

令和 5 年 4 月 26 日現在

機関番号：12601

研究種目：若手研究

研究期間：2020～2022

課題番号：20K18157

研究課題名（和文）子宮頸部胃型腺癌におけるオルガノイド培養の確立と治療方法の開発

研究課題名（英文）Establishment of organoid culture and development of treatment strategies in gastric-type adenocarcinoma of the cervix

研究代表者

田口 歩 (Taguchi, Ayumi)

東京大学・医学部附属病院・届出研究員

研究者番号：60756782

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,200,000円

研究成果の概要（和文）：子宮頸部扁平上皮癌2例、腺扁平上皮癌3例、小細胞癌1例でオルガノイド培養の樹立に成功した。この中で難治性の希少癌であるHPV18型陽性小細胞癌を対象に、治療標的候補の探索のため全エクソーム解析(WES)とRNA-seq解析を実施した。WES解析からはKRAS p.G12Dの病的変異を同定した。また、RNA-seq解析の結果、HPV18ゲノムは8番染色体(8q24.21)に組み込まれており、その下流のMYC遺伝子の高発現を伴うことを確認した。KRAS変異とMYC高発現を治療標的とし、オルガノイド培養を用いて薬剤感受性試験を行ったところ、KRAS経路阻害剤のトラメチニブで高い抗腫瘍効果を認めた。

研究成果の学術的意義や社会的意義

子宮頸癌の中で胃型腺癌や小細胞癌は希少癌でかつ難治性癌であり、その治療法の確立は喫緊の課題であった。本研究では、子宮頸部小細胞癌のゲノム解析、トランスクリプトーム解析から治療標的の絞り込みを行い、さらにオルガノイド培養を用いることで薬剤感受性試験を行うことができた。治療標的の同定と患者由来モデルを用いた薬剤感受性試験の一連の流れの確立は今後のがん医療における個別化療法の基盤となっていくことが期待される。

研究成果の概要（英文）：We have established organoid cultures in one case of squamous cell carcinoma of the cervix, three cases of adenosquamous carcinoma, and one case of small cell carcinoma. We performed whole exome sequencing (WES) and RNA-sequencing analysis of HPV18-positive small cell carcinoma, a rare and refractory cancer, to search for potential therapeutic targets. WES analysis identified a pathogenic variant in KRAS p.G12D. RNA-seq analysis also confirmed that the HPV18 genome was integrated into chromosome 8 (8q24.21), accompanied by high expression of the downstream MYC gene. Drug sensitivity testing using organoid cultures with the KRAS mutation and high MYC expression as therapeutic targets showed high antitumor efficacy with trametinib, a KRAS pathway inhibitor.

研究分野：婦人科腫瘍

キーワード：HPV 子宮頸癌 オルガノイド培養

## 1. 研究開始当初の背景

子宮頸部扁平上皮癌は子宮頸癌全体の約 70% を占め、ほぼ全てが HPV 感染に由来すると考えられている。子宮頸癌の組織型の中で約 25% は腺癌であり、腺癌は扁平上皮癌に比べて治療抵抗性で予後不良である。子宮頸部腺癌は HPV 由来の癌と HPV 非関連癌に分けられる。特に HPV 非関連癌の胃型腺癌は子宮頸癌の中では約 5% と頻度は高くないが、進行がんで見つかることが多く、治療抵抗性で予後不良である。また希少組織型の中では、HPV 関連の小細胞癌も予後不良の癌であり早期診断や治療法の確立が課題となっている。

希少かつ難治癌の治療法の確立には、一般的にその発癌機序の解明と患者検体を用いた患者由来モデルの樹立が重要となる。患者検体を用いた患者由来モデルについては、近年オルガノイド培養が普及し、生体内での腫瘍の特性を維持した状態で薬剤感受性試験を行うことが可能となってきた。胃型腺癌や小細胞癌などの子宮頸部の希少組織型においても、オルガノイド培養を行うことで事前に各薬剤の効果を検討することが可能となる。ゲノム解析やトランスクリプトーム解析により推定される発癌機序に即した薬剤の治療効果検討が難治性希少癌治療においてブレークスルーとなる可能性がある。

