

患者由来腫瘍マウス同所移植モデルを用いた ARID1A変異婦人科がんの持つ特徴的な脆弱性を 利用した新たな分子標的治療の探索

大阪大学大学院医学系研究科産科学婦人科学教室 助教 木瀬 康人

要 約

近年次世代シーケンサー等の科学技術の急速な進歩に伴い各がんの持つ特徴的なゲノム異常が容易に同定されるようになった。ゲノム異常はがんの特徴的な脆弱性を寄与することが想定されるため、がんゲノム異常を標的とした治療開発研究が強く求められている。ARID1A遺伝子変異は全がんの約8%に認められるが、最も高頻度に認められるのは卵巣明細胞癌(約50%)であり、婦人科悪性腫瘍と非常に関連が強い。卵巣明細胞癌は既存の抗がん剤への耐性を示すことが多く治療に難渋する組織型であり、新規治療法の開発は喫緊の課題である。婦人科がんの持つほとんどのARID1A変異はARID1Aタンパクの低発現・機能異常を起こし、SWI/SNF複合体はクロマチンの立体構造の変化を介して、特にがんと深く関わる遺伝子発現異常をきたす。本研究ではARID1A遺伝子がDNAダメージ修復機構に強く関与していることより、新規分子標的薬であるATR阻害剤とBET阻害剤に着目し、ARID1A変異型卵巣明細胞癌への新規治療開発研究を行った。まず我々は変異型ならびに野生型卵巣明細胞癌の新規分子標的治療を評価するためのプラットフォームであるPatient-derived xenograft(PDX)マウスモデルの作成に成功した。In vitroならびにPDXモデルを用いたIn vivoの検討では、ARID1A変異型卵巣明細胞癌ではARID1A野生型に比較して、ATR阻害剤とBET阻害剤併用療法が有意に強い抗腫瘍効果を示すことを見出した。このPDXマウスモデルを用いることでより臨床のヒトでの抗腫瘍効果をより正確に予測することができ、現行の化学療法に抵抗性である卵巣明細胞癌への新規治療法の可能性が見出された。本研究結果を基にARID1A変異型卵巣癌に対して米国にて第一相臨床試験を計画している。

緒 言

卵巣がんは婦人科悪性腫瘍で最も予後不良ながんであり、進行卵巣がんは手術・抗がん剤などの集学的治療を行っても高率に再発をきたし、致命的な経過を辿る。子宮体がんは7割以上が子宮体部に限局した早期がんで発見されるため全体としては予後良好であるが、進行・再発子宮体がんには有効な治療法は非常に限られており治療に難渋する。働き盛りの年代から高老年期の女性に多く認められる難治性の卵巣がんと子宮体がんに対する新規治療法の開発は現代社会における喫緊の課題である。

近年、次世代シーケンサーなどの科学技術の急速な進歩に伴って、各がんの持つ特徴的なゲノム異常が容易に同定されるようになった。がん遺伝子やがん抑制遺伝子の異常をもたらす各ゲノム異常は、発がんのがんの増殖・進展・転移に深く関わる一方で、それぞれのがんの特徴的な脆弱性を寄与するこ

とが想定されている。実臨床においてはがん遺伝子パネル検査が実用化・保険収載され、がんの個別化医療が推進されてきた。しかしながら顕著に奏功する治療法に結びつく遺伝子異常が見つかるのは現時点では約10%に過ぎず、現在がんゲノム異常を標的とした治療開発研究が強く求められている。

ARID1A遺伝子変異は全がんの約8%に認められるが、最も高頻度に認められるのは卵巣明細胞癌(約50%)、次いで子宮体癌(約35%)、卵巣類内膜腺癌(約30%)であり、婦人科悪性腫瘍と非常に関連が強い。この中でも卵巣明細胞癌は既存の抗がん剤への耐性を示すことが多く治療に難渋する組織型である。婦人科がんの持つほとんどのARID1A変異はARID1Aタンパクの低発現・機能異常を起こす。ARID1AタンパクはSWI/SNFクロマチンリモデリング複合体の構成分子の一つであり、SWI/SNF複合体はクロマチンの立体構造の変化を介して、各種の遺伝子

