

令和 5 年 5 月 31 日現在

機関番号：11301

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2019～2022

課題番号：19K09747

研究課題名(和文) 腹膜播種オルガノイドモデルを用いたプラチナ耐性卵巣癌に対する新規治療法の開発

研究課題名(英文) An investigation of novel therapeutic strategies for platinum-resistant ovarian cancer using cancer organoid originated from disseminating ovarian carcinoma

研究代表者

辻 圭太 (TSUJI, Keita)

東北大学・医学系研究科・大学院非常勤講師

研究者番号：10835341

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)：プラチナ製剤は卵巣がん治療の主軸である。本研究では卵巣がん症例の臨床情報や遺伝子情報を統合解析し、プラチナ製剤の感受性を制御する可能性があるタンパク質を抽出した。その中からCHD4と呼ばれるタンパク質に着目し、CHD4の機能を抑制するとプラチナ製剤への感受性が改善することを卵巣がん細胞を用いて証明した。また新規開発されたCHD4阻害剤とプラチナ製剤を併用することで高い腫瘍増殖抑制効果が得られることを確認した。この研究結果を生体内の卵巣がんの状態に近い研究モデルで証明するため、卵巣がん組織からオルガノイドと呼ばれる実験モデルの樹立にも着手し、短期間の培養に成功した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

近年進行再発卵巣がんの治療において維持療法が本格的に導入され予後改善が期待される。しかしながら治療の主軸は依然としてプラチナ製剤を中心とした多剤併用療法であり、プラチナ製剤への治療抵抗性克服は卵巣がん治療における重要な研究課題である。本研究結果はCHD4阻害剤を併用することでプラチナ製剤への感受性を増強することが可能であることを示している。CHD4阻害剤の開発は現状では進んでいないが、本研究成果はCHD4阻害剤開発の重要性を示す意味でも意義があるものと考えられる。

研究成果の概要(英文)：Platinum-based chemotherapy is the key for the treatment of ovarian cancer.

In this study, we analyzed the publicly available database that involve both clinical and genomic information to find candidate molecules that regulate platinum sensitivity in ovarian cancer. Among these, we focused on a chromodomain helicase DNA-binding protein 4 (CHD4). We found that the functional inhibition of CHD4 sensitizes ovarian cancer cells to platinum agents by the experiments with ovarian cancer cell lines. Furthermore, we demonstrated the synergistic interaction between platinum agents and the first-in class CHD4 inhibitor.

To further validate the influence of the CHD4 inhibition on platinum sensitivity, we have started culturing surgically-removed ovarian cancer tissues to develop cancer organoids which can reproduce drug sensitivity of the original ovarian cancer. The optimization for long-term maintenance of organoids is ongoing.

研究分野：婦人科癌

キーワード：卵巣癌 白金製剤 治療抵抗性

様式 C-19、F-19-1、Z-19（共通）

1. 研究開始当初の背景

婦人科悪性腫瘍の中でも卵巣癌は死亡率が高く予後不良な疾患である。ベバシズマブ、PARP 阻害剤などの分子標的治療薬による維持療法の登場で無増悪生存期間の延長が期待できるようになったが、現在もプラチナ製剤への感受性が最大の予後規定因子である。プラチナ製剤耐性を克服する治療標的分子の探索については多数基礎研究報告があるが、いずれも臨床応用へは至っていない。既存の卵巣がん細胞株を用いた研究が実臨床の腫瘍病態を正しく反映していない可能性が示唆されている。

がんオルガノイドは患者腫瘍組織から確立した3次元培養モデルであり、細胞株化した卵巣癌細胞の2次元培養と異なり腫瘍を構成するがん細胞の多様性や立体的な組織学的形態を再現可能な臨床環境に近い実験モデルである。がんオルガノイドを用いた橋渡し研究による新規治療開発が期待されており、婦人科腫瘍領域においてもオルガノイド樹立に関する研究が複数報告されている。

加えて The Cancer Genome Atlas (TCGA) プロジェクトをはじめ臨床情報が付随したオミックス情報が公開されるようになり、*in silico* 解析から実臨床に即した新規治療標的に関する研究仮説を立ち上げることが十分可能となった。

2. 研究の目的

本研究はプラチナ製剤抵抗性卵巣がんに関心をもち、臨床情報を伴うオミックス情報解析や患者由来組織から樹立した卵巣がんオルガノイドを用いた実験を通して卵巣がんのプラチナ製剤感受性を制御する分子機構を解明し、プラチナ製剤抵抗性を克服する新規併用療法を探索することを目的とした。

