

科学研究費助成事業 研究成果報告書

令和 5 年 5 月 11 日現在

機関番号：34401

研究種目：基盤研究(C)（一般）

研究期間：2020～2022

課題番号：20K09659

研究課題名（和文）3次元オルガノイド培養を用いた難治性卵巣癌の個別化医療の構築

研究課題名（英文）Establishment of personalized medicine for refractory ovarian cancer using 3D organoid culture

研究代表者

大道 正英（Ohmichi, Masahide）

大阪医科薬科大学・医学部・教授

研究者番号：10283764

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,300,000円

研究成果の概要（和文）：卵巣癌手術検体のFFPE切片を用いて、抗CD24抗体による免疫組織染色をおこなった。CD24陽性率は漿液性癌で特に高率であった。卵巣癌オルガノイドの作製にあたり、様々なサイトカインを添加し、培養液の確立を試みた。FGF-2およびEGF、Prostaglandin E2等を添加した培養液にて、オルガノイド作製の成功率が良好であった。手術検体のFFPE切片とオルガノイド培養組織から採取したFFPE切片の両者にH&E染色を行い、腫瘍の性質が維持・再現されていることを確認した。手術検体でCD24陽性であった症例は、オルガノイドにてCD24発現が確認できたが、発現強度は手術検体よりも弱い傾向にあった。

研究成果の学術的意義や社会的意義

標準的治療に抵抗性を示す難治性卵巣癌では、新たな治療薬を見出すことが求められるが、治療薬の効果を検証するには、既存の卵巣癌細胞株を用いたin vitroの検討では、患者の卵巣癌の性質と同一であるとはいえず、また、2次元での細胞培養では、実際の体内での3次元の生着環境とは異なるという欠点がある。しかし、in vitroの検討を経ずにin vivoでの検討を行うことは動物愛護の観点からも許されることではない。患者の癌組織を用いて行う3次元オルガノイド培養が可能となれば、個体レベルの癌モデルをin vitroの実験系で補完・代替することができる点で学術的に意義がある。

研究成果の概要（英文）：FFPE sections of ovarian cancer surgical specimens were immunohistochemically stained with anti-CD24 antibody. The positive rate was particularly higher in serous carcinomas. We next attempted to establish culture media with various cytokines. Medium containing FGF-2, EGF, and Prostaglandin E2 allowed us to prepare organoids with a higher success rate. H&E staining was performed on both FFPE sections from surgical specimens and FFPE sections from organoid culture tissue to confirm that tumor characteristics were maintained and reproduced. Patients who were CD24 positive in the surgical specimens also showed CD24 expression in the organoids, but the intensity of expression tended to be weaker than in the surgical specimens.

研究分野：婦人科腫瘍

キーワード：卵巣癌 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

卵巣癌は本邦では 2016 年の統計によると 1 年間で約 1 万 3 千人が罹患し、約 4700 人が死亡している。卵巣癌は大半が腹腔内転移を伴う進行癌の状態で見られるため、5 年生存率は 30% 弱と低い。また、卵巣癌は当初抗癌剤に感受性を示しているが、次第に耐性を示し再発率が高いことも予後不良の一因となっている。近年、分子標的治療薬が無増悪生存期間(PFS)を延長させることが示され臨床にて用いられるようになったが、BRCA 変異の有無により PFS 延長効果に差があることや、消化管穿孔等の副作用の問題があり、進行卵巣癌に対する新たな治療の開発が急務である。

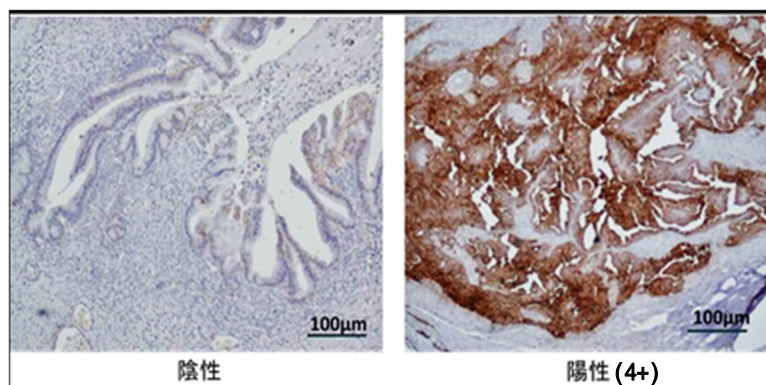
癌幹細胞(CSCs: Cancer Stem Cells)は、強い自己複製能と腫瘍形成能を有する癌細胞で、様々な抗癌剤や放射線療法に抵抗を示し、癌再発の原因細胞であると考えられている。CSCs は上皮間葉形態転換(EMT: Epithelial-Mesenchymal Transition)を起こし、浸潤・転移能を獲得することも報告されており、いかに CSCs を制御するかが癌治療において鍵となりうる。我々は、これまでに CSCs マーカーの一つである CD24 が、卵巣癌において、漿液性癌や SSPC で特に陽性率が高く、卵巣癌全体での再発率も CD24 陽性癌に多く、予後不良因子であることを報告している。このような術後化学療法前の時点で予後不良が予想される症例において個別に適切な治療法を見出すことが難治性卵巣癌患者において極めて重要になる。

