

令和 4 年 5 月 17 日現在

機関番号：14401

研究種目：研究活動スタート支援

研究期間：2020～2021

課題番号：20K23003

研究課題名(和文) 卵巣がん同所移植PDXモデルを用いた腹膜播種進展機構の解明と新規標的治療の開発

研究課題名(英文) Exploring the mechanism of peritoneal dissemination and development of a new molecular targeted therapy by using orthotopic ovarian cancer patient-derived xenograft mouse models

研究代表者

宮本 真由子 (Miyamoto, Mayuko)

大阪大学・医学系研究科・招へい教員

研究者番号：70880988

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,200,000円

研究成果の概要(和文)：卵巣がんは腹膜播種という特徴的な進展形式をとることが多いが、完全に制御することは難しく予後不良である。本研究では腹膜播種の機序解明・新規治療法の確立を目指し、ヒト卵巣がんの腹膜播種進展を忠実に再現する患者由来腫瘍異種移植(Patient-derived xenograft; PDX)卵巣同所移植マウスモデルWO-77を作成した。WO-77のがんの遺伝子解析により、CCNE1遺伝子増幅を有することを同定した。WO-77マウスモデルにWEE1阻害剤とATR阻害剤の併用療法を投与すると有意な抗腫瘍効果、腹水産生抑制と生存率の延長を認め、この治療法が腹膜播種制御の新規治療となりうることを同定した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

卵巣がんの特徴的である腹膜播種の機序解明・新規治療法の確立を目指して、ヒト卵巣がんの腹膜播種進展を忠実に再現する患者由来腫瘍異種移植卵巣同所移植マウスモデルを確立した。このマウスモデルとがんの遺伝子解析を組み合わせることで、卵巣がん腹膜播種を制御しうる新規治療法を同定した。本研究結果を臨床応用するために、米国にてヒトでの臨床試験を準備している。また、この腹膜播種マウスモデルを用いて今後もさらなる腹膜播種進展機構の解明と新規標的治療の開発研究を行っていく。

研究成果の概要(英文)：Advanced ovarian cancer often shows peritoneal carcinomatosis that is difficult to control and related to poor prognosis. To find the mechanism of peritoneal carcinomatosis and develop a novel treatment, we established a patient-derived xenograft (PDX) ovarian cancer mouse model, WO-77. This PDX mouse model faithfully recapitulates human advanced-stage ovarian cancer peritoneal carcinomatosis. From sequencing analysis with WO-77 cancer tissue, we found that WO-77 harbored CCNE1 gene amplification. We treated the WO-77 PDX mice with WEE1 inhibitor and ATR inhibitor, resulting in a significant anti-tumor effect, decreased ascites volume, and prolonged survival. In conclusion, this study demonstrates the dual blockade of WEE1 and ATR could be a novel therapeutic option for advanced ovarian cancer.

研究分野：婦人科癌、卵巣癌、分子標的治療、ゲノム医療、個別化医療

キーワード：卵巣癌 腹膜播種 PDX ゲノム医療 個別化医療 CCNE1 WEE1 ATR

科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属します。

1. 研究開始当初の背景

卵巣がんは早期がんでは自覚症状も乏しく、未だに有効な早期発見方法は確立されておらず、約半数が腹膜播種・遠隔転移を伴う進行がんで診断される。卵巣がんは婦人科悪性腫瘍の中で最も予後が不良であり、進行がんは標準的治療である最大限の腫瘍減量手術 (Debulking surgery) とタキサン系・プラチナ系を組み合わせた抗がん剤治療をもってしてもほとんどが 5 年以内に再発し致命的な経過を辿る。

卵巣がんや胃がんなどの消化器がんにおける最も頻度の高い転移・再発形式は腹膜播種であり、この病態の進行に伴って癌性腹膜炎、大量腹水貯留、腸閉塞、水腎症を併発し、患者の全身状態は急速に悪化する。我々のグループでは以前より卵巣がんの腹膜播種という特徴的な進展様式に着目し、がん細胞の細胞外マトリックスへの接着や間質への浸潤に焦点を当て、多くの標的分子・重要な予後因子を報告してきた (Sawada K. Cancer Res. 2007、Sawada K. Cancer Res. 2008、Ohyagi-Hara C. Am J Pathol. 2013、Kinose Y. Oncotarget. 2015、Nakamura K. Mol Cancer Res. 2017、Nakatsuka E. Oncotarget. 2017、Yoshimura A. BMC Cancer. 2018)。