発現、特にがんと深く関わる遺伝子群(DNAダメージ修復、PI3K/AKT経路、アポトーシス制御など)を制御している¹。よって様々な分子標的治療薬が *ARID1A* 変異がんへ選択的に奏功する可能性があると考えた。そこで本研究ではこれらの難治性婦人科がんに対する臨床上の課題を解決するために、*ARID1A* 変異がんの持つ特徴的な脆弱性を利用した新たな分子標的治療を開発することを目的とした。

方 法

1. *ARID1A* 変異型ならびに野生型の婦人科がん Patient-derived xenograft (PDX) マウスモデルの確立

我々はこれまでにUniversity of PennsylvaniaのRonny Drapkin研究室、Fiona Simpkins研究室との共同研究において、手術検体より採取したヒト卵巣がんならびに子宮体がん組織を、免疫不全マウスの卵巣または子宮へ同所移植することで、多くの婦人科がんPDXマウスモデルを樹立してきた(University of Pennsylvania倫理委員会承認番号IACUC 806002、大阪大学倫理審査委員会承認番号873-2)²⁴。この婦人科がん同所移植PDXモデルはヒトのがんそのものの組織型・ゲノム異常・タンパク発現などを正確に保ち、ヒトの卵巣がん・子宮体がんの進展を忠実に模倣する。そしてPDXマウスにおける抗腫瘍効果は、従来の細胞株を用いた動物実験と比べて、ヒトでの臨床効果と強く相関するとされる。よって近年では基礎研究成果をヒト臨床試験へ応用する際には、PDXを用いた動物実験結果が強く求められている。

まず我々は*ARID1A* 変異型ならびに野生型の卵巣明細胞癌PDXマウスモデルを作成した。具体的には、麻酔下に免疫不全マウス(NSGマウス)に開腹手術を実施し、1-2mm³大に細切した手術検体より採取したヒト卵巣がん組織3個をマウス卵巣に同所移植した。数週間後に増大するこのPDX腫瘍を触診と経腹超音波にて経時的に観察し、腫瘍が1200 mm³に達した時点でマウスを安楽死させ腫瘍組織を採取した。採取したPDX腫瘍は細切され、一部は凍結検体保存とホルマリン固定検体保存とし、残りは新たな免疫不全マウスの卵巣に同所移植してPDX腫瘍をマウス体内で継代していった。確立したPDX腫瘍の病理組織像・抗*ARID1A*抗体を用いた免疫組織化学にて元のヒト卵巣癌と比較した。そ

してそのPDX腫瘍ならびに元のヒト卵巣癌を用いてDNA/RNA panel sequencingを行い、がんの遺伝子異常プロファイルを同定した。

2. *ARID1A* 変異型または野生型細胞株を用いた DNAダメージ修復機構に関連するATR阻害剤とBET阻害剤の*In vitro*抗腫瘍効果の比較検討

本研究では*ARID1A*タンパクがDNAダメージ修復機構に強く関与していることを受けて¹、新規分子標的薬であるATR阻害剤とBET阻害剤に着目した。婦人科がん細胞株(卵巣がん;TOV21G、OVMANA、JHOC-9、OVISE、OVTOKO、WO-24、ES-2、OVKATE、OVICAR-8と子宮体がん;HEC-1-A)を用いて*In vitro*でCarboplatin(既存の治療法)、ATR阻害剤(AZD6738 0.1 μM)とBET阻害剤(AZD5153 0.1 μM)、ATR阻害剤(AZD6738 0.1 μM)とBET阻害剤(AZD5153 0.1 μM)の併用の抗腫瘍効果を検討した(MTT assay)。また*ARID1A* 変異型(TOV21G、OVMANA)、*ARID1A* 野生型(OVKATE、ES-2)、HCT116とHCT116 *ARID1A* ノックアウトを用いてFlowcytometryにて薬剤投与後のDNAダメージマーカーであるγH2AX発現、Apoptosisの有無を検討した。

