

平成 30 年 8 月 29 日現在

機関番号：32612

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2015～2017

課題番号：15K10730

研究課題名(和文) 卵巣癌細胞の薬剤感受性と遺伝子プロファイルに基づいた治療法の確立

研究課題名(英文) Towards precision medicine for ovarian cancer using drug sensitivity and resistance testing and genomic analysis

研究代表者

富永 英一郎 (Eichirou, Tominaga)

慶應義塾大学・医学部(信濃町)・講師

研究者番号：80276328

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,700,000円

研究成果の概要(和文)：本研究課題内において以下のような成果を挙げた。

患者腹水検体より腹膜中皮腫細胞株を樹立することに成功した。樹立細胞株を使った2次元および3次元培養下での薬剤感受性試験を実施した。悪性中皮腫標準治療に使用される薬剤ペメトレキセドは2次元培養下では薬剤感受性があったのに対し、3次元培養下では薬剤効果はなかった。結果は臨床経過と一致し生体内環境を模倣した薬剤感受性試験の実施が可能であった。卵巣癌患者の腫瘍病変組織片より、スフェロイドを形成することを可能とし生体内構造に類似する腺管構造を作り出すことに成功した。卵巣癌腫瘍組織由来のスフェロイド形成に成功したのは本研究が初であり有用な成果となった。

研究成果の概要(英文)：The following results were raised within this research project.

We successfully established a new cell line from malignant mesothelioma ascites. This cell line is a valuable biological resource to study the mechanisms underlying carcinogenesis in peritoneal mesothelioma and for drug sensitivity tests (DSRT). DSRT were conducted in two dimensional and three dimensional cultures using established cell lines. The pemetrexed (PEM) is used for standard therapy of malignant mesothelioma. PEM was drug susceptibility in two dimensional culture by DSRT, but there was no drug effect in three dimensional culture. Those results were consistent with the clinical course and it was possible to conduct a DSRT that mimics the in vivo environment. Cell cultured from ovarian carcinoma tumor tissue fragments formed spheroids and succeeded in creating a ductal structure similar to the in vivo structure. We succeeded in forming spheroids derived from ovarian cancer tumor tissue.

研究分野：Oncology

キーワード：薬剤感受性

1. 研究開始当初の背景

卵巣癌は確立された検診手法が存在しないことから、早期発見が困難で進行がんで発見される場合が多く、婦人科悪性腫瘍の中で最も死亡率が高い予後不良な疾患である。卵巣癌の治療成績を向上させることは、女性全体の癌死亡率の減少につながると言っても過言ではない。卵巣癌は欧米では抗癌剤感受性の高い比較的良好的な漿液性癌が大多数を占める。しかし日本をはじめとした東アジアでは、白金製剤を主体とする現在の標準的化学療法に抵抗を示す明細胞癌や粘液性癌の占める割合が多い(厚生労働科学研究費補助金 第3次対がん総合戦略報告)。このような背景から、卵巣癌治療成績を向上させるには、欧米と類似の方法を行うのではなく、本邦における独自の対策や治療法の確立が必要である。そこで近年注目されているドラッグリポジショニング(既存薬再開発: drug repositioning)に着目した。ドラッグリポジショニングの利点は、一つ目に新規化合物を用いた新薬開発に比較して予期せぬ副作用が出現する確率が格段に低い。二つ目に臨床試験(治験)にかかる時間とコストを削減できることが挙げられる。これらの利点から難治性卵巣癌に対する個別化治療戦略の確立には、新薬の開発と並行しドラッグリポジショニングの概念を導入することが望ましいと考える。