卵巣がん腹膜播種の動物実験モデルは、従来から細胞株を用いた Cell line-derived xenograft (CDX) が用いられてきた。しかし、卵巣がん細胞株を用いた動物実験モデルでは、免疫不全マウスへ投与し腹膜播種病変を形成する細胞株は限られており、さらには近年の次世代シーケンサーを用いた遺伝子解析ではそれら細胞株が実は高異型度漿液性卵巣癌 (High-grade serous ovarian cancer; HGSOC) の特徴的な遺伝子変異を持っていないという衝撃的な事実が明らかになった (Domche S. Nat Commun. 2013、Elias KM. Gynecol Oncol. 2015) (図 1)。そして、この卵巣がん細胞株のマウスモデルを用いた有望な基礎研究成果に基づいて行われたヒト臨床試験では、わず

か 5% 程度しかその有効性は認められず、ほとんど臨床に応用されていないという大きな問題点があった。つまりは、ヒト卵巣がんを忠実に模倣する細胞株ならびに実験動物モデルの欠如が Translational Research において大きな障害となっていた。

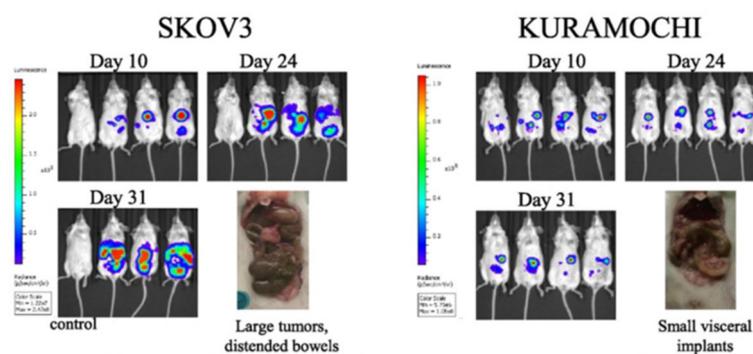


図 1 卵巣がん腹膜播種モデルとして多用されてきた SKOV3 は HGSOC として非典型的な Genome 異常を示し、一方で HGSOC として相応しい Genome 異常を持つ KURAMOCHI では腹膜播種進展がわずかしか生じない (Gynecol Oncol. 2015;139:97-103. を改変)

その後 2010 年代よりヒト由来の腫瘍を免疫不全マウス等に異種移植する患者由来腫瘍異種移植 (Patient-derived xenograft; PDX) モデルが注目されるようになった。PDX 腫瘍は患者由来の Heterogeneous な腫瘍の特性 (病理学的組織像、Genomic profile、Transcriptome、Proteome 等) をそのまま保ちながらマウス等の体内で成長し、その腫瘍を増大・増幅させることが可能となる。また、抗癌剤感受性などの性質も動物モデルにて忠実に再現されるため、PDX モデルはヒトでの治療効果と強く相関を示す Preclinical study model として今や臨床応用に際しての重要な実験系となっている (Koga Y. Cells. 2019)。そこで我々はヒト卵巣がんの腫瘍進展を忠実に再現する卵巣がん同所移植 PDX マウスモデルを新たに確立した。我々の PDX モデルでは手術や生検にて採取された腫瘍を、細切したのちに免疫不全マウスの卵巣に同所移植する。1-6 カ月の期間において、卵巣に移植された腫瘍は徐々に増大してゆき、その後多数の腹膜播種転移病変を形成

し、ヒト進行卵巣がんのように大量腹水を産生し、まさに卵巣がんの進展様式を忠実に再現する。

本研究では、このヒト卵巣がん進展を忠実に再現する PDX モデルを用いて、腹膜播種を促進し抗癌剤抵抗性をもたらしている真に重要な因子を探索し、進行卵巣がん腹膜播種を制御する新規分子標的治療を開発したいと考えた。

2. 研究の目的

本研究の目的は、ヒト卵巣がん PDX マウスモデルを用いて、ヒト卵巣がんが保持している遺伝子異常の特徴を解析し、播種進展を制御する分子標的治療を探索することである。ヒト卵巣がんの進行を忠実に再現する卵巣がん同所移植 PDX マウスモデルを用いた腹膜播種進展・抗癌剤抵抗性メカニズムの解明研究は未だ報告は少なく、本研究がうまくいけば新規の治療法が臨床応用に繋がる可能性は高いと考える。また、腹膜播種は卵巣癌のみにとどまらず、胃癌・大腸癌・膵癌などの消化器癌においても起こる進展様式であり極めて難治性である。本研究の PDX マウスモデルを用いた腹膜播種治療の開発研究は他の癌種にも応用することが出来るため、がん治療における画期的な成果となる可能性を有している。

