

# 卵巣癌オルガノイドバイオバンク構築による次世代型精密医療の実現

慶應義塾大学医学部 産婦人科学教室 千代田 達幸

## 要約

卵巣癌治療にはPoly(ADP-ribose) polymerase(PARP)阻害薬が導入され、*BRCA1/2*バリエーションなどDNA相同組換え異常(Homologous recombination deficiency: HRD)のある卵巣癌には大きな効果が示されているものの、HRDのない卵巣癌には効果の高い分子標的薬は存在しない。また、明細胞癌は化学療法に抵抗性であり、同様に効果的な分子標的薬は存在しない。本研究は難治性卵巣癌に対する革新的な治療薬開発を卵巣癌オルガノイドバンクを用いて実現することを目的とした。FGF-2, IGF-1, Noggin, Wnt3a(高異型度漿液性癌の場合は除く), R-spondin, B27, N-Acetylcysteine, Y-27632, A83-01を含む培養液組成により異なる組織型からの卵巣癌オルガノイドの効率的な作成に成功した。オルガノイド作成の成功率は80%(28/35)であった。7つのオルガノイド(高異型度漿液性癌: 3, 明細胞癌: 1, 類内膜癌: 3)と元の卵巣癌組織のゲノムの比較では59.5%(36.1-73.1%)のバリエーションが共通していた。バリエーションのアレル頻度およびDNAコピー数異常も腫瘍とオルガノイドではほぼ同様であった。23種類の薬剤を用いて薬剤感受性試験を行ったところ*BRCA1*に病的バリエーション(p.L63X)を有するオルガノイドは有意にPARP阻害薬であるオラパリブへの感受性が高かった。また、明細胞癌オルガノイドは標準治療に用いられるパクリタキセル、カルボプラチンに抵抗性であった。これらの薬剤感受性試験の結果よりオルガノイドは卵巣癌の臨床上的特徴を有すると考えられた。樹立した明細胞癌オルガノイド2株を用いて375の低分子化合物によるhigh-throughput drug screeningを行い、共通して認められる20の化合物を同定することに成功した。

## 緒言

卵巣癌・卵管癌・腹膜癌(以下卵巣癌と略す)は全世界では年間約23万人が罹患し、約14万人が死亡する予後不良の疾患である。卵巣癌は漿液性癌、類内膜癌、明細胞癌、粘液性癌と異なる主に4つの組織型からなるが、すべての組織型において手術による可及的な腫瘍切除とプラチナ系を用いた2剤併用の化学療法が行われており、治療法はこの30年間大きく変化していない。Ⅲ期以上の進行がんで発見されることが多く、Ⅲ期、Ⅳ期の5年生存率は約40%、約20%と予後不良である。卵巣癌は明確な癌のドライバー遺伝子を有さず分子標的薬の導入は遅れていたが、抗VEGFモノクローナル抗体であるベバシズマブが本邦では2013年に導入され、Poly(ADP-ribose) polymerase(以下PARPと略す)阻害薬であるオラパリブが2018年に導入された。ベバシズマブは無増悪生存期間を4か月程度延長するものの、全生存期間を明確には延長せず、またオラパリブは*BRCA1*もしくは*BRCA2*バリエーションなどDNA相同組換え異常(Homologous recombination deficiency

(以下HRDと略す))をもつ卵巣癌には効果があるものの、HRDのない約50%の漿液性癌には有意な予後延長を示していない。HRDのない漿液性癌はプラチナ併用化学療法の効果が低く、また本邦に多い明細胞癌は化学療法に抵抗性であることが多い。卵巣癌患者の予後を改善するためには難治性であるHRDのない漿液性癌、明細胞癌に対する革新的な治療法の開発が必要である。

これまで多くの卵巣癌治療が研究開発されてきたにも関わらず、臨床で効果が確認された薬剤はごく少数にとどまる。その一因として、卵巣癌研究に頻用されるSKOV3、HeyA8等の卵巣癌細胞株はゲノム上卵巣癌とは考えにくいこと[1]、通常研究で用いられる2次元培養下での薬剤感受性試験は3次元培養と結果が大きく異なり、3次元培養での薬剤感受性がより臨床と合致すること[2]が挙げられる。これらの欠点を克服するのがオルガノイドである。元の組織の特性を維持したままex vivoで培養可能な立体構造体であるオルガノイドは精密医療において重要な役割を果たすと考えられる。現在正常組織のオル

ガノイドのみならず、様々な癌のオルガノイド作成が報告されている。本研究は卵巢癌手術検体から効率的にオルガノイドを作成し、それを用いて難治性卵巢癌の新規治療開発を行うことを目的とした。

