

# 卵巣がん患者腹水から見出された新規治療戦略 ～ NAD<sup>+</sup>産生阻害の有用性検証～

Efficacy of inhibiting NAD<sup>+</sup> production demonstrated with the ascites in ovarian cancer patients

東北大学病院 婦人科 助教 工藤 敬

## 要 約

卵巣がんは病勢進行に伴い腹水貯留を来し、腹部膨満感や重苦感などにより日常生活動作を著しく低下させる、極めて予後不良の悪性疾患である。近年、がん代謝を標的とした新規治療戦略が注目されているが、卵巣がんにおける有効な代謝標的はいまだ十分に解明されていない。我々はこれまで、腹水中の腫瘍細胞集塊を模倣する「3Dスフェロイド」に着目し、同スフェロイドが高いNAD<sup>+</sup>産生能を有することを明らかにしてきた。しかしNAD<sup>+</sup>は複数の代謝経路により産生されており、臨床応用のためには患者ごとにどのNAD<sup>+</sup>産生経路に依存しているかを同定する必要がある。本研究では、卵巣がん患者から採取した腹水を用いて3Dスフェロイドを樹立し、同スフェロイドが依存するNAD<sup>+</sup>産生パスウェイを同定・阻害することで、「卵巣がんにおけるNAD<sup>+</sup>産生阻害」という新規治療戦略の妥当性を検証した。

2025年12月までに約20例の卵巣がん患者腹水を採取し、7割以上の成功率で腫瘍細胞の培養・継代および3Dスフェロイド樹立に成功した。さらに、同スフェロイドがどのNAD<sup>+</sup>産生パスウェイに依存してNAD<sup>+</sup>を産生しているのかを明確化し、NAD<sup>+</sup>産生阻害が有効となり得る患者群を実験的根拠をもって示した。本研究は、「患者腹水を活用して3Dスフェロイドを得るアプローチが、腫瘍の代謝特性をリアルタイムに把握する有用な手段となり、個別化治療の選択と予後改善に資する基盤となる」ことを示唆するものである。本アプローチは実験サンプル採取に加え、腹部膨満感や重苦感といった日常活動性を低下させる症状緩和にも資する可能性を有しており、卵巣がんのみに留まらず腹水貯留を呈する他がん種への応用も期待される。本助成期間中に得られた成果は、基礎と臨床を架橋するトランスレーショナル研究として、将来的な医療水準の向上に資する意義深い知見を提供する。

## 緒 言

卵巣がんは病勢進行に伴い、腹水貯留による腹部膨満感や重苦感といった日常生活の活動性を低下させる症状を呈する難治性疾患である。キードラッグとなるプラチナ製剤に対し治療抵抗性である場合、従来の化学療法の奏効率は10%以下と非常に低く、新たな治療戦略が切望されている。

そんな背景のもと、注目されている分野の1つに「がん代謝」がある。近年、がん細胞固有の様々な代謝特性が明らかになり、がん種によっては脂質や核酸に関わる代謝物を標的とするものも出てきた。しかしながら、卵巣がんにおいては未だ有望なターゲットは明らかになっておらず、いかにしてがん代謝を標的とした治療開発の糸口を見出すかが重要な課題

となっている。

我々は「病勢進行に伴い、腹水中の腫瘍細胞塊が腹腔内を浮遊しながら播種や転移を引き起こす」という卵巣がん特有の進展様式に新たな治療コンセプトが眠っているのではないかと着眼した。そこで、腹水中の腫瘍塊の特徴を形態的・機能的に模倣するとされる3D培養細胞（3Dスフェロイド）に注目し、その代謝特性を探索的に解析したところ、3Dスフェロイドが高いNAD<sup>+</sup>産生能を有することを見出した<sup>1</sup>。NAD<sup>+</sup>は解糖系やTCA回路におけるエネルギー産生に必須の補酵素であり、その産生を阻害することでエネルギー枯渇を介した抗腫瘍効果が誘導される可能性がある。一方で、NAD<sup>+</sup>は単一のパスウェイで産生されるのではなく、Salvageパスウェイ・Preiss-

