

令和 5 年 5 月 28 日現在

機関番号：32612

研究種目：若手研究

研究期間：2021～2022

課題番号：21K15576

研究課題名（和文）婦人科重複癌および再発癌の三次元的ゲノム発現解析による発癌機序と治療法の探索

研究課題名（英文）Three-dimensional genomic expression analysis of gynecological multiple cancers and recurrent cancers to reveal oncogenic mechanisms and therapeutic targets

研究代表者

竹田 貴（TAKEDA, Takashi）

慶應義塾大学・医学部（信濃町）・特任助教

研究者番号：60897106

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,600,000円

研究成果の概要（和文）：Lynch症候群における、子宮内膜、卵巣の同時発癌は、一般集団における同時発癌が進行転移性を示唆する近年の報告と異なり、それぞれの臓器から発癌した初期癌が多いことが示された。また、各癌はともにLynch症候群の特徴である腫瘍変異量が多く、免疫チェックポイント阻害薬の良い適応であった。また遺伝性乳癌卵巣癌に多い漿液性卵巣癌においては、PARP阻害薬の適応を決める相同組み換え修復機構が、化学療法によって変容しうることを示され、適切な検体での検査実施が治療法選択に重要であると考えられた。現在オルガノイドによる卵巣癌発癌モデル樹立が進んでおり、予防薬、早期診断への寄与と他婦人科癌への発展が期待される。

研究成果の学術的意義や社会的意義

Lynch症候群や遺伝性乳癌卵巣癌など、遺伝的に婦人科癌を発症する疾患では、同時多発的に複数の臓器に癌を生じてくることがあるが、特に子宮内膜、卵巣に同時に癌を生じた場合は、組織型が異なる場合は完全に独立した癌である可能性が高いことが示され、同時に各癌の治療を行うことの重要性と特に明細胞癌における免疫チェックポイント阻害薬の有用性が示唆された。また漿液性卵巣癌においては、PARP阻害剤の適応判断となるHRDステータスが、化学療法によって変動する可能性も示唆され、適切な検体を用いた検査実施が、治療選択に重要であると考えられ、今後の卵巣癌の治療戦略構築に影響するものと考えられた。

研究成果の概要（英文）：Synchronous endometrial and ovarian cancer in Lynch syndrome showed that they originated from the respective organs as early cancer, which is contrary to recent reports suggesting that synchronous endometrial and ovarian cancer in the general population is metastatic. Both cancers showed high mutation burden, the characteristic of Lynch syndrome and they would be suitable for immune checkpoint inhibitors. In serous ovarian cancer, common in hereditary breast and ovarian cancer, the homologous recombination repair mechanism that determines the indication for PARP inhibitors can be altered by chemotherapy. This suggests that testing with appropriate specimens is necessary for treatment selection. Currently, we are focusing on developing ovarian tumor initiation organoid models. They can contribute to early diagnosis of ovarian cancer, as well as develop models for other gynecological cancers.