3. ATR阻害剤とBET阻害剤併用療法が*ARID1A* 変異型卵巣がんPDXマウスモデルに選択的に抗腫瘍効果を示すかどうかの*In vivo*での検討

1. において樹立した*ARID1A* 変異型ならびに野生型婦人科がんPDXマウスモデルを用いて、ATR阻害剤とBET阻害剤併用療法が*ARID1A* 変異型がんを選択的に抗腫瘍効果を発揮するか検討した。具体的には、全身麻酔下に免疫不全マウスに開腹手術を実施し、1-2mm³大の PDX 腫瘍3個をマウス卵巣に同所移植した。数週間後に増大してくるPDX腫瘍を触診と経腹超音波にて経時的に観察し、腫瘍が 60-100mm³に達した時点で5群(コントロール群、Carboplatin群(既存の治療法、週1回20mg/kg腹腔内投与)、ATR阻害剤群(週5回40mg/kg経口投与)、BET阻害剤群(WO-38では週5回1.5mg/kg経口投与、WO-30では週5回2.0mg/kg経口投与)、ATR阻害剤とBET阻害剤の併用療法群にランダム化した。腫瘍サイズは毎週超音波にて経時的に計測し抗腫瘍効果を検討した。

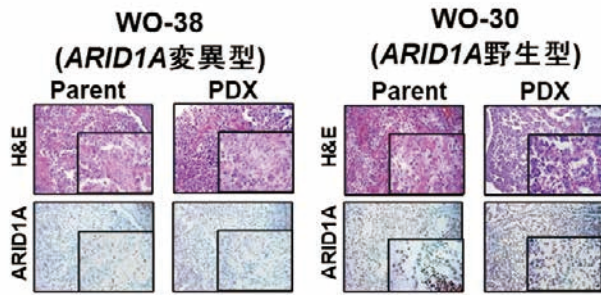


図1. 卵巣明細胞癌PDXモデルの病理組織像
*ARID1A*変異型PDXモデルWO-38(左)、*ARID1A*野生型PDXモデルWO-30(右)。ヒト卵巣癌腫瘍(Parent)とマウスPatient-derived xenograft腫瘍(PDX)でのH&E染色での病理組織像、抗*ARID1A*抗体を用いた免疫組織化学は類似した像を示した。

結果

1. *ARID1A* 変異型ならびに野生型の婦人科がん Patient-derived xenograft(PDX)マウスモデルの確立

我々は手術検体から採取した2種類の卵巣明細胞癌のPDXモデル(WO-38とWO-30)の確立に成功した。各PDX腫瘍の病理組織像は元のヒト卵巣癌と類似していることを確認した(図1)。免疫組織化学により検討によるWO-38は*ARID1A*タンパク発現陰性、WO-30は*ARID1A*タンパク発現陽性であった(図1)。網羅的遺伝子解析にてPDXモデルの遺伝子異常プロファイルを同定し、WO-38は*ARID1A*変異型でありWO-30は*ARID1A*野生型であることを確認した。

2. *ARID1A* 変異型または野生型細胞株を用いた DNAダメージ修復機構に関連するATR阻害剤とBET阻害剤の*In vitro*抗腫瘍効果の比較検討

MTT assayにおいて、*ARID1A*変異型細胞株(TOV21G、OVMANA、JHOC-9、OVISE、OVTOKO、WO-24、HEC-1-A)は*ARID1A*野生型細胞株(ES-2、OVKATE、OVCAR-8)に比べてBET阻害剤への感受性が高く、ATR阻害剤とBET阻害剤の併用療法はさらに強い抗腫瘍効果を認めた(図2A)。Flowcytometryにおける検討では、*ARID1A*変異型細胞株とHCT116 *ARID1A*ノックアウト細胞株では*ARID1A*野生型細胞株に比較して高い γ H2AX発現とApoptosis細胞の増加を認めた(図2B, 2C)。