Handlerパスウェイ・De novoパスウェイなど複数のパスウェイが関与している。その中でも特にニコチンアミドホスホリボシルトランスフェラーゼ (NAMPT) を介してニコチンアミド (NAM) から  $\text{NAD}^+$  を生成する Salvageパスウェイが重要であること、様々ながん種においてNAMPT阻害が有用な治療戦略になりうること、が報告されている。さらに我々は、卵巣がん患者においてNAMPT高発現が明らかな予後不良因子であること、卵巣がんにおいてもNAMPT阻害剤がin vitroないしはin vivoで強い抗腫瘍効果を呈すること、を見出してきた<sup>2</sup>。しかしながら、これらの成功にもかかわらず、これまでに行われてきた臨床試験ではNAMPT阻害薬の抗腫瘍効果は残念ながら未だ明らかになってはいない。NAMPT阻害薬の臨床応用のためには「患者各々のがん細胞が依存する $\text{NAD}^+$ 産生パスウェイを把握する」という課題を克服する必要がある。そこで我々は、これまでの臨床試験では患者のがん細胞がどの $\text{NAD}^+$ 産生パスウェイに依存し増殖するかは未検証である、という点に着眼した。本研究では「進行ないしは再発卵巣がん患者に貯留した腹水採取は日常診療で行われている。では、その腹水中の腫瘍細胞から依存する $\text{NAD}^+$ 産生パスウェイを同定し、そのパスウェイを標的とした治療戦略によって予後改善につなげることは可能だろうか？」という臨床医としての問いにアプローチを試みる。

## 方法 (倫理記載)

本研究は東北大学病院倫理委員会の承認を得て実施した。2024年9月から2025年12月までの期間に、東北大学病院において初発例・再発例を問わず、卵巣腫瘍に伴う腹水貯留が疑われ腹水採取を行った23例を対象として解析を行った。

### (1) 卵巣がん患者腹水からの3Dスフェロイド樹立

患者各々の「がん代謝」を把握するためには、高品質な3Dスフェロイドを高い再現性をもって培養する必要がある。本研究では、文書同意が得られた卵巣がん患者の腹水を用い、赤血球や白血球といった腫瘍細胞以外の成分を除去しつつ、申請者がこれまで既報として示してきたようにUltra-low attachment plateを用いつつ、3Dスフェロイドの培養・継代を試みた。

### (2) 樹立に成功した3Dスフェロイドが有する性質の比較

3Dスフェロイドと思われる腫瘍塊の培養に成功し

たとしても、その腫瘍塊が原発卵巣腫瘍と同様の性質を持っていることが、新規治療を模索する上で重要な点となる。本研究では、原発巣の病理学的診断に用いられた免疫染色を3Dスフェロイドにも適用し、その発現パターンを比較検討した。

### (3) 腫瘍細胞が依存する $\text{NAD}^+$ 産生パスウェイの同定・阻害

どの $\text{NAD}^+$ 産生パスウェイに依存しがん細胞が増殖しているかは患者によって異なるため<sup>1</sup>、 $\text{NAD}^+$ 産生阻害を実際に臨床応用するためにはそのパスウェイを明らかにする必要がある。本研究では、NAMPT阻害剤であるGNE-617、Salvageパスウェイにおける $\text{NAD}^+$ 前駆体であるニコチンアミドモノヌクレオチド (NMN)、Preiss-Handlerパスウェイにおける $\text{NAD}^+$ 前駆体であるニコチン酸 (NA)、を組み合わせた培地で3Dスフェロイドを培養し、viability解析を行うことによって依存する $\text{NAD}^+$ 産生パスウェイの同定を試みた。さらに、GNE-617によって抗腫瘍効果が示された3Dスフェロイドを用い、腫瘍細胞内における $\text{NAD}^+$ 産生量かつATP産生量を定量した。