研究分野：婦人科癌

キーワード：重複癌 Lynch症候群 遺伝性乳癌卵巣癌 治療抵抗性 相同組み換え修復 オルガノイド

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

子宮体癌、卵巣癌は近年、罹患率の増加が認められ、若年発症も増加傾向にある。遺伝性腫瘍である、ミスマッチ修復遺伝子の異常によって生じる Lynch 症候群においては、子宮体癌、卵巣癌が好発し、BRCA 遺伝子異常によって生じる遺伝性乳癌卵巣癌 (Hereditary Breast and Ovary Cancer: HBOC) においては、漿液性卵巣癌が多く発症し、これらの遺伝学的背景の関与が比較的多いことが知られるようになってきた。これらの子宮体癌と卵巣癌は時に重複癌として同時に生じてくることもあるが、臓器的に近接しているため転移性癌との鑑別が困難であることも多い。これらの遺伝背景に関連している子宮体癌、卵巣癌は、Lynch 症候群に関連した腫瘍の特徴である、高頻度マイクロサテライト不安定性 (Microsatellite instability-high: MSI-high) や高腫瘍変異量 (Tumor mutation burden-high: TMB-high) は免疫チェックポイント阻害薬である PD-1 抗体や PD-L1 抗体のコンパニオン診断として検査され、HBOC に関連した BRCA 遺伝子検査や相同組み換え修復欠損 (HRD) は、PARP 阻害薬のコンパニオン診断として、保険適用されるようになってきた。これらの治療薬は主に再発時に使用されるが、初発癌の一部の癌細胞が治療に抵抗して再発してくることから、腫瘍の特徴が変容し、上記の治療薬に反応しないこともある。遺伝性の有無により正常細胞から発症の過程に違いがあるのか、同様の遺伝背景から子宮、卵巣という異なる母地から発生する癌にどのような違いがあるのか、初発癌から再発癌にどのような変化が起こるのか、遺伝性・臓器別・時間軸の3つのパラメーターで腫瘍の差異を明らかにすることで、発症、進行、転移、再発を明らかにできるのではないかと考えた。

2. 研究の目的

本研究の目的は、遺伝性という臨床背景に注目し、子宮体癌卵巣癌の重複癌、MSI-H を示す初発癌再発癌を対象に、MSI を含む腫瘍ゲノム解析、腫瘍免疫の発現解析を行うことにより、婦人科癌の発症機序の解明および新規治療を開発することを目的とした。

3. 研究の方法

(1) Lynch 症候群における子宮・卵巣癌の発症機構の比較解析 (遺伝性、臓器別の検討)

2015 年から 2020 年で重複癌の臨床診断に至った 29 例のうち、MSI 検査によるスクリーニングの後、ミスマッチ修復遺伝子の生殖細胞系列病的バリエーションが検出され Lynch 症候群の確定診断に至った症例 4 例を対象に、子宮体癌、卵巣癌の FFPE 標本または凍結組織を用いて、DNA を抽出し、OncoPrint Tumor Mutation Load Assay を用いてシーケンスを行い、エクソン領域の non-synonymous バリエーション検出と腫瘍変異量算出を行った。また、各癌組織における、PD-L1, CD8, Arginase-1 の免疫組織化学を行い、腫瘍免疫との関連を検討した。

(2) 卵巣癌における化学療法前後の生検・摘出検体を用いた比較解析 (時間軸の検討)

2020-2021 年に進行漿液性卵巣癌の診断症例で、化学療法前に腹腔鏡下腫瘍生検を施行し、化学療法後に腫瘍減量術を施行した症例、及び初回腫瘍減量術を施行した症例で HRD 検査が陽性となった症例に対して、腫瘍組織の DNA を抽出し、全ゲノムシーケンス (WGS) を施行し、HRD スコアの算出を行った。全症例が保険適応となっている PARP 阻害薬のコンパニオン診断としての Myriad 社の HRD 検査を施行しているため、WGS から算出した HRD スコアを比較解析した。また、化学療法前後の検体でも HRD スコアの推移などを解析した。

(3) 正常卵管上皮細胞由来オルガノイドを用いた発症モデルの樹立 (時間軸の検討)

正常卵管から上皮由来細胞を採取し、マトリゲル包埋下で正常卵管オルガノイドを樹立した。TP53 遺伝子、PTEN 遺伝子、BRCA 遺伝子を CRISPR-Cas9 を用いて、ノックアウトした。

4. 研究成果

(1) Lynch 症候群における子宮・卵巣癌の発症機構の比較解析 (遺伝性、臓器別の検討)