## 方法

### (1) 卵巢癌オルガノイド培養法の確立

消化管オルガノイド培養液の組成をベースに卵巢癌組織から卵巢癌オルガノイドを効率的に作成できる培養法を検討した(倫理委員会承認番号20070081)。

### (2) 卵巢癌オルガノイドと卵巢癌の病理学的、ゲノム上の類似性の比較

異なる卵巢癌組織から作成したオルガノイドの病理学的な類似性を検討した。また、癌関連1053遺伝子のターゲットキャプチャーシーケンスを用いてゲノム上の類似性を検討した。

### (3) 明細胞癌オルガノイドを用いた薬剤のhigh-throughput drug screening

作成した明細胞癌オルガノイドを用いて、薬剤のhigh-throughput drug screening (以下HTDSと略す)を行った。

## 結果

### (1) 卵巢癌オルガノイド培養法の確立

手術時に採取した卵巢癌検体を酵素処理し、1細胞まで分離したのちにオルガノイド培養を行った。WENRAS培地に2%マトリゲルを混ぜたWENRAS+2%マトリゲル培地、マトリゲルに細胞

を包埋し、外側にWENRAS培地を加えたWENRASマトリゲルembedded培地を比較したところ、WENRAS+2%マトリゲル培地では線維芽細胞の含有率が高く、WENRASマトリゲルembedded培地を採用した。最終的にFGF-2, IGF-1, Noggin, Wnt3a (高異型度漿液性癌の場合は除く), R-spondin, B27, N-Acetylcysteine, Y-27632, A83-01を含む卵巢癌オルガノイド培養液組成を確立した。様々な組織型の卵巢癌からのオルガノイド作成率は80%(28/35)であった。

### (2) 卵巢癌オルガノイドと卵巢癌の病理学的、ゲノム上の類似性の比較

漿液性癌、類内膜癌、明細胞癌といった異なる組織型からオルガノイド作成が可能となり、作成したオルガノイドは形態学的に元の腫瘍に類似していた(図1)。p53の染色性も同一であった。オルガノイドと元の腫瘍において遺伝子バリエーションは59.1%(36.1-73.1%)が共通しており、癌に関連していると考えられる主要な遺伝子バリエーションは保持されていた(図2)。また、遺伝子のVariant allele frequency (VAF)、Copy number variation (CNV)も類似しており、元腫瘍のゲノムプロファイルの特徴をオルガノイドは保持していることがわかった。

### (3) 明細胞癌オルガノイドを用いた薬剤のhigh-throughput drug screening

卵巢癌オルガノイドは3週間以内に培養、増殖させて23種類の薬剤による感受性試験を行うことが可能であった。*BRCA1*に病的バリエーション(p.L63X)を有する漿液性癌オルガノイドは他のオルガノイドに