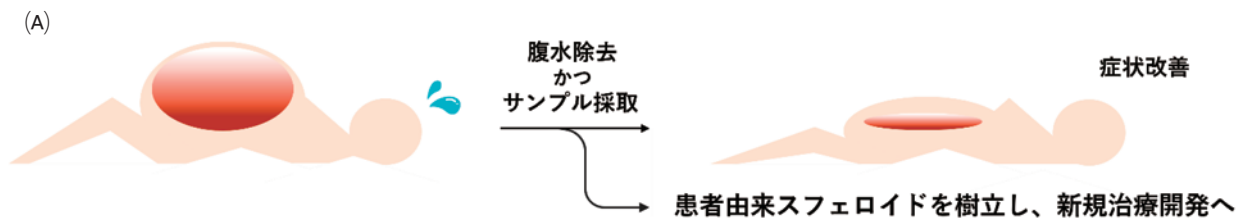
## 結果

### (1) 卵巣がん患者腹水からの3Dスフェロイド樹立

腹水を採取した23例のうち、子宮頸がん、子宮体がん、卵巣境界悪性腫瘍、ならびに乳がん・大腸がん由来の転移性卵巣腫瘍の5例を除外した。解析対象となった卵巣がん18例の内訳は、初発例11例、再発例7例であった。本研究で確立した独自プロトコルを用いることで、18例中13例 (72.2%) においてUltra-low attachment plate 上での3Dスフェロイド培養が可能であり、継代培養およびストック保存も可能であった。(図1)

### (2) 樹立に成功した3Dスフェロイドが有する性質の比較

樹立した3Dスフェロイドに対し、東北大学病院病理病態学講座の協力のもと免疫染色を実施した。原発巣は高悪性度漿液性癌、明細胞癌、類内膜癌のいずれかと診断されており、PAX8、WT-1、AE1/AE3、p53、p16、Vimentin、ER、HNF-1 $\beta$ 、Napsin A、Synaptophysin、Chromogranin Aなどの発現を評価した。その結果、いずれの3Dスフェロイドにおいても原発巣と同様の染色パターンを示し、3Dスフェロイドが原発腫瘍の病理学的特性を保持したモデルであることが示唆された。(図2)



(B)

卵巣がん No.	初回治療前か/ 再発時か	進行期 (FIGO2014)	組織型	培養・継代が 可能だったか?
1	初回治療前	III B	明細胞癌	不可
2	初回治療前	IV B	高異型度漿液性癌	可
3	再発時	IV B	高異型度漿液性癌	可
4	再発時	IV A	腺癌	可
5	初回治療前	I B	類内膜癌	不可
6	再発時	III B	明細胞癌	不可
7	初回治療前	IV A	高異型度漿液性癌	可
8	再発時	IV B	明細胞癌	可
9	再発時	IV B	高異型度漿液性癌	不可
10	再発時	IV B	高異型度漿液性癌	不可
11	再発時	III C	高異型度漿液性癌	可
12	初回治療前	III C	類内膜癌	可
13	初回治療前	III C	高異型度漿液性癌	可
14	初回治療前	IV B	高異型度漿液性癌	可
15	初回治療前	III C	高異型度漿液性癌	可
16	初回治療前	III C	高異型度漿液性癌	可
17	初回治療前	IV B	高異型度漿液性癌	可
18	初回治療前	III B	類内膜癌	可

(C)