3. 研究の方法

以下の4. 研究成果に記載した通りに下記の研究を行った。

(1) 卵巣がん腹膜播種 PDX モデルマウスの確立

(2) PDX モデルマウスを樹立した卵巣がんの網羅的遺伝子解析

(3) 遺伝子解析結果を基にした新規分子標的治療 ATR 阻害剤 (ATRi) + WEE1 阻害剤 (WEE1i) の PDX モデルでの検討

4. 研究成果

(1) 卵巣がん腹膜播種 PDX モデルマウスの確立

高頻度に腹膜播種進展をきたす高異型度漿液性卵巣癌 (High-grade serous ovarian cancer; HGSOC) のヒト腫瘍を手術・生検時に採取し、清潔操作下にて細切し、一部は凍結保存とホルマリン固定し組織学的評価用検体とした。1 mm³ 大に細切された腫瘍片 3 個ずつを、全身麻酔下で開腹された免疫不全マウス (NSG マウス) の卵巣に同所移植した。数か月かけて増大していく PDX 腫瘍を触診または経腹超音波にて経時的に観察し、腫瘍が 1500 mm³ に達した際あるいは腹膜播種などでマウスの全身状態が不良となった際は人道的な観点よりマウスを安楽死させたのち、開腹し腹膜播種進展を確認した。本研究では WO-77 PDX マウスモデル (プラチナ系抗がん剤抵抗性再発 HGSOC より採取した腫瘍) と WO-24 PDX マウスモデル (術前化学療法カルボプラチン + パクリタキセル投与後の HGSOC 腫瘍減量手術より採取した腫瘍、本症例は術後化学療法中にプラチナ系抗がん剤抵抗性となり再発をきたした) を確立した (図 2)。WO-77、WO-24 PDX マウスモデルは、腫瘍を採取した卵巣癌患者同様に腫瘍増大とともに大量腹水を産生し、まさに卵巣癌 HGSOC の進展様式を忠実に再現した。

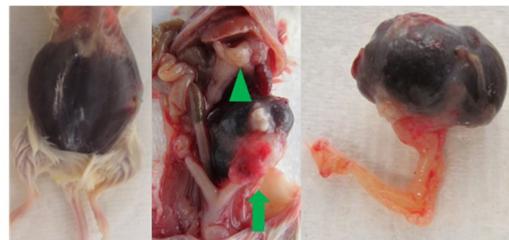


図2 卵巣がん HGSOC PDX モデル；大量血性腹水を産生した PDX マウス (左)、左卵巣腫瘍 (↑) と大網への腹膜播種腫瘍 (▲) (中央)、左卵巣 PDX 腫瘍 (右)

(2) PDX モデルマウスを樹立した卵巣がんの網羅的遺伝子解析

(1) で樹立した WO-77 と WO-24 のヒト腫瘍、PDX 腫瘍よりそれぞれゲノム DNA ならびに Total RNA を抽出し、次世代シーケンサーを用いた DNA/RNA Panel Sequencing にて網

羅的に遺伝子変異とコピー数異常を解析した。その結果、WO-77 と WO-24 はともにほとんどの HGSOC が有している TP53 変異が存在していた (図 3)。一方で、WO-77 には *CCNE1* 遺伝子コピー数増幅を認めたと、WO-24 には *CCNE1* 遺伝子コピー数は低かった (図 3)。また、PDX マウスの継代 (5 継代まで) によって遺伝子異常の変化は認められなかった。

図 3 卵巣がん HGSOC PDX モデル WO-77 と WO-24 における遺伝子変異とコピー数異常

WO-77	TP53 c.G646A (p.V216M) PIK3CA c.A1034T (p.N345I) CCNE1 amplification (copy number 9.1) MYC amplification (copy number 10.4)
WO-24	TP53 c.G818A (p.R273H) ARID1A c.2836dupC (p.G945fs) ARID1A c.4669_4675del (p.1557fs) CCNE1 low (copy number 1.6)