3. 研究の方法

方法1：TCGA データ解析によるプラチナ感受性制御遺伝子群候補の同定

TCGA 卵巣癌データベースから臨床情報、ゲノム解析情報、RNA 発現情報がすべて参照可能な症例を選択し、プラチナ感受性や全生存期間と遺伝子発現の間に相関のある遺伝子群を抽出し、評価を行なった。

方法2：卵巣癌細胞を用いた検証実験

方法1で同定した遺伝子に着目し、遺伝子発現調節によるプラチナ製剤感受性の評価やその感受性制御機構について卵巣がん細胞を用いた実験系や自施設卵巣癌症例の腫瘍組織解析により検証した。

方法3：併用療法候補薬剤の探索及び評価

方法1、2で検証した治療標的分子の機能を阻害する分子を探索し、その効果を細胞実験モデルで検証した。

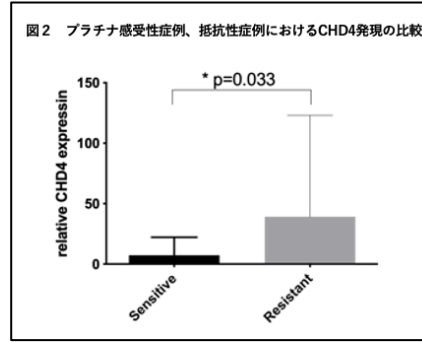
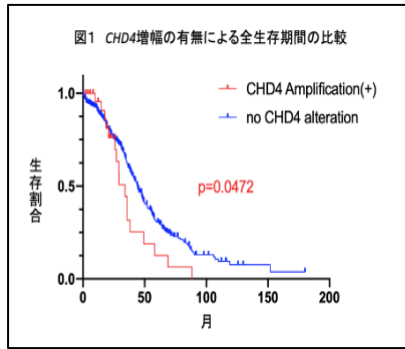
方法4：卵巣高異型度漿液性癌オルガノイドの作成

卵巣がんの中で最も高頻度に見られる組織型である高異型度漿液性癌症例を中心に、書面による説明を行い、同意が得られた患者からの生検/手術症例を対象に卵巣癌オルガノイドの作成を試みた。

4. 研究成果

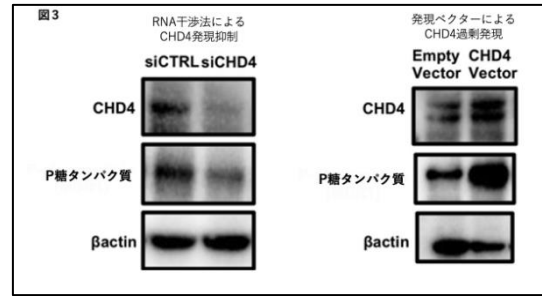
- (1) TCGA データ解析結果によるプラチナ製剤感受性制御に関わる分子の抽出、及び自施設症例における臨床データと RNA 発現解析による検証

2011年にTCGAにより公開されたゲノム情報を含む卵巣漿液性癌568症例のうち、RNA発現情報に加えて全生存期間ともに参照可能な症例は485例あり、さらにプラチナ製剤感受性情報も登録された症例は287例あった¹。遺伝子発現や遺伝子増幅に着目して解析したところ、予備的検証で同定していたLIG4などヌクレオチド除去修復遺伝子群を含め、DNA修復に関わる遺伝子群の発現がプラチナ製剤の感受性や患者予後に関与している可能性が示唆された。また、別の遺伝子群としてエピゲノムを制御する遺伝子の中にもプラチナ感受性に関与する可能性がある遺伝子が含まれていることを明らかとした。特に chromodomain helicase DNA-binding protein 4 (CHD4) の遺伝子増幅がみられる症例では増幅のない症例と比較し有意に予後不良であることが示された。(図1)³。自施設における卵巣癌症例からRNAを抽出しプラチナ製剤抵抗性、感受性に分けてCHD4の発現を比較検証したところ、プラチナ製剤抵抗性を示す症例でCHD4の発現が有意に高いことが明らかとなった(図2)³。このことから、CHD4を標的とした分子標的治療を併用することによりプラチナ製剤感受性を改善できる可能性が示された。