## 2. 研究の目的

本研究は、難治性子宮頸癌の治療法の探索と最適化を目的として、患者由来子宮頸癌検体のオルガノイド培養を樹立し、プレジジョンメディシンのワークフロー構築を目指した。特に発癌機序が解明されていない子宮頸部胃型腺癌や子宮頸部小細胞癌の治療法の開発を目指した。

## 3. 研究の方法

### 3 - 1. 子宮頸癌オルガノイド培養の樹立

東京大学医学部附属病院で手術を行った子宮頸癌患者 18 症例を対象にオルガノイド培養を行った。オルガノイド培養は Modified MBOC 法 (Maru, Cancers, 2020) を用いて行った。

内訳は子宮頸部腺癌 5 例、扁平上皮 5 例、腺扁平上皮癌 3 例、小細胞癌 3 例、胃型腺癌 2 例であった。

### 3 - 2. 子宮頸部小細胞癌オルガノイド培養を用いた Precision medicine ワークフローの構築

#### ・オルガノイド培養のプロファイリング:

オルガノイド培養の樹立に成功した子宮頸部小細胞癌オルガノイドをもとに検討を行った。まず組織像の確認のため、ヘマトキシリンエオジン(HE)染色と、PAS 染色、小細胞癌マーカーの CD56, シナプトフィジン(SYP)、クロモグラニン A(CHGA)で組織免疫染色を行った。

#### ・オルガノイド培養のゲノム解析:

樹立したオルガノイドと子宮頸癌腫瘍を基に、全エクソン解析を行い、共通する体細胞変異の同定と、治療標的となる変異情報の抽出を行った。

#### ・オルガノイド培養のトランスクリプトーム解析:

子宮頸がんの発癌には、HPV ゲノムのヒトゲノムへの組み込みが重要である。HPV ゲノムの組み込みは HPV 由来のがん遺伝子である E6・E7 の恒常的発現の他、組み込み部位周辺のがん遺伝子の発現上昇につながる事が知られている。このため樹立したオルガノイド培養と子宮頸癌腫瘍を基に、RNA-sequence 解析を行い、HPV 発現パターンの確認と HPV-ヒトキメラ RNA を

検出することで HPV インテグレーション部位の同定を行った。さらに HPV インテグレーション部位周囲のがん遺伝子発現を定量化した。

#### ・オルガノイド培養に基づく薬剤感受性試験

ゲノム解析とトランスクリプトーム解析から治療標的となる候補遺伝子を選定し、樹立したオルガノイド培養を用いて薬剤感受性試験を行った。

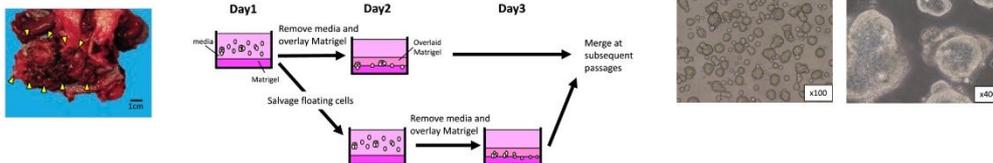
#### ・マウスゼノグラフトモデルの作成と薬剤感受性試験

オルガノイドをマウスに移植し皮下腫瘍モデルを作成した。オルガノイド培養を用いた薬剤感受性試験で効果を有した薬剤を投与し、腫瘍形成に及ぼす影響を検討した。

## 4. 研究成果

### 4-1. 子宮頸癌オルガノイド培養の樹立

オルガノイド培養を試みた 18 検体のうち、3 継代以上の樹立をおこなえたのは 6 例であった。その内訳は、扁平上皮癌が 2 例、腺扁平上皮癌が 3 例、小細胞癌が 1 例であった。胃型腺癌はオルガノイド培養の樹立にはいたらなかった。このため、本研究では増殖効率の最もよい、HPV18 型陽性小細胞癌オルガノイド(下図\*)について以下の実験を行った。