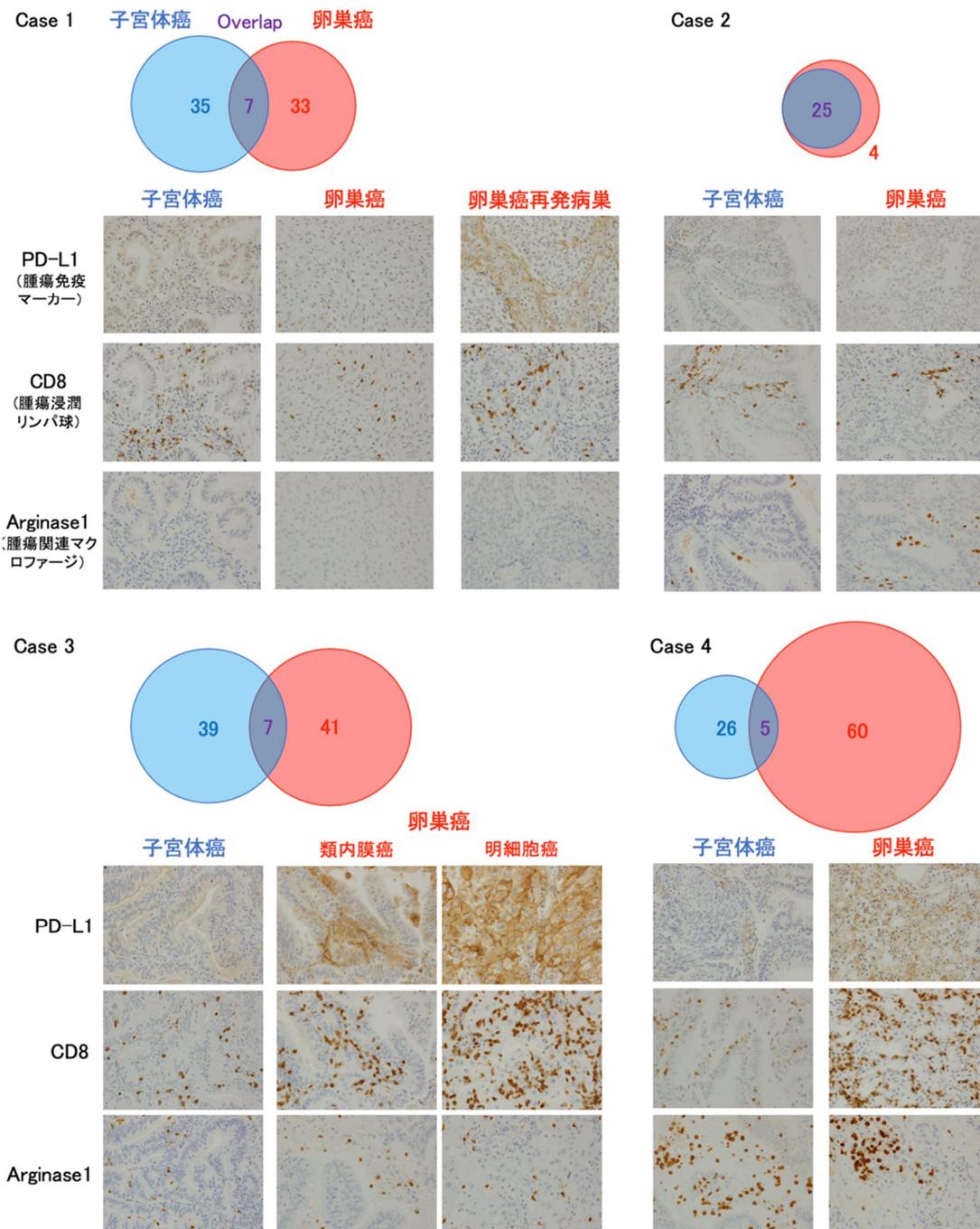
比較解析の詳細を、表 1 に示した。各組織とも、20-70 の non-synonymous なバリエーションを有しており、算出された腫瘍変異量は 10Mutations/Mb を超え、MSI-high を特徴とする Lynch 症候群に矛盾しない TMB-high を示した。