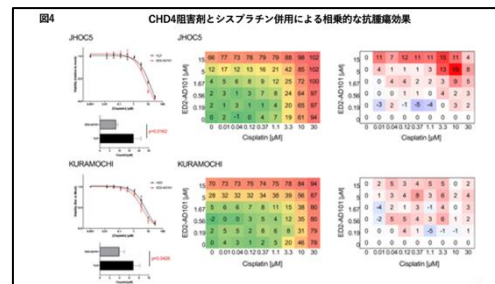
(2) CHD4 がプラチナ製剤感受性を制御する機構の解明

CHD4 を治療標的候補分子として、複数の卵巣癌細胞を用いてプラチナ製剤感受性を制御する機構を探索した。はじめに、RNA 干渉法を用いて *CHD4* の発現を抑制することにより代表的なプラチナ製剤であるシスプラチンへの感受性が高くなることを容量反応曲線で確認した。多剤排出トランスポーターに着目し *CHD4* の発現抑制との関連を探索したところ、*CHD4* は P 糖タンパク質をコードする遺伝子である Multi Drug Resistance 1 (*MDR1*) を転写の段階で正に制御していることが示された (図 3)³。すなわち RNA 干渉法で *CHD4* の発現を抑制すると P 糖タンパク質の発現も低下し、逆に発現プラスミドを用いて *CHD4* 過剰発現を誘導すると P 糖タンパク質の発現も増強した。P 糖タンパク質はシスプラチンの細胞外排出に関わる主要な多剤排出トランスポーターの一つであり、*CHD4* が P 糖タンパク質発現制御を通してシスプラチン感受性に関与することが明らかとなった。



(3) CHD4 阻害剤とシスプラチン併用療法に関する検証

ED2-AD101 はクリーブランド大学の研究者 Sauntharajah 博士らが同定、開発した *CHD4* の機能阻害作用を有する低分子化合物である²。卵巣癌細胞に ED2-AD101 とシスプラチンを同時に投与し、ブリス独立性モデルを用いて ED2-AD101 とシスプラチンの相乗的な腫瘍増殖抑制効果について検討した。各薬剤の単剤投与と比較して、2 剤を併用することで相乗的な腫瘍増殖抑制効果が得られることを異なる組織型に由来する複数の卵巣癌細胞で明らかとした (図 4)³。



(4) 卵巣癌オルガノイド樹立条件の最適化

上記研究で得られた結果をより臨床に近い実験系で実証するため、卵巣癌オルガノイドの樹立を試みた。既報のプロトコルを参照に培地に加える増殖因子の種類、濃度についての条件検討を行い、オルガノイドの初代培養に成功した。およそ 1 ヶ月までの培養が可能であったが継代を経た長期維持培養には今後も継続して条件の最適化を図る必要な状況である。本研究期間内にオルガノイドを用いた網羅的探索や *CHD4* 阻害剤とプラチナ製剤併用療法の有効性の検証には至らなかった。オルガノイドの継続維持、実験応用については今後も別の研究課題と連動して進めていく方針である。

尚、本報告書の図表は引用文献 3 より一部改変して使用した。

参考文献

1. Cancer Genome Atlas Research Network. Integrated genomic analyses of ovarian carcinoma. *Nature*. 2011; 474: 609-615.
2. Kishtagari A, Ng KP, Jarman C, Tiwari AD, Phillips JG, Schuerger C, et al. A First-in-Class Inhibitor of ISWI-Mediated (ATP-Dependent) Transcription

Repression Releases Terminal-Differentiation in AML Cells While Sparing Normal Hematopoiesis. *Blood*. 2018; 132: 216

3. Oyama Y, Shigeta S, Tokunaga H, Tsuji K, Ishibashi M, Shibuya Y, et al. CHD4 regulates platinum sensitivity through MDR1 expression in ovarian cancer: A potential role of CHD4 inhibition as a combination therapy with platinum agents. *PLoS ONE*. 2021; 16:e0251079.

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計1件（うち査読付論文 1件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 1件）

1. 著者名 Oyama Yoshiko, Shigeta Shogo, Tokunaga Hideki, Tsuji Keita, Ishibashi Masumi, Shibuya Yusuke, Shimada Muneaki, Yasuda Jun, Yaegashi Nobuo	4. 巻 16
2. 論文標題 CHD4 regulates platinum sensitivity through MDR1 expression in ovarian cancer: A potential role of CHD4 inhibition as a combination therapy with platinum agents	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 PLOS ONE	6. 最初と最後の頁 e0251079
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1371/journal.pone.0251079	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1件（うち招待講演 0件/うち国際学会 1件）

1. 発表者名 Yoshiko Oyama, Shigeta Shogo, Keita Tsuji, Muneaki Shimada, Nobuo Yaegashi
2. 発表標題 Functional analysis of ZFH4 as a novel therapeutic target in ovarian cancer
3. 学会等名 American Association for cancer research Annual Meeting 2020（国際学会）
4. 発表年 2020年

〔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
研究分担者	島田 宗昭 (SHIMADA Muneaki) (40362892)	東北大学・未来型医療創成センター・教授 (11301)	
研究分担者	徳永 英樹 (TOKUNAGA Hideki) (30595559)	東北大学・医学系研究科・准教授 (11301)	
研究分担者	重田 昌吾 (SHIGETA Shogo) (90842633)	東北大学・大学病院・講師 (11301)	

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
---------	---------