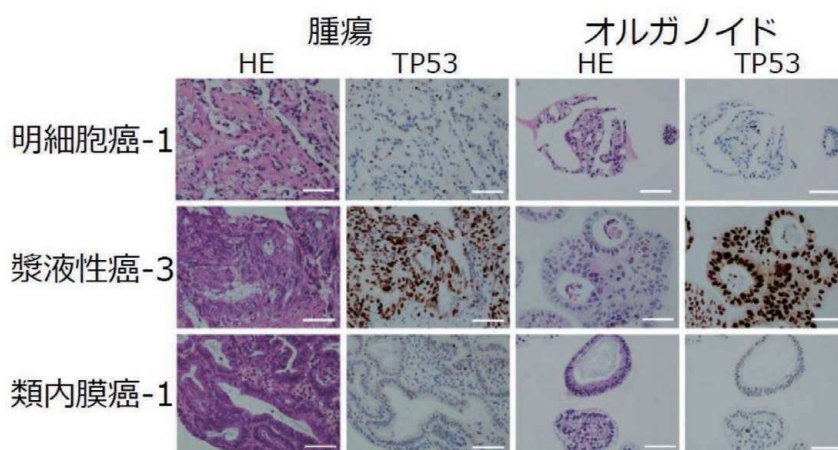


図1. 卵巢癌組織とオルガノイドの病理学的類似性

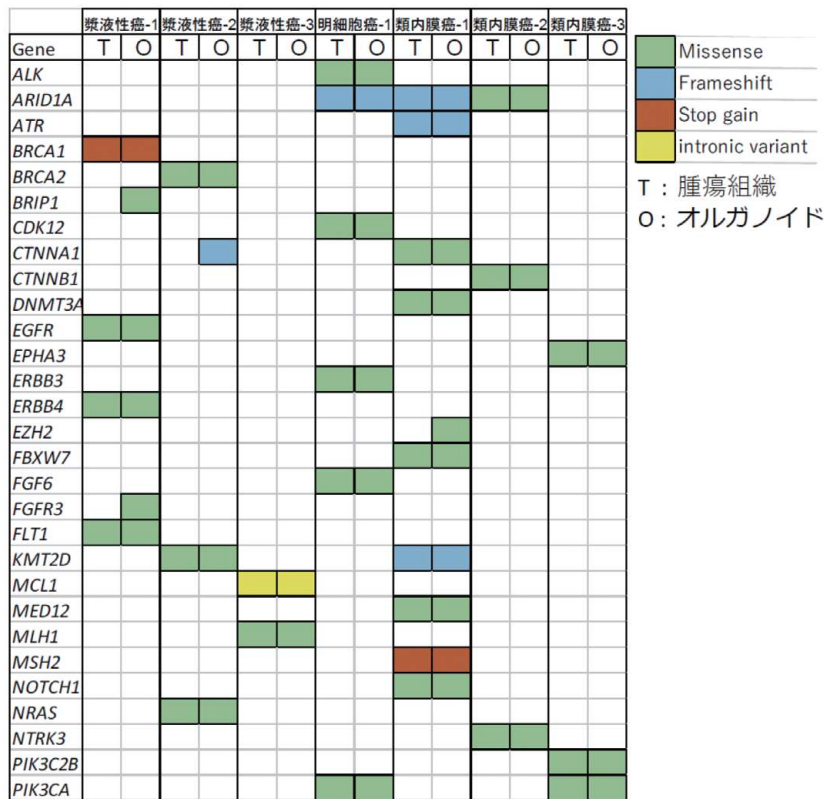


図2. 卵巣癌組織とオルガノイドのゲノム類似性

明細胞癌オルガノイドはパクリタキセル・カルボプラチンに抵抗性

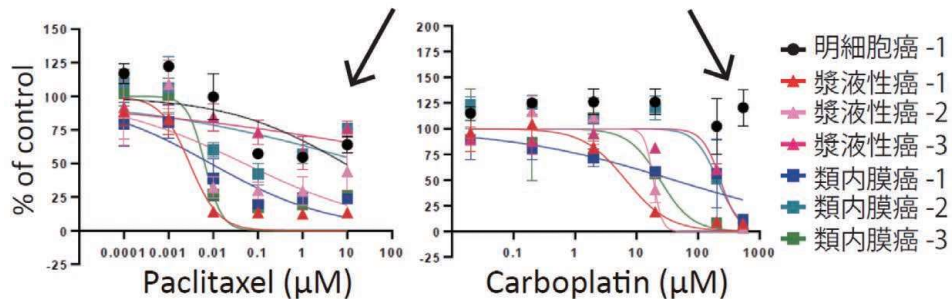


図3. 卵巣癌オルガノイドを用いたパクリタキセル・カルボプラチンの薬剤感受性試験

比べてオラパリブ、プラチナ製剤に高い薬剤感受性を示していた。また、明細胞癌オルガノイドは卵巣癌標準治療に用いられるパクリタキセル・カルボプラチンに抵抗性であった(図3)。これらから卵巣癌オルガノイドは臨床における癌の特性を反映していると考えられた[3]。続いて明細胞癌オルガノイドを用いて375の低分子化合物からなる標準阻害剤キット(文部科学省・化学療法基盤支援班提供)によるHTDSを行った。2回のHTDSの結果はほぼ同一であり、HTDSの信頼性が示された(図4)。樹立した2株の明細胞癌オルガノイドを用いて、ATP活性が30%未満となる化合物を抽出した。一株の明細胞癌

オルガノイドを用いたHTDSでは22化合物が抽出され、またもう一株の明細胞癌オルガノイドを用いたHTDSでは31化合物が抽出された。そのうち20化合物は共通していた。

考 察

異なる卵巣癌組織から効率的にオルガノイドを作成できる培養法を確立した。卵巣癌オルガノイドは培養して3-4週間以内に薬剤感受性試験を行うことが可能であった。癌組織をマウスに移植して作成するPatient-derived tumor xenograftマウスモデルは一般的に数か月作成に要するが、オルガノイドは作