婦人科癌領域における卵巣癌に対する新規薬剤の開発は、造血器腫瘍・消化器癌・乳癌・呼吸器癌等と比較して世界的にも極めて少ない。卵巣癌に対する分子標的治療薬はペバシズマブが適応承認を得ているのみであり、がんの分子機序に基づいた precision medicine は行われていない。それらの理由として卵巣癌の分子機構が十分に解明されていないこと、罹患率が造血器腫瘍・消化器癌・乳癌・呼吸器癌等と比較して低いために企業が採算性を考慮して積極的に開発や臨床試験(治験)を行わないなどの理由が考えられる。このような現状から難治性卵巣癌の個性診断に基づいた個別化治療パイプライン創出は喫緊の課題である現状が本研究の背景である。

2. 研究の目的

本研究の目的は、ドラッグリポジショニングに基づいた難治性卵巣癌に対する治療法の開発から、現在の治療と比較しより奏効する副作用の低い新規治療法を確立することである。

近年のドラッグリポジショニング研究は適応を持たない抗癌剤の switching のみならず、各種生活習慣病治療薬の抗腫瘍作用を明らか

にしてきた。一例として、経口糖尿病薬メトフォルミンを使用している卵巣癌患者は、非使用卵巣癌患者より生存が良好であることが報告されている(Kumar Set al. *Cancer* 2013)。そこで本研究は卵巣癌細胞を対象に薬剤感受性試験(drug sensitivity and resistance testing: DSRT)にて高感受性を示す薬剤を検出するとともに、ゲノム解析と遺伝子発現解析から薬剤感受性に関連する遺伝子を同定、パスウェイ解析にてドラッグリポジショニング候補薬を同定し、卵巣癌治療へのアプローチを構築することで個別化医療を確立するための基盤的検討を目的とした。

3. 研究の方法

(1) 卵巣癌新鮮癌組織および腹水細胞からの3次元初代培養法の確立

腹水細胞からの初代培養は、採取した腹水を遠心しペレットと上清へ分離させ、ペレットの溶血処理後、Nano Culture Plate LH 96 に 1×10^5 cells/mL を 100 μ L/well 播種した。その後、腹水より調整した腹水培地をさらに添加し、5%CO₂37 で培養後、day0, 1, 4, 7, 10, 14 に顕微鏡下にて細胞増殖の程度を観察した。

(2) 培養細胞を使った卵巣癌承認薬剤および治験中分子標的薬の感受性評価

卵巣癌組織および腹水細胞から実施した 3次元初代培養細胞にて生体内の環境を模倣した培養条件で細胞増殖および DSRT を行った。卵巣癌組織片より単個に分離した採取細胞を 384well の multiplate に播種し、プレートの各 well 上で 72 時間培養した後、各 well に薬剤を 6 つの濃度に割り振り添加した。その後さらに 72 時間培養し、各 well に CellTiter-Glo™ Luminescent Cell Viability Assay を添加しプレートリーダーで ATP 活性の発光強度を測定することで培養中の生存細胞数を測定し、各種薬剤の IC₅₀ を求めた。各薬剤は卵巣癌の適応を有するもの 卵巣癌の適応を有しないもの 臨床試験(治験)段階の各薬剤を対象とした。同システムを卵巣癌例ヒト試料由来の *ex vivo* 解析に導入することでドラッグリポジショニングの候補となる薬剤同定の基盤を構築した。

