

令和 6 年 5 月 14 日現在

機関番号：23903

研究種目：若手研究

研究期間：2021～2023

課題番号：21K16793

研究課題名（和文）オルガノイド培養を駆使した卵巢脱分化癌の発生、進展機構の解明

研究課題名（英文）Elucidation of the mechanism of occurrence and progression of ovarian dedifferentiated cancer using organoid culture

研究代表者

石橋 朋佳（Ishibashi, Tomoka）

名古屋市立大学・医薬学総合研究院（医学）・助教

研究者番号：40643648

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,500,000円

研究成果の概要（和文）：卵巢脱分化癌はアグレッシブな経過をたどる非常に予後不良な疾患である。子宮脱分化型類内膜癌に関しては、従来の化学療法に加え免疫チェックポイント阻害薬を併用することで治療効果が期待できる可能性を報告した（Ono R, Ishibashi T et al., Int J Mol Sci. 2019）。また近年3次元細胞培養が注目を集めており、正常な子宮内膜腺・単一腺由来のスフェロイドの作成には成功した（Sato S, Ishibashi T et al., Cancer Sci. 2023）。しかし卵巢脱分化癌はまれであり、オルガノイドモデルの作成し詳細な検討が次の目標である。

研究成果の学術的意義や社会的意義

卵巢脱分化癌に関しては症例報告が散見されるのみで、網羅的遺伝子解析やオルガノイドに成功したという報告はない。子宮脱分化型類内膜癌での免疫チェックポイント阻害薬の効果について報告しており、婦人科がんにおける脱分化癌の研究に関しては、本邦では当研究室がリードしている。また近年in vivoの生理学的環境により近い3次元細胞培養が注目を集めている。3次元細胞培養下での発現プロファイルは2次元培養環境の場合と比較して、生理学的な重要性が高いと考えられている。オルガノイドモデルを用いた卵巢脱分化癌発生機構の検討は世界でも報告されておらず、今後の卵巢脱分化癌の研究基盤となる。

研究成果の概要（英文）：Ovarian dedifferentiated cancer is a disease with aggressive and very poor prognosis. Regarding uterine dedifferentiated endometrioid cancer, we reported that the combination of immune checkpoint inhibitors in addition to conventional chemotherapy may have a therapeutic effect (Ono R, Ishibashi T et al., Int J Mol Sci. 2019).

In recent years, 3D cell culture has attracted attention, and we have succeeded in creating spheroid derived from normal endometrial glands and single glands (Sato S, Ishibashi T et al., Cancer Sci. 2023). However, ovarian dedifferentiated cancer is rare, and the next goal is to create an organoid model and research it in detail.

研究分野：婦人科がん

キーワード：オルガノイド 卵巢脱分化癌

## 様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

### 1. 研究開始当初の背景

卵巣脱分化癌 (Ovarian dedifferentiated carcinoma: ODC) は高分化癌と未分化癌が混在する腫瘍で進行が早く、アグレッシブな経過をたどる非常に予後不良な疾患である。卵巣脱分化癌の症例報告はあるが、認知度は低く、その頻度や実態は不明である。高分化癌が脱分化し未分化癌に変化していくと考えられているが、発癌進展の分子メカニズムは全く不明である。未分化癌を伴う高分化型類内膜癌は子宮内膜癌で初めて報告された (Silva EG, et al., Int J Gynecol Pathol. 2006)。子宮脱分化型類内膜癌は 2014 年の WHO 改定で新たに分類されたが、卵巣脱分化癌の疾患概念については、文献レベルでは徐々に確立されつつある段階で、未だ認知度が低く、類似した組織型を呈する他の腫瘍と誤って診断されることも多い。診断バイオマーカーについても未知の点が多い。また、発生頻度、臨床病理学的、予後に関して詳細な検討は世界でもなされておらず、まったく不明である。さらに、その発生に関わる分子生物学的解析はなく、発生、脱分化の分子メカニズムは不明であり、治療標的も不明である。近年、我々は若年発生の抗がん剤抵抗性で極めて急激な臨床経過 (術後 1 か月で死亡) をたどった卵巣脱分化癌の 1 症例 (卵巣粘液性癌の脱分化) を経験した。あまりにも急激な臨床経過であったため、WES 解析をおこなったが *p53*、*Kras* 変異以外にはドライバー変異は見られなかった。おそらく、融合遺伝子が存在すると考え、現在 RNA-seq を行い解析中である。このような直接の臨床経験から、卵巣脱分化癌に興味をもち、本研究の着想に至った。

