした。

### 3. 研究の方法

#### (1) 卵巣癌に対する新たな治療戦略の開発や POC 取得に有用なモデル動物の開発

癌に対する新たな治療戦略の開発や POC 取得には、モデルマウスを用いた生体内での検証が望ましいとされている。卵巣癌の研究分野においては ID8 細胞が用いられることが多いが、TP53 遺伝子が野生型である点など、ヒト卵巣癌の特徴と一致しない点も指摘されていた。そこで、本研究において新たな Syngeneic モデルマウスの開発を試みた。方法は、まずマウス卵管上皮より、オルガノイド培養法を用いてマウス卵管オルガノイドを樹立する。続いて、TP53 遺伝子のノックアウト等の遺伝子改変を行うことにより、新たな卵巣癌 Syngeneic モデルの作成を行った。

#### (2) 卵巣癌微小残存病変 (MRD) を模倣した in vitro モデルの開発

卵巣癌オルガノイドを用いて、実際の臨床で用いられている細胞障害性薬剤を長期間投与することにより in vitro で卵巣癌 MRD を模倣するオルガノイドモデルの作成を試みた。作成した卵巣癌 MRD オルガノイドを用いて、薬剤投与前の卵巣癌オルガノイドとの遺伝子発現を比較し、卵巣癌 MRD オルガノイドで発現が上昇する遺伝子の同定を行った。

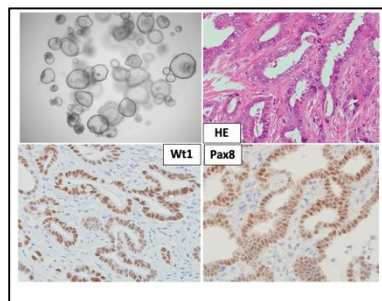
#### (3) 化学療法前後の臨床検体の収集およびそれらを用いた網羅的遺伝子発現解析

まずは研究同意を得た進行卵巣癌の化学療法前後のペア凍結検体、FFPE 検体を収集する。続いて、収集した検体を用いて卵巣癌 MRD における遺伝子発現解析を行う。これまでの経験から、微小な病変である MRD の RNA-seq データは非癌細胞の混入で大きく影響を受けることが明らかとなった。そこで 1 スポット (1-10 細胞) ごとの分離が可能である空間的遺伝子発現解析 (10x genomics 社 Visium) を行った。

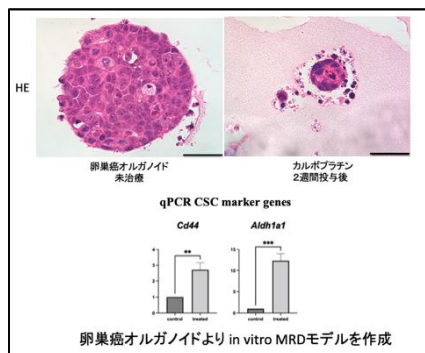
### 4. 研究成果

#### (1) 新たな卵巣癌モデル動物の開発に成功した

まずマウス卵管上皮より、オルガノイド培養法を用いてマウス卵管オルガノイドを樹立することに成功した。マウスの正常卵管組織と比較したところ、作成した卵管オルガノイドは正常卵管と同様に繊毛細胞と分泌細胞で構成され、正常卵管と一致していた。続いて、卵巣癌モデルの作成を試みた。卵巣高異型度漿液性癌 (HGSC: high-grade serous carcinoma) は最も高頻度に TP53 変異を認めることより、CRISPR Cas9 システムを用いて Trp53 KO (knock out) 卵管オルガノイドを作成し、正常卵管オルガノイドとの比較を行った。p53 の機能喪失により、細胞増殖の亢進と繊毛細胞への分化の抑制が見られたが、形質転換は認めなかった。次に、マウス卵管オルガノイドに対して Trp53 KO を含む複数の遺伝子異常を導入したところ、正常卵管オルガノイドと比較して細胞増殖が亢進した。さらに同オルガノイドを免疫不全マウスの皮下へ投与したところ腫瘍を形成した。腫瘍は、病理学的にヒト HGSC と類似し、免疫組織化学において HGSC のマーカーである Pax8 と Wt1 を発現した。(右図)



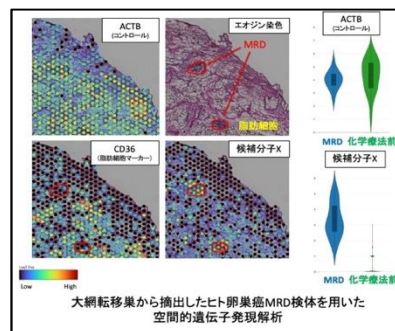
#### (2) 卵巣癌微小残存病変 (MRD) を模倣した in vitro モデルの開発に成功した



