

# 患者由来オルガノイドを活用した子宮体がん 精密医療の実装

千葉県がんセンター研究所 発がん制御研究部 丸 喜明

## 和文要約

子宮体がんは組織学的に類内膜癌が大半を占めるが、漿液性癌や癌肉腫など臨床的に悪性度の高いサブタイプが存在する。また、進行・再発子宮体がんは予後不良であり、新規治療法の開発が喫緊の課題である。患者由来がんモデルは治療前効果予測や創薬開発を行う上で重要であり、近年オルガノイドが注目されている。オルガノイド培養は培養成功率が高く、腫瘍の不均一性を保持したままがん細胞を培養できる利点がある。我々はこれまでに子宮体がん数例から患者由来オルガノイド(PDO)を樹立している。そこで本研究では、多様な組織型の子宮体がんからPDOを樹立し、それを用いた薬剤感受性評価および治療薬候補を探索することを目的とした。今回新たに子宮体がん9例から7 PDOを樹立した(成功率78%)。また、将来的な細胞診検体からのオルガノイド培養の実装を想定し、予備検討として子宮体がんから摘出された子宮の切開前に採取したブラシ擦過検体からPDO樹立を試み、5例中3例で成功した。増殖したPDOは基本的に元の腫瘍の形態学的特徴を保持していた。同一患者の異なる検体から樹立したPDOの遺伝子異常がどの程度類似しているのかを確認するため、3つの異なる検体(組織片、ブラシ擦過、腹腔洗浄液)から以前樹立した癌肉腫PDOの遺伝子異常を比較した。全体で4変異を同定し、この内3変異は全てのPDOに共通、1変異は元の腫瘍と組織片由来PDOでのみ共有していた。また、シーケンスデータに基づくコピー数変化は基本的にPDO間で類似していたが、KRASやERBB2などいくつかの遺伝子では明らかな相違を認めた。以上の結果から、同一患者の複数検体から腫瘍内不均一性を維持したままPDOの樹立に成功したと判断した。現在、樹立したPDOを用いた薬剤感受性試験を実施しており、今後はPDOを用いて子宮体がんの治療抵抗性機構解明や治療薬候補を探索する予定である。

## 緒言

子宮体がんは最も頻度の高い婦人科悪性腫瘍で近年増加傾向にある。組織学的には類内膜癌が約80%を占め、残り20%には漿液性癌や明細胞癌、癌肉腫など臨床的に悪性度が高いサブタイプが含まれる。近年の遺伝子解析技術の発達により、子宮体がんが高頻度の遺伝子異常が同定され、組織型ごとの特徴が明らかにされつつあり、遺伝子異常に基づく細分類も提唱されている(1, 2)。Stage Iの子宮体がんは5年生存率が90%以上であるのに対し、stage IVは予後不良で25%である。進行・再発症例の治療としてはTC(パクリタキセル+カルボプラチン)療法などが行われているが、十分な予後改善には至っていない。また、近年子宮体がんに対する様々な分子標的薬(抗HER2薬、抗血管新生薬、PARP阻害剤、PI3K/mTOR/AKT経路阻害剤など)の臨床試験が行われており、一部の症例で有効性が確認されているが、大半の症例は依然として選択肢が限られてい

る。したがって、子宮体がんにおいては新規治療戦略の構築が喫緊の課題である。

がんのゲノム異常に基づく個々人に最適な医療を提供する精密医療、特にゲノム医療が実装され始め大きな注目を集めている。しかしながら、①治療標的変異が検出されない、②変異が同定されても候補薬剤が存在しない、③投与しても無効である、といった症例も確認され、その限界も可視化されつつあるのが現状である。そのため、仮に患者由来のがん細胞を用いて直接薬剤の感受性評価を行うことが可能になれば大きなメリットとなることが期待される。また、変異が不明な場合でも、有効な薬剤の探索や新規治療標的の同定に道を開くという点で、細胞レベルの評価系の確立はやはり有用性が高いと考えられる。

近年、正常上皮細胞を生理的な状態で半永久的に増殖・維持可能とするオルガノイド培養の手法が開発され、患者由来がん細胞への応用も進んでいる。

本手法は樹立の成功率が高く、腫瘍内の不均一性を保持したままがん細胞を培養できるという利点がある。ただし、これまで消化器系がんを中心に研究が行われてきており(3)、婦人科がんでの報告はほとんどなく、標準的な手法が十分に確立したとは言えない状況だった。そこで、申請者は卵巣がんの臨床検体に対して最適化したオルガノイド培養法を確立し、子宮体がんにも応用可能なことを以前確認した(4)。ただし現状では、子宮体がんの症例数は少なく、またすべての組織型を網羅しているわけではなかったため、どの程度の一般性を有するかまでは未確認のままだった。