(表 1)

Case No	1		2		3		4	
	MSH2		MSH6		MSH2		MLH1	
生殖細胞系列病的バリエーション								
原発癌	子宮体癌	卵巣癌	子宮体癌	卵巣癌	子宮体癌	卵巣癌	子宮体癌	卵巣癌
臨床進行期	IA	IA	IA	IC3	IIIc2	IA	IA	IIIc
組織型	類内膜癌G1	癌肉腫	類内膜癌G1	類内膜癌G3	類内膜癌G2	類内膜癌G1 +明細胞癌	類内膜癌G1	明細胞癌
コールされたバリエーション数	42	40	25	29	46	48	31	65
がん遺伝子のバリエーション数	14	10	8	8	13	15	10	23
がん抑制遺伝子のバリエーション数	17	17	10	11	20	17	9	19
腫瘍変異量 (Mutations/Mb)	22.51	25.35	12.5	14.7	18.33	22.31	14.99	40.86

さらに、それぞれの変異のオーバーラップを確認すると、図1で示すように case2 では完全にオーバーラップしており、臨床的に子宮体癌と卵巣癌の重複癌と判断された症例ではあったものの、腫瘍プロファイルからは一方は他方の転移性であることが示された。残りの3例はオーバーラップが少なく、各腫瘍はそれぞれ原発であり、異なる変異を獲得して発癌していたことが示された。変異量が多い腫瘍においては、免疫細胞の浸潤や PD-L1 の発現上昇など、免疫チェックポイント阻害薬への反応が期待されるが、特に case3.4 では、卵巣癌組織における PD-L1 発現と CD-8 陽性細胞数が多かった。Case3.4 の卵巣癌はともに明細胞癌であり、腫瘍変異量が高いものの比較的 PD-L1 や CD-8 の発現が低かった case1 の卵巣癌（癌肉腫）と異なった腫瘍免疫プロファイルを呈しており、明細胞癌における腫瘍免疫のさらなる検討が必要であると考えられた。

(図1) 各症例における各癌の変異遺伝子のオーバーラップと免疫組織化学

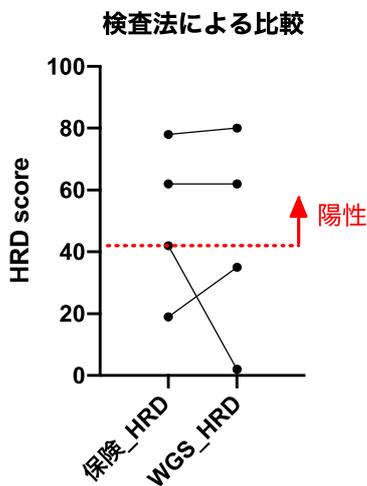


(2) 卵巣癌における化学療法前後の生検・摘出検体を用いた比較解析(時間軸の検討)

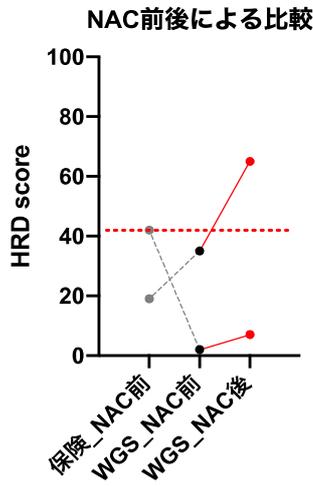
全6症例、8検体(2例の化学療法前後検体を含む)を用いて、解析を行った。まず、保険収載されている現行のHRD検査を行っていた4例においてWGSによって算出されたHRDスコアを比較すると、HRDスコアが高い癌組織BRCA変異陽性例ではほぼ値に差はなかったが、HRDスコアが低い検体では異なって算出された(図2)。HRDスコアが特にHRDが低い症例では解析方法によって異なって算出される可能性があり、今後複数の検査法が保険適用となった場合にはその方法の特徴などを踏まえた解釈が必要になると考えられた。