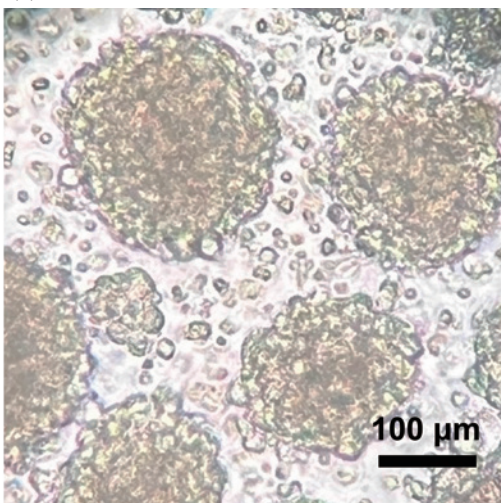
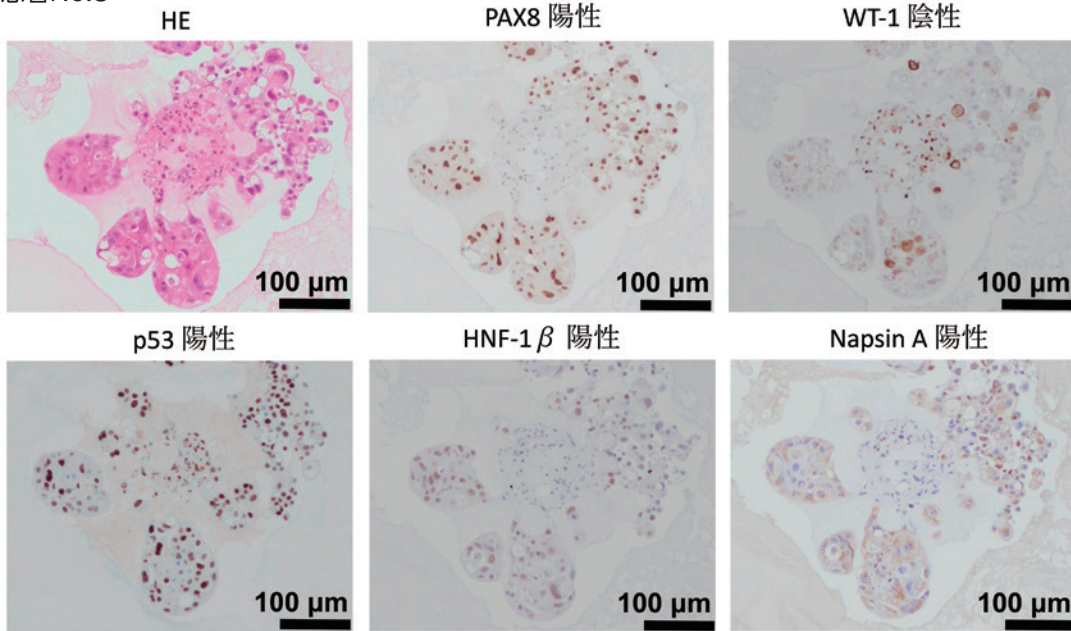


図1 卵巣がん患者腹水からの3Dスフェロイド樹立

- (A) 本研究における卵巣がん患者腹水採取および3Dスフェロイド樹立の概略図。
- (B) 腹水を採取した卵巣がん患者18例における臨床背景(初発/再発、FIGO進行期〔2014年分類〕、組織型)と、Ultra-low attachment plateを用いた3Dスフェロイドの培養・継代の可否を示す。
- (C) 患者腹水由来腫瘍細胞から樹立した3Dスフェロイドの代表的位相差顕微鏡像。スケールバー=100 μm。