そこで本研究では、多様な組織型の多数の子宮体がん検体から患者由来オルガノイド(patient-derived organoid: 以下PDO)を樹立する一般的な手法をまず確立し、それを用いて薬剤の評価系を確立すると同時に新たな治療標的を探索することを目的とした。

## 方法

### 1. 倫理面への配慮

本研究は千葉県がんセンター倫理審査委員会で承認(H28-J158)されており、患者から同意が得られた症例のみを対象として実施した。

### 2. 臨床検体からのオルガノイド培養およびその形態学的評価

子宮体がんより採取した組織片からのオルガノイド樹立は、以前我々が卵巣がんに対して最適化したオルガノイド培養法(Modified Matrigel bilayer organoid culture method, 以下Modified MBOC法)で行った(4)。具体的には、まず採取した組織片を細切し、2 U/ml dispase II・1 mg/ml collagenase P(37℃, 50分)およびAccumax(37℃, 10分)による酵素処理を行った。次に酵素処理後の細胞をPBSで洗浄しピペティング後、無血清培地Advanced DMEM/F-12(L-glutamine solution, penicillin/streptomycin, amphotericin B suspension, 50 ng/ml human EGF, 250 ng/ml R-spondin1, 100 ng/ml Noggin, 10 μM Y27632, 1 μM Jagged-1)に懸濁した。その後、その細胞懸濁液を用いてマトリゲルによるオルガノイド培養を行った。ブラシ擦過検体からのオルガノイド培養については、子宮体がんから摘出された子宮の切開前にブラシ擦過で検体を採取

し、組織片と同様にModified MBOC法によりオルガノイド樹立を試みた。また、患者由来がん細胞がオルガノイドとして安定的に増殖可能だった場合は、PDOの病理組織学的評価(Hematoxylin and Eosin染色および免疫組織化学染色)を行った。

### 3. 次世代シーケンサーによる遺伝子異常の検索

PDOと元の腫瘍との遺伝子異常の比較は、以前報告した方法と同様に行った(4)。具体的には、樹立した患者由来オルガノイドおよび元の腫瘍のホルマリン固定パラフィン包埋(formalin-fixed paraffin-embedded, 以下FFPE)サンプルからゲノムDNAを抽出し、品質の評価後にIon Proton sequencerを用いてIon AmpliSeq Comprehensive Cancer Panelによる409のがん関連遺伝子に対するターゲットシーケンスを実施した。その際、腫瘍特異的な遺伝子異常を同定するため、正常部のFFPEサンプルからもゲノムDNAを抽出し、併せて解析した。

## 結果

子宮体がん9例から採取した組織片を用いてPDO樹立を試み、7 PDOを新規に樹立した(培養成功率: 78%)。その組織型別内訳は、類内膜癌3例、漿液性癌2例、癌肉腫1例、脱分化癌1例であった。これまで樹立してきたPDOは外科的に摘出された腫瘍から採取した組織片であるが、婦人科領域においてはブラシ擦過検体などの細胞診検体が術前や治療前の悪性腫瘍の検出・診断に用いられている。そこで、将来的な細胞診検体からのPDO樹立を想定し、予備検討として子宮体がんから摘出された子宮の切開前に採取したブラシ擦過検体からPDO樹立を試みたところ、5例中3例でPDOの樹立に成功した(培養成功率: 60%)。増殖したPDOは様々な形態を呈して増殖し、どの程度元の腫瘍の形態学的特徴を保持しているかを確認するために病理組織学的解析を実施したところ、PDOの形態は基本的に元の腫瘍の特徴を保持していた。次に同一患者由来の複数検体から樹立したPDOの遺伝子異常がどの程度類似しているかを評価するため、3つの異なる検体(組織片、ブラシ擦過、腹腔洗浄液)から以前樹立した癌肉腫PDOの遺伝子異常を比較した。全体でTP53などの4変異を同定し、組織片由来PDOと元の腫瘍は全4変異を共有、3変異についてはブラシ擦過由来、腹腔洗浄液由来PDOとも共有していた。このことから、

この3変異についてはfounder mutationであることが示唆された。さらに、ターゲットシーケンスで得られた標的領域の読み取り深度に基づいてコピー数の異常を推定したところ、子宮癌肉腫で頻度が高いとされるKRASやERBB2などのコピー数増加が元の腫瘍で確認された。PDO別にみても、組織片由来PDOはERBB2を除いて、基本的に元の腫瘍のコピー数変化と類似していたが、ブラシ擦過および腹腔洗浄液由来PDOではERBB2のコピー数増加が濃縮していた一方で、KRASのコピー数異常は消失していた。このような結果から、複数検体から樹立したPDO間でのゲノム異常の多様性が明らかとなった。