さらに術前化学療法前後の検体で検査可能であった2例を解析すると、化学療法前2点、後7点と変化が乏しい例と、化学療法前35点後65点と変化が著明だった例を認めた(図3)。特に化学療法後にHRD陽性となった症例においては、今後算出されたバリエーションをリストアップし、RNA発現解析を追加で行い、その要因を追究する。また、今回検討した6例のうち、腫瘍部及び生殖細胞系列でのBRCA遺伝子の病的バリエーションの有無でHRDスコアを比較すると、腫瘍BRCA陽性症例では全例HRD陽性であり、正しくHRDスコアが算出していたことが裏付けられた。また、生殖細胞系列でのBRCA変異(gBRCA)の有無はHRDスコアの高さとは相関していなかった(図4)。

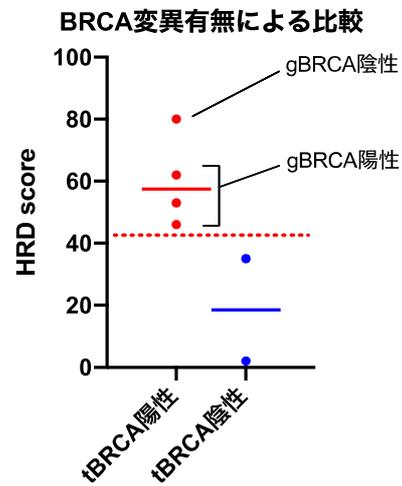
(図2)



(図3)



(図4)

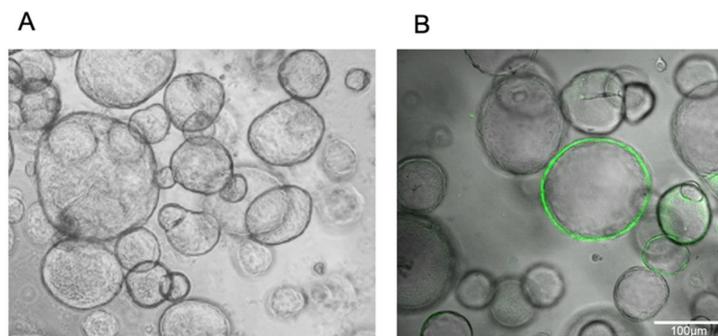


(3) 正常卵管上皮細胞由来オルガノイドを用いた発癌モデルの樹立(時間軸の検討)

正常卵管オルガノイドを複数樹立し、その培養条件などの最適化を行った。最適な培養条件下においては、このオルガノイドは10passage以上の継代培養が可能であり、in vitroの実験に耐えられるオルガノイドであることが示された。2つのオルガノイドにておいては、TP53, PTEN, BRCA 遺伝子をCRISPR-Cas9によりノックアウトと試み、約10-50%程度の遺伝子編集効率を認めた(図5)。現時点で、ヒト卵管由来オルガノイドの遺伝子編集の報告はなく、遺伝子編集ができたことは、非常にインパクトの高い結果であると言える。

今後、clonal expansionによる選択により100%の遺伝子編集オルガノイドを樹立させ、wild-typeとの発現比較解析などの行う予定である。

(図5)



A. 正常卵管オルガノイド(明視野) B. Lentivirusを用いて、PTENをノックアウトした卵管オルガノイド(Cas9-GFP)

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計3件（うち査読付論文 3件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 2件）