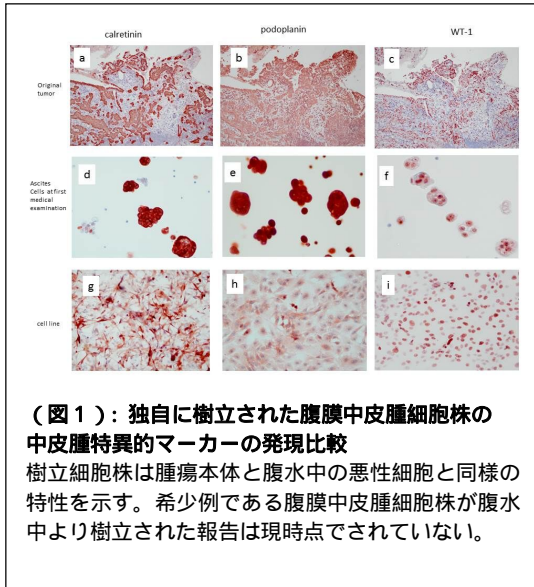
4. 研究成果

本研究実施期間内において、次のような成果があげられた。

(1) 腹水腫瘍細胞からの培養細胞株の樹立

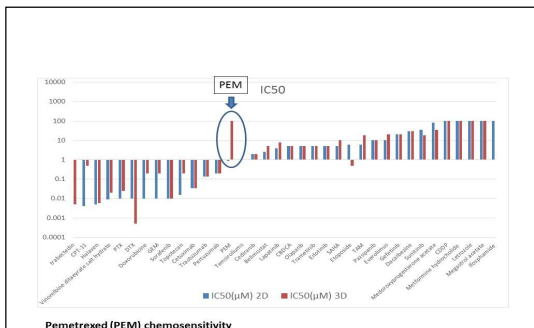
本研究において患者腹水検体より希少例で

ある腹膜中皮腫細胞株を独自で樹立することに成功した(図 1 a-i)。腹膜中皮腫由来の樹立細胞株は現時点で報告されているのは 2 株のみである。本研究において樹立された細胞は、卵巣癌のみでなく腹膜中皮腫の薬剤感受性を使用した個別化治療法の確立に発展できる可能性がある。



(図 1): 独自に樹立された腹膜中皮腫細胞株の中皮腫特異的マーカーの発現比較
樹立細胞株は腫瘍本体と腹水中の悪性細胞と同様の特性を示す。希少例である腹膜中皮腫細胞株が腹水中より樹立された報告は現時点でされていない。

(2) 培養細胞を使った卵巣癌承認薬剤および治験中分子標的薬の感受性評価
樹立細胞株を使った 2 次元および 3 次元培養下での薬剤感受性試験を実施した。樹立した腹膜中皮腫細胞を 384well の multiplate に播種し、プレートの各 well 上で 72 時間培養した後、各 well に薬剤を 6 つの濃度に割り振り添加した。その後 72 時間培養し、各 well に CellTiter-Glo™ Luminescent Cell Viability Assay を添加、プレートリーダーで培養中の生存細胞数を測定し、各種薬剤の IC₅₀ を求めた。

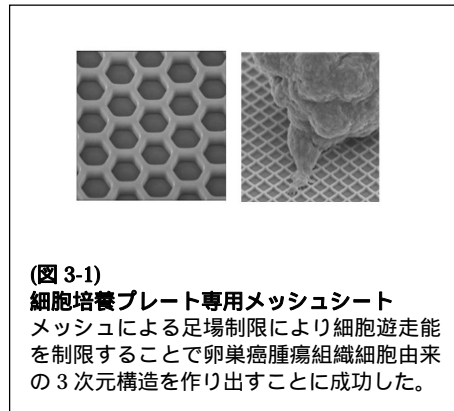


(図 2)
Pemetrexed (PEM) 耐性腹水より樹立した細胞株による薬剤感受性試験のグラフ
2 次元培養では薬剤感受性有りに対し 3 次元培養下では PEM 効果は無く樹立細胞株の腹水採取時の臨床状態を反映していた。

その結果、悪性中皮腫治療に使用される薬剤ペメトレキセドは 2 次元培養下では薬剤感受性があったのに対し、3 次元培養下では薬剤効果はなく、樹立細胞由来の腹水検体採取時の臨床経過と一致した。本研究は一般的に実施されている単層培養法ではなく、ゲル包埋法による 3 次元培養や腹水含有培地による培養により、患者の生体内に類似した生理的な環境を模倣して培養条件における薬剤感受性試験を実施することが可能であった(図 2)。