なお、上記の結果に関わる図表は投稿予定の論文に掲載予定であり、重複を避けるために掲載を省略した。

## 考 察

今回我々は、以前卵巣がんに対して最適化したModified MBOC法が、子宮体がんの様々な組織型からのPDO樹立にも応用可能かについて検討を行った。9例の検討であったが、これまでPDOの樹立に成功していた類内膜癌だけでなく、漿液性癌や癌肉腫、脱分化癌といった悪性度の高い腫瘍からのPDO樹立に成功したことから、我々が確立したオルガノイド培養法の汎用性が示唆された。今後も子宮体がんPDOの樹立を継続し、病態解明や創薬開発に資するバンキングを構築予定である。また、培養成功率は組織片に比べ低かったが、生検に比べ低侵襲に採取可能なブラシ擦過検体からPDOの樹立が可能であった。ただし、本研究は少数例の検討であり、かつ実際に外来で採取されたブラシ擦過検体を用いていないため、腫瘍の大きさや悪性度が異なる場合も想定される。そのため、今後は多数の症例に対してより実臨床に近い実験条件で検討する必要があるが、こうした細胞診検体から安定的にPDOの樹立が可能となれば、術前にがんの特徴を多方面から明らかにし、従来の病理検査を補完する役割を担うことが期待される。さらに、子宮癌肉腫の同一患者の異なる検体から樹立したPDOが異なるコピー数異常を有することが確認されたため、この3つのPDOを詳細に解析することで腫瘍内不均一性や治療抵抗性に関する洞察が得られることが期待さ

れる。ごく最近、同一患者の複数部位から樹立した卵巣がんPDOを用いた腫瘍内不均一性と薬剤感受性との関連が報告されたが(5)、子宮体がんでは同様の報告は皆無である。したがって、同一患者の複数ヶ所から樹立したPDOを用いて形態、遺伝子異常、薬剤感受性などを評価することで、子宮体がんにおいても腫瘍内不均一性と薬剤抵抗性との関連に関する洞察が得られることが期待される。今後は子宮体がんPDOを用いた抗がん剤および分子標的薬の治療効果予測、腫瘍内不均一性と薬剤抵抗性との関連解明、網羅的な薬剤・化合物スクリーニングによる治療薬候補の探索を進めていきたいと考えている。

## 参考文献

1. Murali R, Soslow RA, Weigelt B. Classification of endometrial carcinoma: more than two types. *Lancet Oncol.* 2014; 15: e268-278.
2. Cancer Genome Atlas Research N, Kandoth C, Schultz N, Cherniack AD, et al. Integrated genomic characterization of endometrial carcinoma. *Nature.* 2013; 497:67-73.
3. Bleijs M, van de Wetering M, Clevers H, et al. Xenograft and organoid model systems in cancer research. *EMBO J.* 2019; 38(15): e101654.
4. Maru Y, Tanaka N, Itami M, et al. Efficient use of patient-derived organoids as a preclinical model for gynecologic tumors. *Gynecol Oncol.* 2019; 154(1): 189-198.
5. de Witte C.J., Espejo Valle-Inclan J, Hami N, et al. Patient-Derived Ovarian Cancer Organoids Mimic Clinical Response and Exhibit Heterogeneous Inter- and Inpatient Drug Responses. *Cell Rep.* 2020; 31(11): 107762.

## **Abstract**

Among endometrial cancer (EC), clinically aggressive subtypes such as serous carcinoma and carcinosarcoma, and advanced or recurrent EC have a poor prognosis, critically requiring the development of new treatment modality. Patient-derived cancer models, including organoids, are useful tools in the prediction of clinical outcome and the drug discovery. Organoids have been drawing particular attention owing to its high success rate and retention of the inter- and intra-tumoral heterogeneity and histological features. In this study, we aimed at establishing patient-derived organoids (PDO) from various histological types of EC. We newly established 7 PDOs from 9 EC cases (success rate 78%), and PDOs from brush-scraped specimens collected after resection in 3 out of 5 cases. Furthermore, comparison among carcinosarcoma PDOs established from three different specimens led to identification of four mutations, three of which were common to all PDOs, while one was shared by the original tumor and tissue fragment-derived PDOs. The copy number changes were similar among PDOs, except for KRAS and ERBB2. These findings indicate intratumoral heterogeneity among PDOs established from multiple samples of the same patient. We are currently conducting drug sensitivity tests with PDOs and plan to use the PDOs to elucidate the mechanism of drug resistance in EC and to search for therapeutic candidates in future studies.