3. ATR阻害剤とBET阻害剤併用療法が*ARID1A* 変異型卵巣がんPDXマウスモデルに選択的に抗腫瘍効果を示すかどうかの*In vivo*での検討

*ARID1A*変異型PDXモデルであるWO-38で

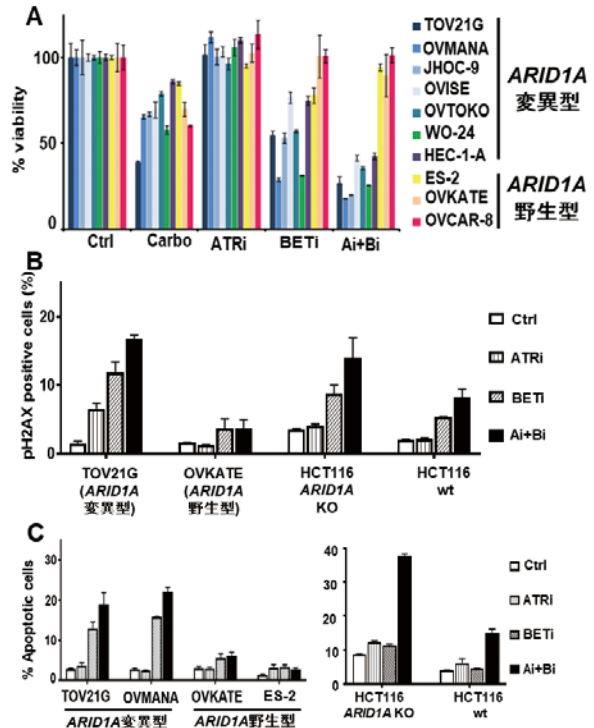


図2. *ARID1A*変異型または野生型細胞株を用いたATR阻害剤とBET阻害剤の*In vitro*抗腫瘍効果の検討

(A) MTT assay. *ARID1A*変異型細胞株は*ARID1A*野生型細胞株(ES-2、OVKATE、OVCAR-8)に比べてBET阻害剤への感受性が高く、ATR阻害剤とBET阻害剤の併用療法はさらに強い抗腫瘍効果を示した。Flowcytometryにおける検討では*ARID1A*変異型細胞株とHCT116 *ARID1A*ノックアウト細胞株では*ARID1A*野生型細胞株に比較して、ATR阻害剤とBET阻害剤の併用療法で γ H2AX陽性細胞の増加(B)とApoptosis細胞の増加(C)を認めた。Ctrl; コントロール群、Carbo; Carboplatin群、ATRi; ATR阻害剤群、BETi; BET阻害剤群、Ai+Bi; ATR阻害剤とBET阻害剤の併用療法群。

は、ATR阻害剤とBET阻害剤の併用療法群で長期間の有意な抗腫瘍効果を認めた(図3)。一方で、*ARID1A*野生型WO-30ではATR阻害剤とBET阻害剤の併用療法群において抗腫瘍効果はコントロール群と有意差を認めなかった(図3)。

考察

我々は*ARID1A*変異型ならびに野生型卵巣明細胞癌の新規分子標的治療を評価するためのPDXマウスモデルの作成に成功した。*ARID1A*変異型卵巣明細胞癌では、*ARID1A*野生型に比較して、ATR阻害剤とBET阻害剤併用療法が*In vitro*ならびに*In vivo*で有意に強い抗腫瘍効果を示すことを同定した。このPDXマウスモデルを用いることでより臨床のヒトでの抗腫瘍効果をより正確に予測することができ、現行の化学療法に抵抗性である卵巣明細胞癌への新規治療法の可能性が見出された。本研究結果を基に、共同研究者のUniversity of Pennsylvaniaチームとともに現在米国NRG Oncologyグループで

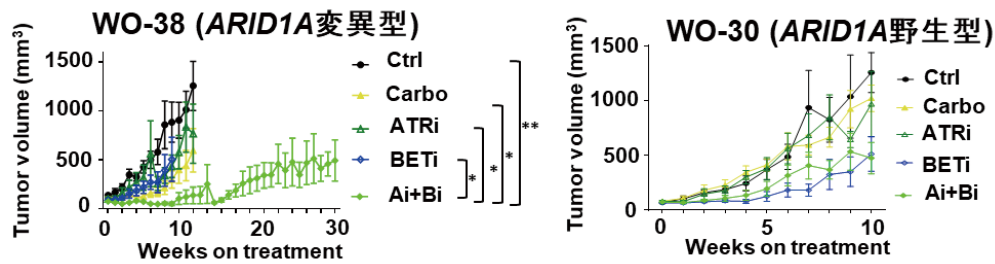


図3. *ARID1A*変異型ならびに野生型卵巣明細胞癌PDXモデルにおけるATR阻害剤とBET阻害剤の併用療法の抗腫瘍効果の検討

*ARID1A*変異型PDXモデルWO-38(左)では、ATR阻害剤とBET阻害剤の併用療法群で長期間の有意味な抗腫瘍効果を確認した。一方、*ARID1A*野生型PDXモデルWO-30(右)では併用療法群において抗腫瘍効果はコントロール群と比べて有意差を認めなかった。* $p < 0.05$, ** $p < 0.01$ 。Ctrl ; コントロール群、Carbo ; Carboplatin群、ATRi ; ATR阻害剤群、BETi ; BET阻害剤群、Ai+Bi ; ATR阻害剤とBET阻害剤の併用療法群。