樹立した卵巣癌オルガノイドモデルに対して、実際の臨床で用いられている細胞障害性薬剤であるカルボプラチンを長期間投与した。条件検討の後、2週間の長期投与により卵巣癌 MRD を模倣するオルガノイドモデルの作成に成功した。MRD オルガノイドは、*Cd44*、*Aldh1a1* 等の癌幹細胞マーカー遺伝子の発現上昇や細胞増殖の抑制が起こることが qPCR により明らかになった。また免疫組織化学、FACS の結果から CD44 のアイソタイプの1つであり、シスチントランスポーター-xCT を安定化させて酸化ストレスへの耐性を増強する CD44v の発現が治療後に上昇することが in vitro、in vivo の両方で確認された。

### (3) 化学療法前後の臨床検体を用いた空間的遺伝子発現解析により卵巣癌 MRD に特徴的な遺伝子発現変化を同定した

化学療法前後のペア検体 4 検体を用いて、1 スポット(1-10 細胞)ごとの分離が可能である空間的遺伝子発現解析を行った(右図)。その結果、MRD の領域(赤枠で囲まれた領域)において、これまでに同定した幹細胞マーカーや脂質代謝関連遺伝子に加えて、新たな遺伝子群の高発現(MRD シグネチャ)を同定した。空間的遺伝子発現解析を行うことにより、これまでの bulk RNA-seq では同定されなかった遺伝子群が同定され、MRD に対する RNA 解析に適した手法であると思われる。今後さらに検体数を増やして空間的遺伝子発現解析を実行し、卵巣癌 MRD シグネチャの検証をおこなう。



本研究課題により、新たな卵巣癌モデル、卵巣癌 MRD モデルの開発、ヒト MRD サンプルに対する空間的遺伝子発現解析を用いた卵巣癌 MRD シグネチャの同定を行った。本研究は、独自の卵巣癌モデルとヒトサンプルを用いた解析を統合することにより、新たな治療標的の提案につながる成果が得られた。今後、開発したモデル動物を用いて、同定した治療標的に対する新たな治療戦略の開発や POC 取得に向けた研究を継続し、難治性卵巣癌に対する新規治療戦略の開発を進める。

## 5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計6件（うち査読付論文 6件/うち国際共著 2件/うちオープンアクセス 6件）

1. 著者名 Tsuchihashi K, Hirata Y, Yamasaki J, Suina K, Tanoue K, Yae T, Masuda K, Baba E, Akashi K, Kitagawa Y, Saya H, Nagano O	4. 巻 30
2. 論文標題 Presence of spontaneous epithelial-mesenchymal plasticity in esophageal cancer	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Biochemistry and Biophysics Reports	6. 最初と最後の頁 101246 ~ 101246
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.bbrep.2022.101246	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 Lu Z, Mao W, Yang H, Santiago-O' Farrill JM., Rask PJ., Mondal J, Chen H, Ivan C, Liu X, Liu CG, Xi Y, Masuda K, Carrami EM., Chen M, Tang Y, Pang L, Lakomy DS, Calin GA, Liang H, Ahmed AA, Vankayalapati H, Bast RC	4. 巻 132
2. 論文標題 SIK2 inhibition enhances PARP inhibitor activity synergistically in ovarian and triple-negative breast cancers	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Journal of Clinical Investigation	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1172/JCI146471	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 該当する
1. 著者名 Akahane T, Masuda K, Hirasawa A, Kobayashi Y, Ueki A, Kawaida M, Misu K, Nakamura K, Nagai S, Chiyoda T, Yamagami W, Hayashi S, Kataoka F, Banno K, Sugano K, Okita H, Kosaki K, Nishihara H, Aoki D	4. 巻 33
2. 論文標題 TP53 variants in p53 signatures and the clonality of STICs in RRSO samples	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Journal of Gynecologic Oncology	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3802/jgo.2022.33.e50	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 Kobayashi Y, Masuda K, Hiraswa A, Takehara K, Tsuda H, Watanabe Y, Oda K, Nagase S, Mandai M, Okamoto A, Yaegashi N, Mikami M, Enomoto T, Aoki D, Katabuchi H, Working Group on Clinical Practice for Cancer Genomic Medicine and HBOC, Japan Society of Gynecologic Oncology	4. 巻 33
2. 論文標題 Current status of hereditary breast and ovarian cancer practice among gynecologic oncologists in Japan: a nationwide survey by the Japan Society of Gynecologic Oncology (JSGO)	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Journal of Gynecologic Oncology	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3802/jgo.2022.33.e61	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 Artibani M, Masuda K, Hu Z, Rauher P, Mallett G, Wietek N, Morotti M, Chong K, KarimiNejadRanjbar M, Zois C, Dhar S, El-Sahhar S, Campo L, Blagden SP, Damato S, Pathiraja PN, Nicum S, Gleeson F, Laios A, Alsaadi A, Santana GL, Motohara T, Albukhari A, Lu Z, Bast Jr. RC, Harris AL, Ejsing CS, Klemm RW, Yau C, Sauka-Spengler T, Ahmed AA	4. 巻 6
2. 論文標題 Adipocyte-like signature in ovarian cancer minimal residual disease identifies metabolic vulnerabilities of tumor initiating cells	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 JCI Insight	6. 最初と最後の頁 e147929
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1172/jci.insight.147929	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 該当する