### 2. 研究の目的

卵巣脱分化癌の疾患概念は、症例報告レベルであり、未だ認知度が低い。そのため、これまでに卵巣脱分化癌と診断されずに他の組織型、分化度と診断されていた可能性が高い。卵巣脱分化癌は高分化癌と未分化癌が混在する腫瘍であり、予後が不良といった報告はあるが、症例数が少なく、その発生頻度、臨床病理学的、予後に関する特徴を詳細に解析した報告はない。

さらにその発生、進展、脱分化機構に関わる遺伝子異常に関しては網羅的遺伝子解析が全くなされていない。また、高分化癌から未分化癌への脱分化機構の分子メカニズムに関して、その発生から進展の各段階に関わる遺伝子異常を解析した報告はない。

本研究では、まず、卵巣癌における脱分化癌の発生頻度、臨床病理学的、予後解析を行い、本疾患の臨床的詳細を明らかにすることを目的とした。さらに網羅的遺伝子解析を行うことで、その臨床病理学的特徴、発生進展に関わる遺伝子異常が同定できれば、新たな治療戦略を構築することが可能となり、卵巣脱分化癌の治療成績向上に貢献できる。

また、卵巣脱分化癌発生の分子生物学的機構の解明が遅れている理由の一つに細胞株を含めたモデル細胞が存在しないことが挙げられる。そこで我々は、3次元細胞培養であるオルガノイドに着目した。オルガノイドは組織の複雑な空間的パターンを再現でき、生体内の組織に類似した特性を有していることから、今までの2次元細胞培養と異なり、物理的、分子学的および生理学的に組織と類似した反応が得られる可能性がある。

我々は既に卵巣癌 (High grade serous) のオルガノイドを作成することに成功している。この技術を用い、卵巣脱分化癌組織よりオルガノイドを作成する。オルガノイド由来マウスゼノグラフでは原発巣と同じ組織型を構築できると考えられている。そのため、卵巣脱分化癌オルガノイドのマウス移植実験で、臨床検体と同じような境界明瞭な高分化型腺癌と未分化癌が混在する腫瘍が再現できれば世界で初めての報告となる。さらに、この卵巣脱分化癌オルガノイドは抗がん剤感受性試験や個別化医療の前臨床試験モデルとして使用できる。

### 3. 研究の方法

保存された臨床検体（凍結検体、ホルマリン固定検体）のみならず、卵巣脱分化癌オルガノイドモデルを用いて網羅的遺伝子解析を行うことで、卵巣脱分化癌の発生進展に関わる遺伝子異常がより詳細に明らかとなる。当院および関連病院から過去 20 年間の卵巣癌の標本（約 700 例）をすべて再診断する。そのうち、卵巣脱分化癌と診断可能な症例を明確にする。卵巣脱分化癌の発生頻度、臨床病理学的、予後に関する特徴を統計解析で明確にする。既存の卵巣未分化癌や高異型度漿液性癌と比較し、臨床病理学的因子（患者年齢、臨床進行期、リンパ節転移、手術時の残存腫瘍、抗がん剤感受性等）について比較検討し、卵巣脱分化癌の特徴、予後などを明確にする。

また当院では過去 20 年間の卵巣癌検体（約 300 例）が凍結保存されている。過去 20 年間の卵巣癌標本の再診断で卵巣脱分化癌と診断された症例に関しては、凍結検体から DNA、RNA を抽出する。おそらく 10 数例の卵巣脱分化癌が存在すると予想される。それら卵巣脱分化癌症例を用いて、全エクソンシーケンス（WES）解析、RNA シーケンス（RNAseq）解析を高分化癌成分、未分化癌成分でそれぞれ個別に解析を行う。RNAseq を行うことで融合遺伝子の検索も同時に行える。高分化癌成分、未分化癌成分に共通な遺伝子異常は発生初期に関わるイベントであり、未分化癌成分のみで同定された遺伝子異常は腫瘍の脱分化に関わるイベントと考えている。

次に卵巣癌初回手術時の迅速病理診断で未分化癌部分と高分化癌部分が共存する可能性が示された場合は、手術検体をもちいて術後直ちにオルガノイド培養を開始する。卵巣脱分化癌のオルガノイドが確立されたら、他の組織型（High grade serous、Low grade serous、Clear cell、Endometrioid、Mucinous）のオルガノイドとの抗がん剤感受性の相違について検討する。さらに WES 解析で得られたドライバー変異の情報を基に個別化医療の前臨床モデルとして 3 次元培養下での分子標的薬感受性試験を行い、卵巣脱分化癌の個別化医療を探索する。また、オルガノイドをヌードマウスに移植し担癌マウスを作成し、脱分化癌が再現できるか検討する。