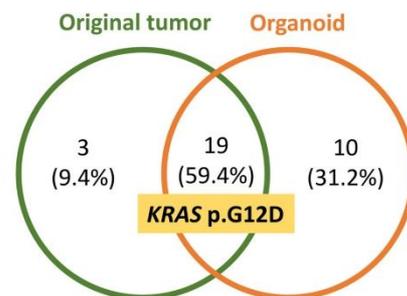
### 4-2. 子宮頸部小細胞癌オルガノイド培養を用いた Precision medicine ワークフローの構築

#### ・オルガノイド培養のプロファイリング:

HE 染色による病理学的評価を行ったところ、樹立した小細胞癌オルガノイドは腺腔構造を形成し、細胞内粘液貯留も伴い腺癌構造を呈する細胞集塊を認めた。免疫組織学的検討を行ったところ、小細胞癌オルガノイドは初め CD56、SYP,CHGA といった小細胞癌マーカーの発現を認めたが、継代を重ねると PAS 染色陽性の腺癌成分が主となった。

#### ・オルガノイド培養のゲノム解析:

全エクソン解析の結果、原発腫瘍では 22 個の体細胞変異を、オルガノイドでは 29 個の体細胞変異を認めた。この中で 19 個の体細胞変異は原発腫瘍とオルガノイドで共通していた。治療標的となる体細胞変異としては KRAS の病的変異(KRAS p.G12D)を認めた(右図\*)。また、コピー数解析の結果、5 番染色体(5p12-15.33)と 8 番染色体(8q24.1-24.23)にコピー数増加を認めた。



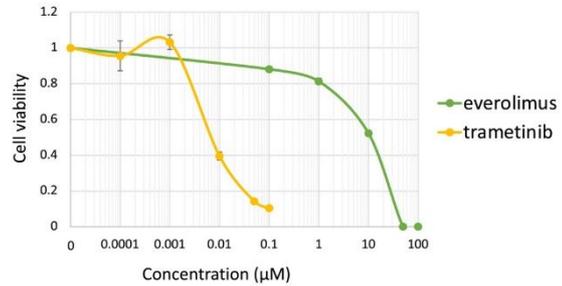
#### ・オルガノイド培養のトランスクリプトーム解析:

樹立した小細胞癌オルガノイドの RNA-sequence 解析によりウイルス・ヒトキメラ RNA 解析を行った。その結果、HPV18 ゲノムは 8 番染色体(8q24.21)に組み込まれていることがわかった。また、組み込み部位の下流にはがん遺伝子である MYC が位置しており、小細胞癌オルガノイドでの MYC の発現上昇を確認した。

#### ・オルガノイド培養に基づく薬剤感受性試験

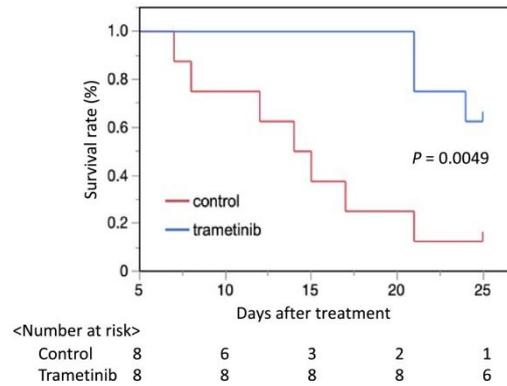
ゲノム解析からは KRAS 変異がトランスクリプトーム解析からは MYC 発現上昇が治療候補として抽出された。KRAS を標的とした治療法としては KRAS の下流に位置する MEK 阻害剤のト

ラメチニブを、MYC 阻害剤としては MYCi975 を用いた。樹立したオルガノイド培養を用いて薬剤感受性試験を行った結果、KRAS を標的としたトラメチニブは  $IC_{50}$  : 6.8 nM と非常に強い抗腫瘍効果を有した(右図\*)。一方、MYC 阻害剤の MYCi975 では、 $IC_{50}$  : 3.7  $\mu$ M であった。