2. 研究の目的

これまで卵巣癌の研究においては、卵巣癌細胞株を培養して行う実験が、あるいは生体内に近い環境で行う方法としては、それらの卵巣癌細胞株を移植したマウスモデル、あるいは患者由来癌組織をマウスに移植して作製した PDX(Patient-Derived Xenograft)モデルが使用されてきた。しかしながら、細胞株培養による研究では 2 次元培養での環境に限られることや、樹立された細胞株でしか検討できないため臨床腫瘍の多様性を有していないという問題点があり、また、PDX では 3 次元での培養で癌微小環境は臨床腫瘍と類似しているが、個々の患者に対し様々な候補薬剤の感受性を探索するには膨大な実験動物が必要となる等の問題があった。そこで本研究ではこれらの諸問題を克服すべく、癌患者組織由来の細胞を *in vitro* で 3 次元培養し患者ごとに卵巣癌オルガノイドを作製し、これらを用いて既存薬ライブラリーによる薬剤感受性スクリーニングを行うことで、網羅的でスループットの高い個別化医療を目指すことを目的とした。さらに、卵巣癌の予後不良因子のマーカーとしてこれまでに我々が見出した CD24 陽性患者において、患者ごとに個別に卵巣癌オルガノイドを作製することにより、標準的治療では高確率で再発する患者に、より適確な治療を提供できる方法を開発したいと考えた。

3. 研究の方法

インフォームドコンセントのもと同意を得た卵巣癌患者の手術検体の一部を使用して、卵巣癌オルガノイドを作製する。検体の一部はホルマリン固定パラフィン包埋 (FFPE) 切片を作製し抗 CD24 抗体による免疫組織染色を行い、CD24 発現強度を (0, 1+, 2+, 3+) の 4 段階でスコア化し、細胞膜あるいは細胞質の 50%以上が 2+以上の強度で発現が認められたものを、CD24 陽性と判定する(右図)。



明視野観察法による光学顕微鏡での観察を行い、安定的な 3 次元オルガノイド培養が確認されれば、FFPE 標本作製する。手術検体の FFPE 切片とオルガノイド培養組織から採取した FFPE 切片の両者を H&E 染色し、性質が維持・再現されていることを組織学的に確認する。また、CD24 の発現強度も保持されているか否かを、免疫組織染色にて確認を行う。さらに、卵巣癌オルガノイドおよび手術検体の FFPE 標本から genomicDNA を抽出し、次世代シーケンサーにて網羅的な遺伝子発現解析を行う。特に、癌関連遺伝子についてのターゲットシーケンスを行う。しかるのち、変異を有する腫瘍細胞の割合が 10%以上の、一塩基バリエーション(single-nucleotide variants: SNVs)を有する遺伝子を抽出し、卵巣癌オルガノイドと手術検体における相違の有無を検証し、性質が維持・再現されていることを再確認する。

4．研究成果

同意を得た卵巣癌手術検体の FFPE 切片を用いて、抗 CD24 抗体による免疫組織染色をおこなった。CD24 陽性率は漿液性癌で 85%、粘液性癌で 31%、類内膜癌で 54%、明細胞癌で 60%と、漿液性癌で特に高率であった。

次に、卵巣癌オルガノイドの作製に着手した。作製には、腸オルガノイドの作製法を参考にした。また、様々なサイトカインを添加し、培養液の確立を試みた。FGF-2 および EGF、Prostaglandin E2 等を添加した培養液にて、オルガノイド作製の成功率は約 80%とすることができた。オルガノイド作製の成功率と組織型との間には特に関連は見られなかった。

オルガノイドから FFPE 切片を作製し、手術検体の FFPE 切片とオルガノイド培養組織から採取した FFPE 切片の両者に H&E 染色をおこない、性質が維持・再現されていることを 15 種類のオルガノイドにて確認した。手術検体とオルガノイドの CD24 強度の相関性を免疫組織染色にて観察したところ、手術検体で CD24 陽性であった 10 例は、オルガノイドにても CD24 発現が確認でき、一方、手術検体で CD24 陰性であった 5 例では、オルガノイドにおいても CD24 は陰性であった。このことから、CD24 の発現はオルガノイドにても維持されていることが確認できた。しかし、CD24 発現強度は、手術検体よりもすべて弱い傾向にあった。

続いて、手術検体およびオルガノイド標本における遺伝子発現解析の比較検討を行うため、それぞれから DNA、RNA を抽出した。現在、これらに対し、次世代シーケンサーを用いた omics 解析を行っているところである。

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
研究分担者	林 正美 (Hayashi Masami) (00551748)	大阪医科薬科大学・医学部・准教授 (34401)	
研究分担者	田中 良道 (Tanaka Yoshimichi) (10625502)	大阪医科薬科大学・医学部・講師 (34401)	
研究分担者	恒遠 啓示 (Tsunetoh Satoshi) (70388255)	大阪医科薬科大学・医学部・講師 (34401)	
研究分担者	佐々木 浩 (Sasaki Hiroshi) (80432491)	大阪医科薬科大学・医学部・講師 (34401)	
研究分担者	古形 祐平 (Kogata Yuhei) (80829953)	大阪医科薬科大学・医学部・助教 (34401)	
研究分担者	田中 智人 (Tanaka Tomohito) (90411363)	大阪医科薬科大学・医学部・講師 (34401)	

6. 研究組織（つづき）

	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	藤原 聡枝 (Fujiwara Satoe) (90707960)	大阪医科薬科大学・医学部・講師 (34401)	

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