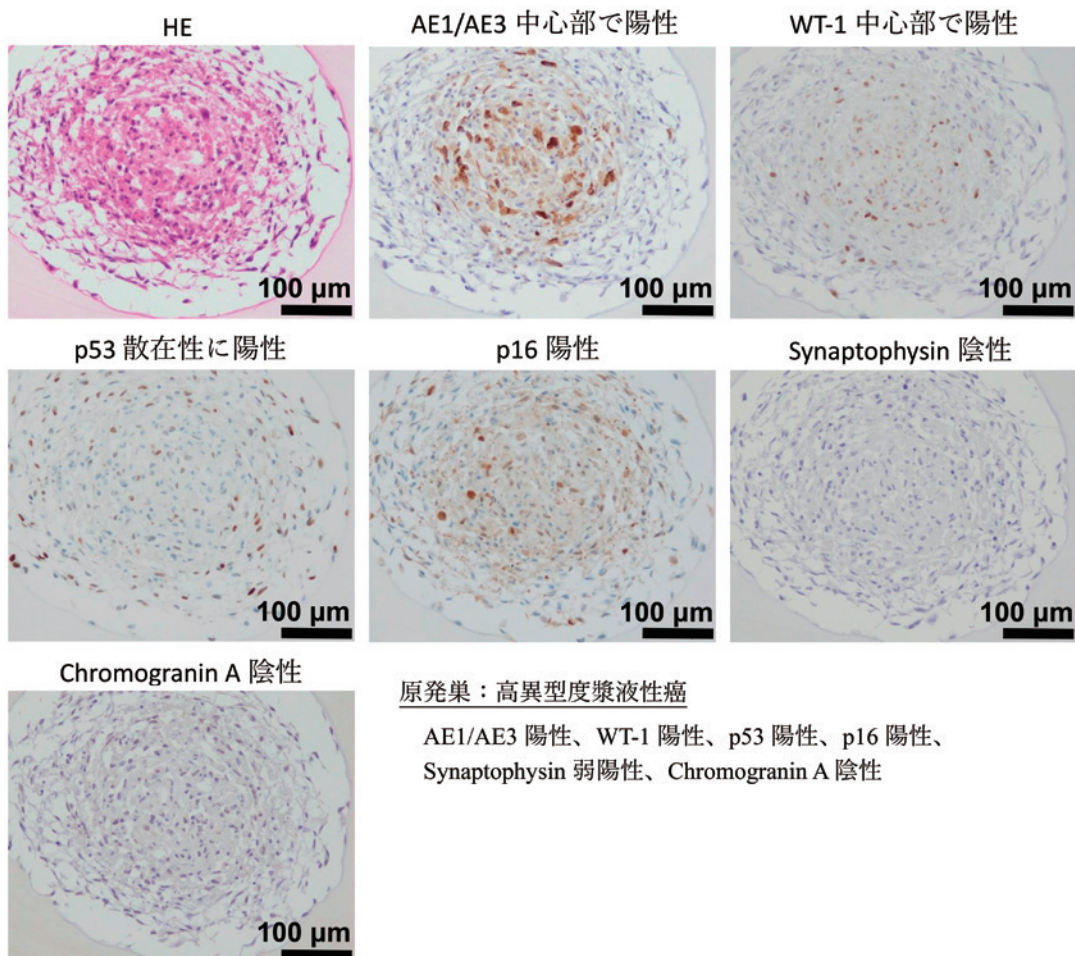
(A)  
患者No.8



原発巣：明細胞癌

PAX8 陽性、WT-1 陰性、p53 陽性、HNF-1 $\beta$  陽性、Napsin A 陽性

(B)  
患者No.17



原発巣：高異型度漿液性癌

AE1/AE3 陽性、WT-1 陽性、p53 陽性、p16 陽性、  
Synaptophysin 弱陽性、Chromogranin A 陰性

(C)  
患者No.18

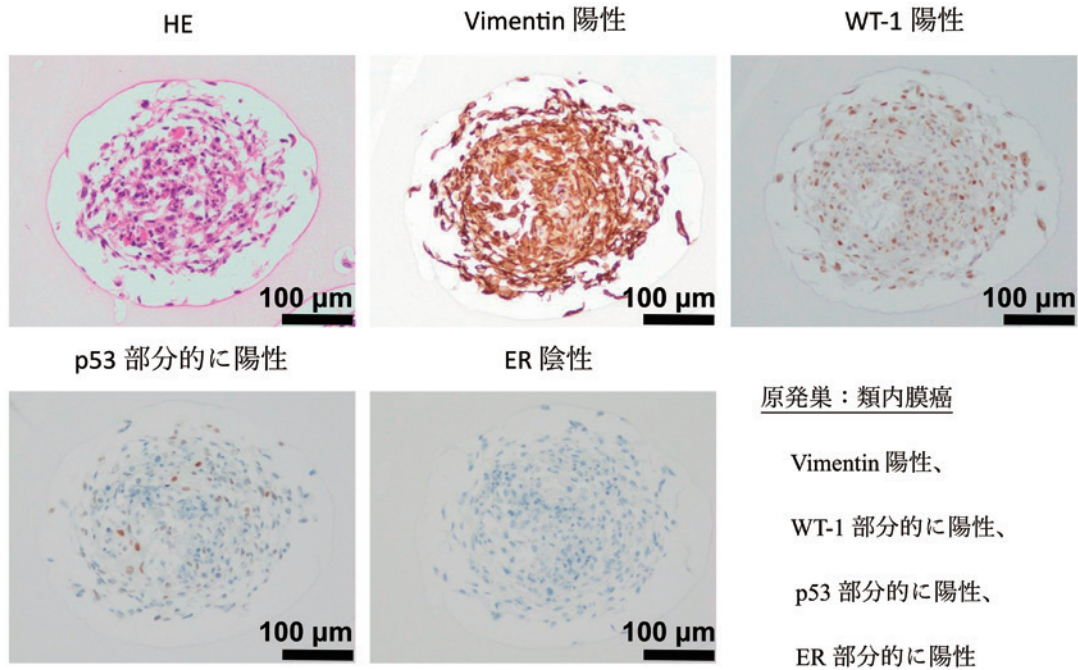


図2 卵巣がん患者腹水由来3Dスフェロイドの病理学的特徴