#### ・マウスゼノグラフトモデルの作成と薬剤感受性試験

樹立した小細胞癌オルガノイドをもとにマウスゼノグラフとモデルを作成した。オルガノイドを用いた薬剤感受性試験の結果、トラメチニブの効果が期待できたため、マウスモデルを用いて薬剤感受性試験を行った。その結果、トラメチニブ投与群ではコントロール群に比べて有意な腫瘍増殖抑制効果を認めた(ログランク検定、 $p=0.001$ 、右図\*)。



\*小細胞癌オルガノイドの図の出典 : Kusakabe M, *Cancer Med*, in press doi: 10.1002/cam4.5588

## 5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計10件（うち査読付論文 10件／うち国際共著 0件／うちオープンアクセス 5件）

1. 著者名 Yoshimoto D, Taguchi A, Tanikawa M, Sone K, Shimoi T, Tsuruga T, Oda K, Osuga Y.	4. 巻 48
2. 論文標題 Recurrent cervical cancer with PD-L1 amplification treated with nivolumab: A case enrolled in the BELIEVE trial.	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 J Obstet Gynaecol Res.	6. 最初と最後の頁 2010-2014
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1111/jog.15240.	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 Kusakabe M, Taguchi A, Tanikawa M, Wagatsuma R, Yamazaki M, Tsuchimochi S, Toyohara Y, Kawata A, Baba S, Ueno T, Sone K, Mori-Uchino M, Ikemura M, Matsunaga H, Nagamatsu T, Wada-Hiraike O, Kawazu M, Ushiku T, Takeyama H, Oda K, Kawana K, Mano H, Osuga Y.	4. 巻 114
2. 論文標題 Cells with stem-like properties are associated with the development of HPV18-positive cervical cancer.	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 Cancer Sci.	6. 最初と最後の頁 885-895
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1111/cas.15664.	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 Komura A, Taguchi A, Ikemura M, Nishijima A, Miyamoto Y, Tanikawa M, Sone K, Mori M, Oda K, Osuga Y.	4. 巻 49
2. 論文標題 A case of refractory pelvic squamous cell carcinoma of unknown primary that responded to nivolumab.	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 J Obstet Gynaecol Res.	6. 最初と最後の頁 1300-1304.
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1111/jog.15548.	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 Ishizawa C, Taguchi A, Tanikawa M, Honjo H, Nishijima A, Eguchi S, Miyamoto Y, Sone K, Tsuruga T, Mori M, Osuga Y.	4. 巻 25
2. 論文標題 Effect of pelvic radiotherapy on patients with stage IB-IIA cervical cancer after radical hysterectomy: A single center retrospective study.	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 Oncol Lett.	6. 最初と最後の頁 112-112
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.3892/ol.2023.13698.	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 Sone Kenbun, Kukita Asako, Masui Yuri, Yamada Daisuke, Shinozaki-Ushiku Aya, Kawata Akira, Taguchi Ayumi, Miyamoto Yuichiro, Tanikawa Michihiro, Iriyama Takayuki, Mori-Uchino Mayuyo, Tsuruga Tetsushi, Osuga Yutaka	4. 巻 16
2. 論文標題 Recurrent malignant melanoma of the uterine cervix treated with anti-PD-1 antibodies and anti-CTLA-4 antibodies: A case report	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Molecular and Clinical Oncology	6. 最初と最後の頁 1-6
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3892/mco.2022.2496	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 Onuki Mamiko, Y, Motohara Takeshi, Watari Hidemichi, Nakamura Keiichiro, Ueda Akihiko, Tasaka Nobutaka, Ishikawa Mitsuya, Hirashima Yasuyuki, Kudaka Wataru, Taguchi Ayumi, Iwata Takashi, Takahashi Fumiaki, Kukimoto Iwao, Yoshikawa Hiroyuki, Yaegashi Nobuo, Matsumoto Koji, for the MINT Study Group	4. 巻 113
2. 論文標題 Human papillomavirus vaccine effectiveness by age at first vaccination among Japanese women	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Cancer Science	6. 最初と最後の頁 1428 ~ 1434
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1111/cas.15270	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 Ikesu Ryo, Taguchi Ayumi, Hara Konan, Kawana Kei, Tsuruga Tetsushi, Tomio Jun, Osuga Yutaka	4. 巻 11
2. 論文標題 Prognosis of high risk human papillomavirus related cervical lesions: A hidden Markov model analysis of a single center cohort in Japan	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Cancer Medicine	6. 最初と最後の頁 664 ~ 675
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1002/cam4.4470	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 Sone Kenbun, Inoue Futaba, Taguchi Ayumi, Hinata Munetoshi, Ikemura Masako, Miyamoto Yuichiro, Michihiro Tanikawa, Ohno Tamami, Iriyama Takayuki, Mori Uchino Mayuyo, Tsuruga Tetsushi, Mishima Misako, Osuga Yutaka	4. 巻 9
2. 論文標題 A case of difficult to diagnose non invasive papillary squamous cell carcinoma of the uterine cervix infected with human papilloma virus 6: A diagnostic pitfall	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Clinical Case Reports	6. 最初と最後の頁 e04905
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1002/ccr3.4905	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 Nara Katsuhiko, Taguchi Ayumi, Tojima Yuri, Miyamoto Yuichiro, Tanikawa Michihiro, Sone Kenbun, Mori Mayuyo, Tsuruga Tetsushi, Yamamoto Takehito, Takenaka Ryosuke, Takada Tappei, Osuga Yutaka, Suzuki Hiroshi	4. 巻 26
2. 論文標題 History of whole pelvis plus para-aortic radiation is a risk factor associated with febrile neutropenia during chemotherapy for recurrent cervical cancer	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 International Journal of Clinical Oncology	6. 最初と最後の頁 1759 ~ 1766
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1007/s10147-021-01950-8	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 Taguchi Ayumi, Nagasaka Kazunori, Plessy Charles, Nakamura Hiroe, Kawata Yoshiko, Kato Sachi, Hashimoto Kosuke, Nagamatsu Takeshi, Oda Katsutoshi, Kukimoto Iwao, Kawana Kei, Carninci Piero, Osuga Yutaka, Fujii Tomoyuki	4. 巻 10
2. 論文標題 Use of Cap Analysis Gene Expression to detect human papillomavirus promoter activity patterns at different disease stages	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Scientific Reports	6. 最初と最後の頁 17991-17991
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1038/s41598-020-75133-2	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 -