1. 著者名 Takeda Takashi, Tsuji Kosuke, Kobayashi Yusuke, Banno Kouji, Aoki Daisuke	4. 巻 52
2. 論文標題 Clinical and pathological analysis of companion diagnostic testing of microsatellite instability-high for pembrolizumab in gynaecologic malignancy	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Japanese Journal of Clinical Oncology	6. 最初と最後の頁 128 ~ 133
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1093/jjco/hyab175	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 Kobayashi Yusuke, Takeda Takashi, Kunitomi Haruko, Chiwaki Fumiko, Komatsu Masayuki, Nagai Shimpei, Nogami Yuya, Tsuji Kosuke, Masuda Kenta, Ogiwara Hideaki, Sasaki Hiroki, Banno Kouji, Aoki Daisuke	4. 巻 15
2. 論文標題 Response Predictive Markers and Synergistic Agents for Drug Repositioning of Statins in Ovarian Cancer	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Pharmaceuticals	6. 最初と最後の頁 124 ~ 124
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.3390/ph15020124	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 Komatsu Masayuki, Nakamura Kanako, Takeda Takashi, Chiwaki Fumiko, Banno Kouji, Aoki Daisuke, Takeshita Fumitaka, Sasaki Hiroki	4. 巻 41
2. 論文標題 Aurora kinase blockade drives de novo addiction of cervical squamous cell carcinoma to druggable EGFR signalling	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Oncogene	6. 最初と最後の頁 2326 ~ 2339
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1038/s41388-022-02256-3	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6件（うち招待講演 0件/うち国際学会 0件）

1. 発表者名 松沢優一, 竹田貴, 白石慧, 神谷美緒, 泉顕治, 小林新, 白石悟
2. 発表標題 審査腹腔鏡手術での生検検体でHRD陽性および陰性が確定した2例の腹膜癌における、術前補助化学療法からIDS手術までの治療経過の比較・検討
3. 学会等名 第94回栃木県産科婦人科学会学術集会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 小林新, 竹田貴, 明石一浩, 平野翔大, 泉顕治, 吉政佑之, 白石悟
2. 発表標題 術前診断として卵巢腫瘍との鑑別が困難であった後腹膜神経鞘腫の1例
3. 学会等名 第63回日本婦人科腫瘍学会学術講演会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 竹田貴, 小林新, 明石一浩, 平野翔大, 泉顕治, 白石悟
2. 発表標題 遺伝部門のない病院における、保険適用となったHBOC診療に対応した遺伝外来立ち上げの取り組み
3. 学会等名 第63回日本婦人科腫瘍学会学術講演会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 松沢優一、竹田 貴、白石 慧、柿沼裕樹、小林 新、白石 悟
2. 発表標題 当院にて、乳癌発症より遺伝性乳癌卵巢癌症候群の確定診断に至り、保険手術としてリスク低減卵管卵巢摘出術を施行した1例
3. 学会等名 第24回栃木県内視鏡外科研究会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 立石真子、竹田 貴、金子奈穂美、白石哲郎、中山真里、田中恒成、白石 悟
2. 発表標題 医学的適応による未受精卵子および胚の凍結・保存した症例の検討
3. 学会等名 第97回栃木県産科婦人科学会学術集会
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 白石哲郎、竹田 貴、金子奈穂美、立石真子、田中恒成、白石 悟
2. 発表標題 栃木県北を医療圏とする当院における乳癌患者に対するBRCA1/2遺伝子検査およびリスク低減卵管卵巣摘出術への取り組み
3. 学会等名 第29回日本遺伝性腫瘍学会学術集会
4. 発表年 2023年

〔図書〕 計2件

1. 著者名 竹田 貴、白石 悟	4. 発行年 2022年
2. 出版社 金原出版	5. 総ページ数 5
3. 書名 産婦人科の実際 -遺伝部門のない病院における保険適用となったHBOC診療に対応した遺伝外来立ち上げの取り組み-	

1. 著者名 竹田 貴、阪埜浩司	4. 発行年 2022年
2. 出版社 金原出版	5. 総ページ数 2
3. 書名 日本医事新報 -治療法の再整理とアップデートのために 専門家による私の治療 子宮肉腫-	

〔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
---------	---------