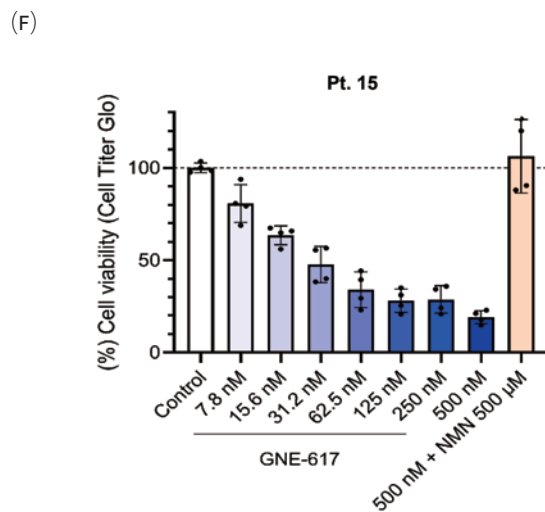
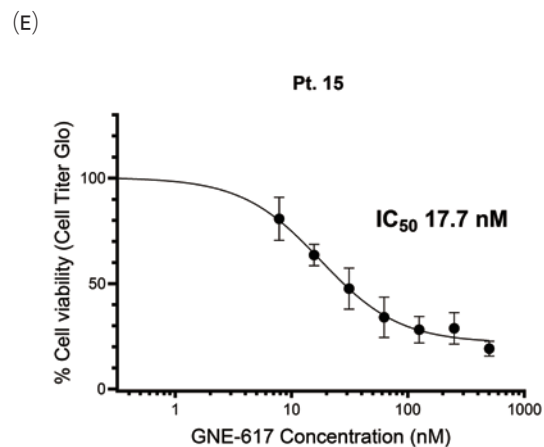
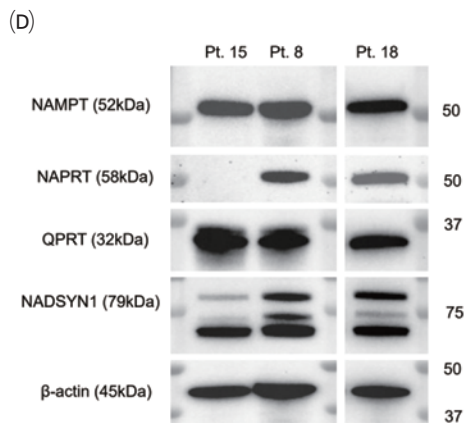
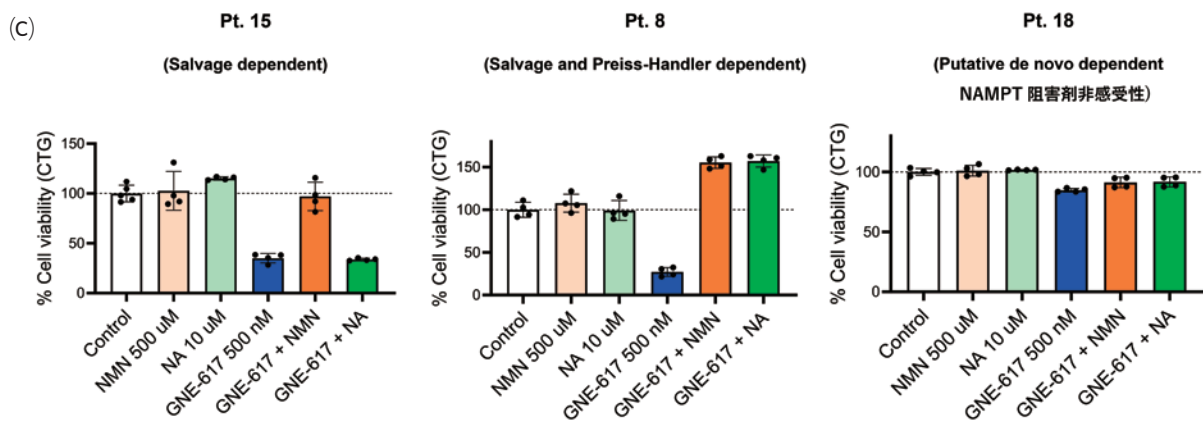
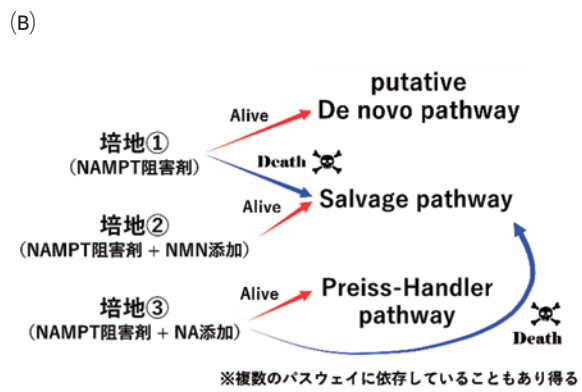
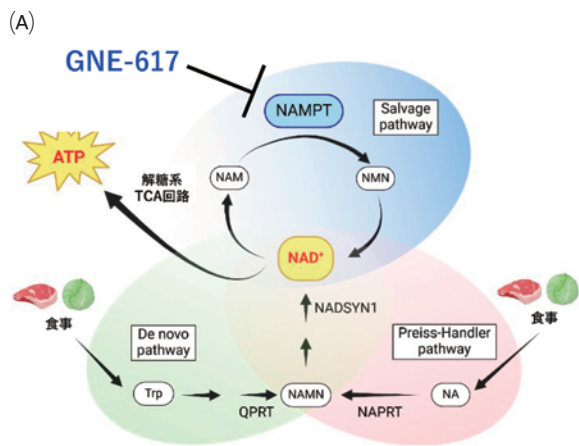
- (A) 明細胞癌（症例No.8）患者の腹水由来腫瘍細胞から樹立した3Dスフェロイドにおけるヘマトキシリン・エオジン（HE）染色および免疫染色の代表像。PAX8、HNF-1 $\beta$ 、Napsin A が陽性であり、WT-1 は陰性であった。
- (B) 高異型度漿液性癌（症例No.17）患者の腹水由来腫瘍細胞から樹立した3DスフェロイドにおけるHE染色および免疫染色の代表像。WT-1、AE1/AE3、p16 が陽性であり、p53 は散在性に陽性を示した。
- (C) 類内膜癌（症例No.18）患者の腹水由来腫瘍細胞から樹立した3DスフェロイドにおけるHE染色および免疫染色の代表像。Vimentin が陽性であり、WT-1、p53、ER は部分的に陽性を示した。