〔学会発表〕 計4件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 日下部美佐子、田口歩、谷川道洋、土持早希、豊原佑典、河田啓、曾根献文、森蘭代、鶴賀哲史、織田克利、川名敬、大須賀穠
2. 発表標題 Establishment of organoid culture from HPV18-positive small cell carcinoma of the uterine cervix: Identification of two therapeutic targets for precision medicine
3. 学会等名 第74回日本産科婦人科学会学術講演会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 田口歩
2. 発表標題 マルチオミックス解析に基づくHPV 関連子宮頸癌の個別化医療を目指した基盤研究
3. 学会等名 第64回日本婦人科腫瘍学会学術講演会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 日下部美佐子 田口歩 谷川道洋 星大輔 豊原佑典 河田啓 曾根献文 柊元巖 織田克利 筆宝義隆 大須賀穰
2. 発表標題 HPV18型陽性子宮頸部小細胞癌のオルガノイド樹立 -オルガノイドが切り拓く希少癌個別化医療
3. 学会等名 第80回 日本癌学会学術集会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 日下部美佐子 田口歩 松永浩子 谷川道洋 山崎美輝 我妻竜太 豊原佑典 馬場聡 河田啓 曾根献文 森繭代 鶴賀哲史 織田克利 川名敬 竹山春子 大須賀穰
2. 発表標題 腫瘍内組織不均一性解析に基づく、HPV18型の発癌機構と分化調整機構の検討
3. 学会等名 第63回 日本婦人科腫瘍学会学術集会
4. 発表年 2021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
---------------------------	-----------------------	----

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