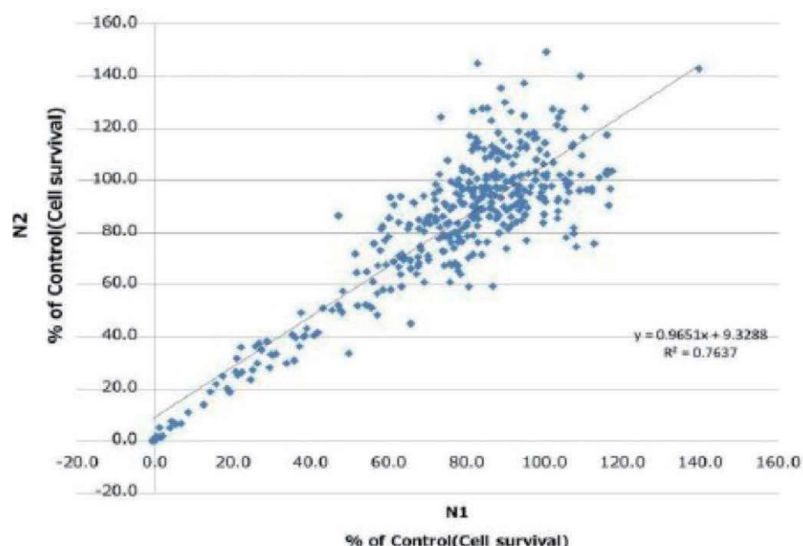


図4. 2回のHTDSの相関

成までの時間が早く、実際にオルガノイドで薬剤の効果を試してから患者に投与することが可能であり、患者腫瘍のアバターとして用いることができる。卵巣癌オルガノイドは卵巣癌組織と59.5%の遺伝子バリエーションを共通して保持していた。これは他報告の98%に比較して低いですが、本研究では継代回数の中央値4回でゲノム検査を行っているのに対し、他報告では培養開始後短期間(7-10日)でゲノム検査を行っていること[4]が原因として考えられる。本研究において主要な遺伝子バリエーションはオルガノイドにおいて保持されており、薬剤感受性も臨床に合致した結果であった。

難治性である卵巣明細胞癌オルガノイドを用いてHTDSが可能であった。現在、明細胞癌オルガノイド6株を用いて同定した薬剤の感受性を検証しており、ゲノム、トランスクリプトームと統合的に解析

を行っている。これにより新たなバイオマーカーに基づく、卵巣明細胞癌の新規治療開発が実現できると考えられる。

#### 参考文献

1. Domcke S, Sinha R, Levine DA et al. Evaluating cell lines as tumour models by comparison of genomic profiles. *Nat Commun* 2013; 4: 2126.
2. Jabs J, Zickgraf FM, Park J et al. Screening drug effects in patient-derived cancer cells links organoid responses to genome alterations. *Mol Syst Biol* 2017; 13: 955.
3. Nanki Y, Chiyoda T, Hirasawa A et al. Patient-derived ovarian cancer organoids capture the genomic profiles of primary tumours applicable for drug sensitivity and resistance testing. *Sci Rep* 2020; 10: 12581.
4. Hill SJ, Decker B, Roberts EA et al. Prediction of DNA Repair Inhibitor Response in Short-Term Patient-Derived Ovarian Cancer Organoids. *Cancer Discov* 2018; 8: 1404-1421.

#### Abstract

The use of primary patient-derived organoids for drug sensitivity and resistance testing could play an important role in precision cancer medicine. We developed expandable ovarian cancer organoids in < 3 weeks; these organoids captured the characteristics of histological cancer subtypes and replicated the mutational landscape of the primary tumours. Seven pairs of organoids (3 high-grade serous, 1 clear cell, 3 endometrioid) and original tumours shared 59.5% (36.1%-73.1%) of the variants identified. Copy number variations were also similar among organoids and primary tumours. The organoid that harboured the *BRCA1* pathogenic variant (p.L63X) showed a higher sensitivity to PARP inhibitor, olaparib, as well as to platinum drugs compared to the other organoids, whereas an organoid derived from clear cell ovarian cancer was resistant to conventional drugs for ovarian cancer, namely platinum drugs, paclitaxel, and olaparib. The overall success rate of primary organoid culture, including those of various histological subtypes, was 80% (28/35). Our data show that patient-derived organoids are suitable physiological ex vivo cancer models that can be used to screen effective personalised ovarian cancer drugs. Then we performed high-throughput drug screening (HTDS) of 375 small molecule inhibitors using 2 clear cell ovarian cancer organoids. HTDS identified 20 common inhibitors to suppress the activity of both clear cell organoids (<30% ATP).