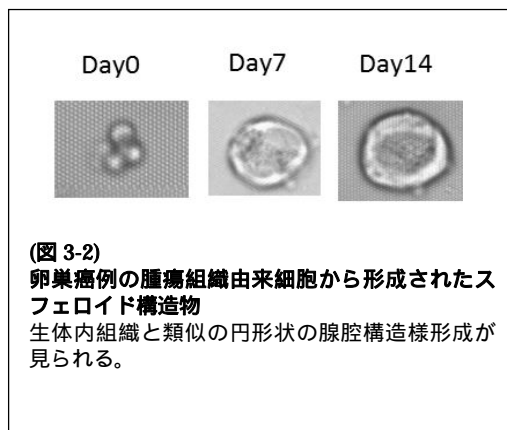
(3) 卵巣癌新鮮癌組織および腹水細胞からの 3 次元初代培養法の確立

卵巣癌患者の腫瘍病変組織片より、NanoCulture Plate を使用し細胞の足場を施している樹脂フィルムをボトムに採用することで細胞の基盤への接着を制限し、遊走した細胞同士の接触と接着を繰り返してスフェロイドを形成することを可能とした(図 3-1)。



(図 3-1)
細胞培養プレート専用メッシュシート
メッシュによる足場制限により細胞遊走能を制限することで卵巣癌腫瘍組織細胞由来の 3 次元構造を作り出すことに成功した。

さらにスフェロイド形成後、生体内構造に類似する腺管構造を作り出すことに成功した(図 3-2)。現時点で卵巣癌腫瘍由来のスフェロイド形成に成功したのは本研究が初であり、有用な成果となった。



(図 3-2)
卵巣癌例の腫瘍組織由来細胞から形成されたスフェロイド構造物
生体内組織と類似の円形状の腺管構造様形成が見られる。

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

(雑誌論文)(計 15 件)