の第一相臨床試験を計画しており、早ければ2022年中からの臨床試験開始を目指している。

*ARID1A*遺伝子は多くのがんと深く関わる遺伝子群を制御しているため¹、本研究で確立したPDXマウスモデルを使って、*ARID1A*変異型に特異的に抗腫瘍効果を示すさらなる新規治療法開発に活用することが可能である。PDXマウスモデルは凍結保存、腫瘍解凍後にマウスに移植し腫瘍を無制限に増やすことが可能であり、再現性のある非常に強力な研究プラットフォームである。

がん遺伝子の異常に基づいたがんの個別化医療の開発は現在世界中で行われており、本研究手法を*ARID1A*以外の遺伝子に応用することで、これまで有効な治療法がなかった全がん種への新規治療開発が可能である。我々も本研究の卵巣明細胞癌に続いて、難治性子宮体癌や婦人科希少癌にこのPDXマウスモデルを用いた新規治療開発を現在行っている。

本研究モデルを継続的に展開することで多くの悪性腫瘍の予後改善に繋がる治療法が同定されていくと考える。

参考文献

1. Caumanns JJ, Wisman GBA, Berns K et al. *ARID1A* mutant ovarian clear cell carcinoma: A clear target for synthetic lethal strategies. *Biochim Biophys Acta Rev Cancer*. 2018;1870:176-184.
2. George E, Kim H, Krepler C et al. A patient-derived-xenograft platform to study BRCA-deficient ovarian cancers. *JCI Insight*. 2017;2:e89760
3. Kim H, George E, Ragland R et al. Targeting the ATR/CHK1 Axis with PARP Inhibition Results in Tumor Regression in BRCA-Mutant Ovarian Cancer Models. *Clin Cancer Res*. 2017;23:3097-3108.
4. Kim H, Xu H, Gerorge E et al. Combining PARP with ATR inhibition overcomes PARP inhibitor and platinum resistance in ovarian cancer models. *Nat Commun*. 2020;11:3726.

Abstract

Purpose: Clear cell ovarian cancer (CCOC) is often resistant to standard chemotherapy and has limited treatment options in the advanced or recurrent setting. *ARID1A* is the most prevalent mutation with approximately 50% of all CCOC harboring this mutation. *ARID1A*, a member of the SWI/SNF family, regulates transcription and has a major role in the repair of DNA lesions. We propose that CCOC's unique genomic alterations will increase dependency on DNA repair pathways for survival. We hypothesize that a combination of small-molecule inhibitors of the BET family and the DNA damage repair pathway (ATR), will especially target *ARID1A* mutant cancer cells. **Method:** We established CCOC patient-derived xenograft (PDX) mouse models as a preclinical drug development platform. *In vitro* analyses were performed to compare the sensitivity of ATR inhibitor (ATRi) + BET inhibitor (BETi) combinations in *ARID1A* mutated and wild-type cells. The effects on DNA damage and apoptosis were evaluated. In PDX models, ATRi + BRD4i combination was tested in PDX models. **Results:** We developed *ARID1A* mutated (WO-38) and *ARID1A* wild-type (WO-30) CCOC PDX models. Treatment of ATRi + BRD4i showed synergistic in decreasing survival with an increase in DNA damage and apoptosis in *ARID1A* mutated cells compared to *ARID1A* wild-type. Combination ATRi + BRD4i showed significant tumor regression compared to standard chemotherapy or monotherapy in WO-38 PDX model but not in WO-30 PDX. **Conclusion:** Our studies identified a drug combination, ATRi + BRD4i combination, targeting *ARID1A* genetic alterations using our novel CCOC drug development PDX platform.