1. 著者名 Yamasaki Juntaro, Hirata Yuki, Otsuki Yuji, Suina Kentaro, Saito Yoshiyuki, Masuda Kenta, Okazaki Shogo, Ishimoto Takatsugu, Saya Hideyuki, Nagano Osamu	4. 巻 113
2. 論文標題 MEK inhibition suppresses metastatic progression of KRAS mutated gastric cancer	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Cancer Science	6. 最初と最後の頁 916-925
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1111/cas.15244	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10件 (うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件)

1. 発表者名 Shimpei Nagai, Kenta Masuda, Tomohiro Tamura, Tomoko Akahane, Tatsuyuki Chiyoda, Yusuke Kobayashi, Kouji Banno, Mamoru Tanaka, Daisuke Aoki
2. 発表標題 p53 dysfunction hampers the differentiation and causes the precancerous potency in mouse fallopian tube organoids
3. 学会等名 第74回 日本産科婦人科学会学術講演会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 Kenta Masuda, Ahmed Ashour Ahmed, Tomohiro Tamura, Shimpei Nagai, Yuya Nogami, Kosuke Tsuji, Yusuke Kobayashi, Kouji Banno, Mamoru Tanaka, Daisuke Aoki
2. 発表標題 RNA sequencing analysis of ovarian cancer minimal residual disease revealed a metabolic signature that would lead to the development of a new therapeutic strategy
3. 学会等名 第74回 日本産科婦人科学会学術講演会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 Shimpei Nagai, Kenta Masuda, Tomohiro Tamura, Keiyo Imaeda, Eiji Sugihara, Juntaro Yamasaki, Yuji Otsuki, Hiroyuki Nobusue, Tatsuyuki Chiyoda, Yusuke Kobayashi, Kouji Banno, Daisuke Aoki, Hideyuki Saya, Osamu Nagano
2. 発表標題 Development of a new ovarian cancer mouse model by engineering mouse fallopian tube epithelial organoids
3. 学会等名 第81回 日本癌学会学術総会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 Juntaro Yamasaki, Yuji Otsuki, Kenta Masuda, Hideyuki Saya, Osamu Nagano
2. 発表標題 MEK inhibition suppresses metastatic progression of KRAS-mutated gastric cancer
3. 学会等名 第81回 日本癌学会学術総会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 増田健太, 永井晋平, 田村友宏, 今枝慶蓉, 千代田達幸, 小林佑介, 阪埜浩司, 佐谷秀行, 永野修, 青木大輔
2. 発表標題 予後不良卵巣癌の克服を目指した卵巣癌モデルマウスの開発
3. 学会等名 第21回 日本婦人科がん分子標的研究会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 増田 健太、Ahmed Ahmed、永井 晋平、小林 佑介、富永 英一郎、阪埜 浩司、田中 守、青木 大輔
2. 発表標題 卵巣漿液性癌細胞株において脂肪酸酸化阻害はオラパリブに対する感受性を増加させる
3. 学会等名 第73回日本産科婦人科学会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 赤羽 智子、増田 健太、平沢 晃、小林 佑介、永井 晋平、千代田 達幸、林 茂徳、片岡 史夫、富永 英一郎、阪埜 浩司、田中 守、青木 大輔
2. 発表標題 RRSO検体におけるp53 signatureとSTICの特性に関する検討
3. 学会等名 第73回日本産科婦人科学会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 Nagai S, Masuda K, Tamura T, Otsuki Y, Suina K, Nobusue H, Akahane T, Chiyoda T, Kobayashi Y, Banno K, Aoki D, Saya H, Nagano O
2. 発表標題 p53 dysfunction hampers the differentiation of mouse 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 Masuda K, Artibani M, Nagai S, Kobayashi Y, Banno K, Saya H, Aoki D, Ahmed AA
2. 発表標題 Investigating minimal residual disease and chemotherapy resistance in ovarian cancer
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 Tamura T, Masuda K, Nagai S, Otsuki Y, Suina K, Nobusue H, Sampetrean O, Banno K, Aoki D, Saya H, Nagano O
2. 発表標題 Analysis using a mouse ovarian cancer organoid model reveals cancer heterogeneity and cancer stem-like cell properties
3. 学会等名 第80回日本癌学会学術総会
4. 発表年 2021年

〔図書〕 計1件

1. 著者名 Masuda K, Satake M, Aoki D	4. 発行年 2021年
2. 出版社 Springer	5. 総ページ数 332
3. 書名 Hereditary Ovarian Cancer / Hereditary Breast and Ovarian Cancer: Molecular Mechanism and Clinical Practice	

〔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

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			
英国	オックスフォード大学			
英国	オックスフォード大学			
英国	オックスフォード大学			