1. Takeda T, Tsuji K, Banno K, Yanokura M, Kobayashi Y, Tominaga E, Aoki D. Screening for Lynch syndrome using risk assessment criteria in patients with ovarian cancer. *J Gynecol Oncol*. 2018.May;29(3):e29. doi:10.3802/jgo.2018.29.e29. Epub 2018, Jan 30 (査読あり).
2. Yamagami W, Susumu N, Makabe T, Sakai K, Nomura H, Kataoka F, Hirasawa A, Banno K, Aoki D. Is repeated high-dose medroxyprogesterone acetate (MPA) therapy permissible for patients with early stage endometrial cancer or atypical endometrial hyperplasia who desire preserving fertility? *J Gynecol Oncol*. 2018, 29(2), e21. doi, 10.3802/jgo.2018.29.e21. Epub 2018 Jan 2 (査読あり).
3. Ueno M, Shiomi T, Mochizuki S, Chijiwa M, Shimoda M, Kanai Y, Kataoka F, Hirasawa A, Susumu N, Aoki D, Okada Y. ADAM9 is over-expressed in human ovarian clear cell carcinomas and suppresses cisplatin-induced cell death. *Cancer Sci*. 2018, 109(2), 471-482. doi, 10.1111/cas.134692 (査読あり).
4. Hirasawa A, Imoto I, Naruto T, Akahane T, Yamagami W, Nomura H, Masuda K, Susumu N, Tsuda H, Aoki D. Prevalence of pathogenic germline variants detected by multigene sequencing in unselected Japanese patients with ovarian cancer. *Oncotarget*. 2017, 8(68),112258-67.10.18632/oncotarget.22733. eCollection 2017 Dec 222 (査読あり).
5. Kunitomi H, Banno K, Iseki H, Sera A, Miyauchi A, Kobayashi Y, Hayashi S, Tominaga E, Sasaki A, Kawaida M, Kameyama K, Aoki D. Radiation-induced angiosarcoma of the omentum diagnosed by laparoscopy: A case report. *Mol Clin Oncol*. 2018Feb;8(2):264-268. doi:10.3892/mco.2017.1513. Epub 2017, Nov 27(査読あり).
6. Watanabe K, Kobayashi Y, Banno K, Matoba Y, Kunitomi H, Nakamura K, Adachi M, Umene K, Kisu I, Tominaga E, Aoki D. Erratum: Recent advances in the molecular mechanisms of Mayer-Rokitansky-Küster-Hauser syndrome. *Biomed Rep*. 2018Jan;8(1):106. doi:10.3892/br.2017.1018. Epub 2017, Nov 13(査読あり).
7. Yoshihama T, Nomura H, Iwasa N, Kataoka F, Hashimoto S, Nanki Y, Hirano T, Makabe T, Sakai K, Yamagami W, Hirasawa A, Aoki D. Efficacy and safety of dose-dense paclitaxel plus carboplatin as neoadjuvant chemotherapy for advanced ovarian, fallopian tube or peritoneal cancer. *Jpn J Clin Oncol*. 2017, 47(11), 1019-23. doi, 10.1093/jjco/hyx1182(査読あり).
8. Yamagami W, Susumu N, Kataoka F, Makabe T, Sakai K, Ninomiya T, Wada M, Nomura H, Hirasawa A, Banno K, Nakahara T, Kameyama K, Aoki D. A Comparison of Dye Versus Fluorescence Methods for Sentinel Lymph Node Mapping in Endometrial Cancer. *Int J Gynecol Cancer*. 2017, 27(7),1517-24. doi, 10.1097/IGC.00000000000009972(査読あり).
9. Masuda K, Hirasawa A, Irie-Kunitomi H, Akahane T, Ueki A, Kobayashi Y, Yamagami W, Nomura H, Kataoka F, Tominaga T, Banno K, Susumu N, Aoki D. Clinical utility of a self-administered questionnaire for assessment of hereditary gynecologic cancer. *Jpn J Clin Oncol*. 2017, 47 (5), 401-406. 10.1093/jjco/hyx0192(査読あり).
10. 平沢 晃,青木大輔. タモキシフェンの子宮内膜に対する副作用とその対策は? 百枝幹雄編 女性内分泌クリニカルクエスチョン. 診断と治療社 2017, 196-198 (査読なし).
11. 平沢 晃,青木大輔. 百枝幹雄編 BRCA1またはBRCA2 遺伝子変異保持者に対するリスク低減卵巣摘出術(RRSO)の効果は? 女性内分泌クリニカルクエスチョン

ン. 産科と婦人科 診断と治療社 2017, 199-200 (査読なし).

12. 平沢 晃, 高松 潔, 青木大輔. *BRCA1* または *BRCA2* 遺伝子変異陽性女性への HRT. 産科と婦人科 診断と治療社 2017, 84(12), 1468-1471 (査読なし).
13. 平沢 晃, 青木大輔. 乳癌ゲノム医療最前線-臨床応用はどこまで進んだか, PARP 阻害薬. カレントセラピー. ライフメディコム 2017, 35(9) 74-77 (査読なし).
14. 平沢 晃, 青木大輔. 遺伝性乳癌卵巣癌症候群と女性ヘルスケア. 更年期と加齢のヘルスケア. 2017, 16(1), 42-45 (査読なし).
15. 植木有紗, 中田さくら, 安齋純子, 麻薙美香, 嶋田恭輔, 久保内光一, 三須久美子, 平沢 晃, 阪埜浩司, 菅野康吉, 小崎健次郎, 青木大輔. 一般病院における家族性腫瘍相談外来とハイリスク外来の開設 -一般病院に求められる家族性腫瘍診療の意義についての考察-. 家族性腫瘍 2017, 16(2), 38-43 (査読なし).