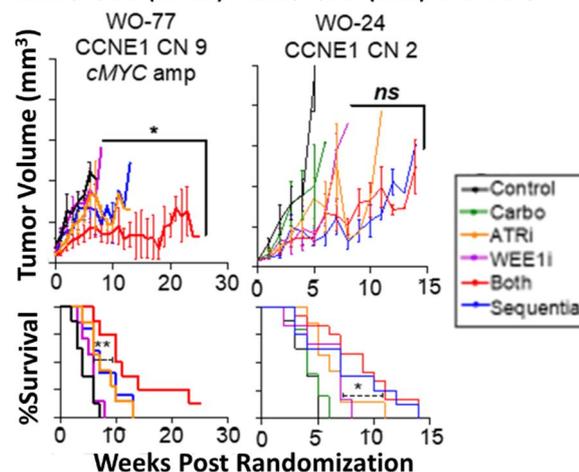
(3) 遺伝子解析結果を基にした新規分子標的治療 ATR 阻害剤 (ATRi) + WEE1 阻害剤 (WEE1i) の PDX モデルでの検討

CCNE1 遺伝子増幅は HGSOC の約 20% に認め、プラチナ系抗がん剤耐性と関連し予後不良因子として知られている。一方で、*CCNE1* 遺伝子増幅は細胞分裂時の Replication stress を増加させ、細胞周期 G2-M チェックポイントへの依存性を高めるとされる。このことに着目し、我々は細胞周期や DNA Damage に関する分子標的薬 ATR 阻害剤 (ATRi) と WEE1 阻害剤 (WEE1i) の併用療法 (ATRi + WEE1i) が奏功すると考え PDX マウスモデルを用いた投薬実験を実施した。

全身麻酔下に免疫不全マウスに開腹手術を実施し、1 mm³ 大の PDX 腫瘍 3 個をマウス卵巣に縫合し、WO-77 と WO-24 の PDX マウスモデルを作成した。数週間後に増大してきた PDX 腫瘍を触診と経腹超音波にて経時的に観察し、腫瘍が 60-100 mm³ に達した時点で 6 群 (コントロール、カルボプラチン単剤、ATRi 単剤; AZD6738、WEE1i 単剤; AZD1775、ATRi + WEE1i 同時併用 Both、ATRi + WEE1i 順次併用 Sequential) にランダム化し投薬を開始した。腫瘍サイズは毎週超音波にて計測し、1200 mm³ に達した時点でマウスを安楽死させ、腫瘍組織を採取しエンドポイントとした。薬の副作用に関しては毎週体重の評価ならびにコンディションスコアを記録しモニタリングした。

CCNE1 遺伝子増幅を持つ WO-77 に ATRi + WEE1i 同時併用療法を投与すると、それぞれの単剤療法ならびにカルボプラチン単剤より優位な抗腫瘍効果、腹水産生抑制と生存率の延長を認めた (図 4)。一方で、*CCNE1* 遺伝子増幅を持たない WO-24 では ATRi + WEE1i 療法による抗腫瘍効果は WO-77 に比して乏しく、腹水産生は抑制されなかった。

図 4 WO-77 ならびに WO-24 卵巣癌 PDX モデルでの WEE1 阻害剤 (WEE1i) + ATR 阻害剤 (ATRi) 治療の検討



よって、本研究成果より *CCNE1* 遺伝子増幅を持つ HGSOC の腹膜播種制御、大量腹水抑制、予後改善には、新規分子標的薬の併用療法 ATRi + WEE1i が有効である可能性がある。今後さらに多くの PDX マウスモデルでの検討ならびに詳細メカニズムを解析し、本治療法が卵巣癌の新たな革新的治療となる可能性を探索していく。そして、我々の腹膜播種 PDX マウスモデルを用いて、今後もさらなる卵巣癌腹膜播種進展機構の解明と新規標的治療の開発研究を行ってゆく。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計0件

〔図書〕 計0件

〔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
研究協力者	木瀬 康人 (Kinose Yasuto) (90778531)	大阪大学・医学系研究科・助教 (14401)	
研究協力者	粕谷 香南子 (Kasuya Kanako)	大阪大学・医学系研究科・大学院生 (14401)	
研究協力者	王 妍 (Wang Yan)	大阪大学・医学系研究科・大学院生 (14401)	
研究協力者	岡村 綾子 (Okamura Ayako) (40910253)	大阪大学・医学系研究科・技術補佐員 (14401)	

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