上記卵巣脱分化癌オルガノイドを用いて、発癌過程における糖代謝亢進、乳酸産生増加等の代謝制御機構の変化を TMRM アッセイ（ミトコンドリア機能評価）、NBDG アッセイ（グルコース取り込み評価）にて、他の組織型（High grade serous 等）のオルガノイドと比較し、代謝系の相違を検討し、がん代謝経路阻害の新規治療法を探索する。

### 4. 研究成果

卵巣脱分化癌は高分化癌と未分化癌が混在する腫瘍で進行が早く、非常に予後不良な疾患である。高分化癌が脱分化し未分化癌に変化していくと考えられているが、発癌進展の分子メカニズムは未だ不明である。子宮脱分化型類内膜癌（dedifferentiated endometrial carcinoma: DDEC、Grade 1, 2 の高分化型類内膜癌と未分化癌が混在する腫瘍）に関しては、当院および関連病院から 17 例の DDEC 症例を集めて新規治療法の検討をすでにおこなった。その結果、DDEC では未分化な腫瘍部位でミスマッチ修復蛋白が欠損し、かつ PD-L1 発現が高いことを明らかにした。従来の化学療法に加え免疫チェックポイント阻害薬を併用することで更なる治療効果が期待できる可能性を報告した（Ono R, Ishibashi T et al., Int J Mol Sci. 2019）。

またこれまで 2 次元細胞培養下での薬物感受性試験、遺伝子解析が進められてきたが、近年 in vivo の生理学的環境により近い 3 次元細胞培養が注目を集めている。ヒト細胞から直接形成することができ、3 次元細胞培養下での発現プロファイルは 2 次元培養環境の場合と比較し

て、生理学的な重要性が高いと考えられている。正常な子宮内膜腺および単一腺由来のスフェロイドの作成には成功し KRAS/PIK3CA ドライバー変異の状態を調査した (Sato S, Ishibashi T et al., Cancer Sci. 2023)。しかし卵巣脱分化癌は発生がまれであり、オルガノイドモデルの作成には至っていない。今後オルガノイドを用いた卵巣脱分化癌発生機構の検討が次の目標である。

## 5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計9件（うち査読付論文 9件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 9件）