[学会発表](計 9 件)

1. Hirasawa A, Imoto I, Naruto T, Akahane T, Yamagami W, Nomura H, Masuda K, Susumu N, Tsuda H, Aoki D (口頭). Germline variants of cancer susceptibility genes for ovarian, fallopian tube, and peritoneal cancers in Japanese, , The 57th Annual Congress of Taiwan Association of Obstetrics and Gynecology 2018(Symposium), 国外.
2. Hirasawa A, Aoki D (口頭). Pathogenic germline variants of ovarian, fallopian tube, and peritoneal cancers in Japanese, 5th Biennial Meeting of Asian Society of Gynecologic Oncology. (Symposium) 2017, 国内.
3. Hirasawa A, Aoki D (口頭). Peutz-Jeghers syndrome as a hereditary gynecological tumor. Shanghai Pudong Cervical Disease Summit Forum & Classes on Research Progress of the Relationship between HPV Molecular Variation and Cervical Disease. 2017, 国外.

4. Hirasawa A, Issei I, Naruto T, Akahane T, Yamagami W, Nomura H, Masuda K, Susumu N, Tsuda H, Aoki D (口頭). The contribution of germline pathogenic variants of cancer susceptibility genes for primary ovarian, fallopian tube, and peritoneal cancers in Japanese. AACR 2017 Addressing Critical Questions in Ovarian Cancer Research and Treatment. 2017, 国外.
5. Nanki Y, Hirasawa A, Nomura H, Okubo A, Itoh M, Akahane T, Chiyoda T, Kataoka F, Tominaga E, Aoki D. (口頭). Ascites-derived and tissue-derived ovarian cancer cell primary 3D cultures aimed for personalized medicine. AACR 2017 Addressing Critical Questions in Ovarian Cancer Research and Treatment. 2017, 国外.
6. Yoshihama T, Hirasawa A, Nomura H, Akahane T, Nanki Y, Yamagami W, Kataoka F, Tominaga E, Susumu N, Mushiroda T, Aoki D (口頭). *UGT1A1* polymorphism may be a prognostic indicator of stage I ovarian clear cell carcinoma patients treated with irinotecan. 15th International Congress of Therapeutic Drug Monitoring and Clinical Toxicology. 2017, 国内.
7. Yokota M, Hirasawa A, Kazuya K, Akahane T, Sakai K, Makabe T, Horiba Y, Yamagami W, Ogawa M, Iwata T, Yanamoto S, Deshimaru R, Banno K, Susumu N, Aoki D (口頭). Polymorphisms of the genes *ESR1*, *UGT2B17*, and *UGT1A1* associated with estrogen metabolism are not associated with osteoporosis in Japanese women after artificial menopause. 6th Scientific Meeting of the Asia Pacific Menopause Federation. 2017, 国外.
8. Sugiyama S, Hirasawa A, Yoshihara K, Sekine M, Enomoto T, Aoki D (口頭). Clinical trials of the Japanese Gynecologic Oncology Group (JGOG) and JGOG/ToMMo biobank will facilitate precision medicine for gynecologic malignancies. The 3rd Taiwan-Japan academic research organization workshop. 2017, 国内.

9. Hirasawa A, Imoto I, Naruto T, Akahane T, Yamagami W, Susumu N, Tsuda H, Aoki D (口頭). The contribution of deleterious germ-line mutations of susceptibility genes to ovarian, fallopian tube, and peritoneal cancers in Japanese. AACR Annual Meeting 2017. 2017, 国外.

〔図書〕(計 0件)

〔産業財産権〕

出願状況(計 0件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
出願年月日：
国内外の別：

取得状況(計 0件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
取得年月日：
国内外の別：

〔その他〕

ホームページ等

<http://www.obgy.med.keio.ac.jp/research/05gy1.php>

6. 研究組織

(1)研究代表者

富永 英一郎 (TOMINAGA, Eichirou)
慶應義塾大学・医学部(信濃町)・講師
研究者番号：80276328

(2)研究分担者

平沢 晃 (HIRASAWA, Akira)
慶應義塾大学・医学部(信濃町)・講師
研究者番号：90296658

赤羽 智子 (AKAHANE, Tomoko)
慶應義塾大学・医学部(信濃町)・
特任助教
研究者番号：40398699