1. 著者名 Kyo Satoru, Kanno Kosuke, Takakura Masahiro, Yamashita Hitomi, Ishikawa Masako, Ishibashi Tomoka, Sato Seiya, Nakayama Kentaro	4. 巻 14
2. 論文標題 Clinical Landscape of PARP Inhibitors in Ovarian Cancer: Molecular Mechanisms and Clues to Overcome Resistance	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Cancers	6. 最初と最後の頁 2504 ~ 2504
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3390/cancers14102504	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 Sasamori Hiroki, Nakayama Kentaro, Razia Sultana, Yamashita Hitomi, Ishibashi Tomoka, Ishikawa Masako, Sato Seiya, Nakayama Satoru, Otsuki Yoshiro, Fujiwaki Ritsuto, Ishikawa Noriyoshi, Kyo Satoru	4. 巻 29
2. 論文標題 Mutation Profiles of Ovarian Seromucinous Borderline Tumors in Japanese Patients	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Current Oncology	6. 最初と最後の頁 3658 ~ 3667
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3390/curroncol29050294	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 Nakayama Naomi, Nakayama Kentaro, Ishibashi Tomoka, Katayama Satoru, Kyo Satoru	4. 巻 11
2. 論文標題 Effect of Muscle Loss but Not Fat Loss during Primary Debulking Surgery and Chemotherapy on Prognosis of Patients with Ovarian Cancer	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Journal of Clinical Medicine	6. 最初と最後の頁 3184 ~ 3184
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3390/jcm11113184	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 Shanta Kamrunnahar, Nakayama Kentaro, Hossain Mohammad Mahmud, Razia Sultana, Ishibashi Tomoka, Ishikawa Masako, Yamashita Hitomi, Kanno Kosuke, Sato Seiya, Nakayama Satoru, Otsuki Yoshiro, Kyo Satoru	4. 巻 29
2. 論文標題 Promising Therapeutic Impact of a Selective Estrogen Receptor Downregulator, Fulvestrant, as Demonstrated In Vitro upon Low-Grade Serous Ovarian Carcinoma Cell Lines	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Current Oncology	6. 最初と最後の頁 4020 ~ 4033
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3390/curroncol29060321	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 Yamashita Hitomi, Nakayama Kentaro, Kanno Kosuke, Ishibashi Tomoka, Ishikawa Masako, Sato Seiya, Iida Kouji, Razia Sultana, Kyo Satoru	4. 巻 45
2. 論文標題 Identifying the Carcinogenic Mechanism of Malignant Struma Ovarii Using Whole-Exome Sequencing and DNA Methylation Analysis	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 Current Issues in Molecular Biology	6. 最初と最後の頁 1843 ~ 1851
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3390/cimb45030118	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 Sato Seiya, Nakayama Kentaro, Kanno Kosuke, Sultana Razia, Ishikawa Masako, Ishibashi Tomoka, Yamashita Hitomi, Kyo Satoru	4. 巻 -
2. 論文標題 Frequent PIK3CA mutation in normal endometrial gland drives spheroid formation and may be involved in stem cell propagation	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 Cancer Science	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1111/cas.15767	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 Sawada Kiyoka, Nakayama Kentaro, Nakamura Kohei, Yoshimura Yuki, Razia Sultana, Ishikawa Masako, Yamashita Hitomi, Ishibashi Tomoka, Sato Seiya, Kyo Satoru	4. 巻 9
2. 論文標題 Clinical Outcomes of Genotype-Matched Therapy for Recurrent Gynecological Cancers: A Single Institutional Experience	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Healthcare	6. 最初と最後の頁 1395 ~ 1395
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3390/healthcare9101395	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 Ishikawa Masako, Nakayama Kentaro, Nakamura Kohei, Yamashita Hitomi, Ishibashi Tomoka, Minamoto Toshiko, Sawada Kiyoka, Yoshimura Yuki, Iida Kouji, Razia Sultana, Ishikawa Noriyoshi, Nakayama Satoru, Otsuki Yoshiro, Kyo Satoru	4. 巻 11
2. 論文標題 P16INK4A expression might be associated with a favorable prognosis for cervical adenocarcinoma via dysregulation of the RB pathway	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Scientific Reports	6. 最初と最後の頁 1-10
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1038/s41598-021-97703-8	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 Dey Puja, Nakayama Kentaro, Razia Sultana, Ishikawa Masako, Ishibashi Tomoka, Yamashita Hitomi, Kanno Kosuke, Sato Seiya, Kiyono Tohru, Kyo Satoru	4. 巻 14
2. 論文標題 Development of Low-Grade Serous Ovarian Carcinoma from Benign Ovarian Serous Cystadenoma Cells	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Cancers	6. 最初と最後の頁 1506 ~ 1506
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3390/cancers14061506	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5件(うち招待講演 0件/うち国際学会 0件)

1. 発表者名 石橋朋佳、中山健太郎、佐藤誠也、石川雅子、山下 瞳、菅野晃輔、京 哲
2. 発表標題 婦人科良性疾患におけるロボット支援手術と腹腔鏡手術の治療成績
3. 学会等名 第62回日本産科婦人科内視鏡学会学術講演会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 Tomoka Ishibashi, Kentaro Nakayama, Naomi Nakayama, Seiya Sato, Masako Ishikawa, Hitomi Yamashita, Ruriko Fukushima, Kiyoka Sawada, Yuki Nonomura, Kan Makihara, Kosuke Kanno, and Satoru Kyo
2. 発表標題 Sarcopenic Factors May Have No Impact on Outcomes in Ovarian Cancer Patients
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 Tomoka Ishibashi, Kentaro Nakayama, Seiya Sato, Masako Ishikawa, Hitomi Yamashita, Ruriko Fukushima, Kiyoka Sawada, Yuki Nonomura, Kosuke Kanno, and Satoru Kyo
2. 発表標題 Sarcopenic Factors May Have No Impact on Outcomes in Ovarian Cancer Patients
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 Ishibashi Tomoka
2. 発表標題 Clinicopathological analysis of uterine dedifferentiated endometrioid adenocarcinoma
3. 学会等名 第73回日本産科婦人科学会学術講演会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 石橋 朋佳
2. 発表標題 Clinicopathological Investigation of Uterine Dedifferentiated Endometrioid Adenocarcinoma
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

〔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
---------	---------