いずれの症例においても、3Dスフェロイドは原発腫瘍に対応した病理学的および免疫組織学的特徴を保持していた。スケールバー=100  $\mu$ m。

### (3) 腫瘍細胞が依存するNAD<sup>+</sup>産生パスウェイの同定・阻害

96wellのUltra-low attachment plateに腫瘍細胞を播種させた上で、NAMPT阻害剤であるGNE-617、NMN、NA、を組み合わせた培地を用い、依存するNAD<sup>+</sup>産生パスウェイの同定を試みた。GNE-617が抗腫瘍効果を示したのは13例中6例であり、全例においてNMN添加によるviabilityの回復が認められたことから、NAMPT阻害によるNAD<sup>+</sup>産生低下が示唆され、濃度依存性にNAMPT阻害による抗腫瘍効果も認められた。6例中5例ではNA添加によっても抗腫瘍効果が回復し、Salvageパスウェイに加えてPreiss-Handlerパスウェイにも依存していることが示唆された。一方、GNE-617に感受性を示さな

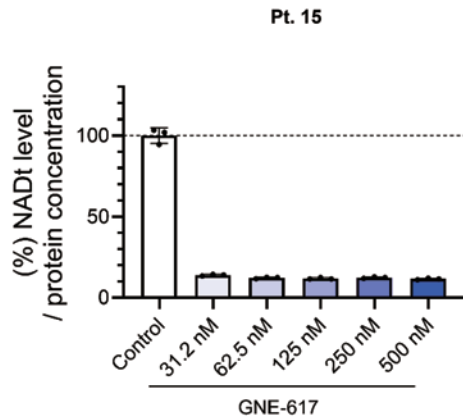
かった症例では、NMNおよびNAを添加しない通常培地条件下においてもGNE-617による抗腫瘍効果が認められず、NAMPT阻害に対する感受性を示さなかった。これらの症例では、SalvageパスウェイおよびPreiss-Handlerパスウェイへの依存性が低い可能性が示唆され、相対的にde novo NAD<sup>+</sup>合成経路への依存性が考えられた。最終的に、Salvageパスウェイのみに依存すると考えられる症例は6例中1例であった。さらに、GNE-617感受性を示した3Dスフェロイドにおいて細胞内NAD<sup>+</sup>量およびATP量を定量したところ、いずれも有意に低下しており、NAMPT阻害剤が腫瘍細胞のエネルギー代謝を抑制することで抗腫瘍効果を発揮する可能性が示唆された。(図3)



(G)

卵巣がん No.	GNE-617 感受性	依存している パスウェイ	卵巣がん No.	GNE-617 感受性	依存している パスウェイ
1	なし	相対的に de novo 依存性が示唆	10	なし	相対的に de novo 依存性が示唆
2	なし	相対的に de novo 依存性が示唆	11	なし	相対的に de novo 依存性が示唆
3	なし	相対的に de novo 依存性が示唆	12	なし	相対的に de novo 依存性が示唆
4	なし	相対的に de novo 依存性が示唆	13	なし	相対的に de novo 依存性が示唆
5	なし	相対的に de novo 依存性が示唆	14	あり	Salvage + Preiss-Handler
6	なし	相対的に de novo 依存性が示唆	15	あり	Salvage + Preiss-Handler
7	あり	Salvage + Preiss-Handler	16	あり	Salvage + Preiss-Handler
8	あり	Salvage のみ	17	あり	Salvage + Preiss-Handler
9	なし	相対的に de novo 依存性が示唆	18	なし	相対的に de novo 依存性が示唆

(H)



(I)

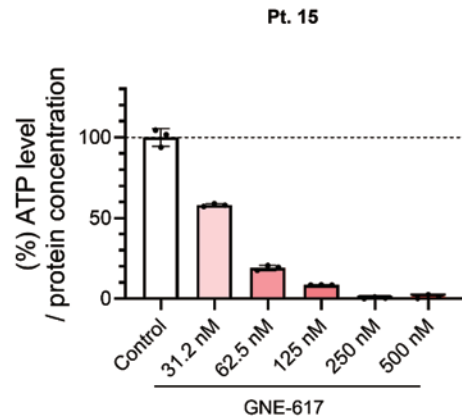


図3 卵巣がん患者腹水由来3DスフェロイドにおけるNAD<sup>+</sup>産生経路の同定とNAMPT阻害効果

- (A) NAD<sup>+</sup>産生経路の概略図。NAMPT阻害剤GNE-617は、Salvage経路における律速酵素であるNAMPTを阻害する。
- (B) 本研究における、NAMPT阻害剤およびNMN、NAを用いたNAD<sup>+</sup>産生経路の機能的同定法の概略図。
- (C) Salvage経路のみに依存していた症例（患者No.15）、Salvage経路およびPreiss-Handler経路の双方に依存していた代表例（患者No.8）、NAMPT阻害に感受性を示さず、Salvage/Preiss-Handler経路への依存性が低いと考えられた代表例（患者No.18）における3Dスフェロイドの細胞生存率（cell viability）。
- (D) (C)に示した各症例由来3Dスフェロイドにおける、NAD<sup>+</sup>産生に関与する律速酵素のタンパク発現を示す。 $\beta$ -actinをloading controlとして用いた。
- (E) Salvage経路のみに依存していた患者No.15由来3Dスフェロイドにおける、GNE-617の抗腫瘍効果をIC50として示す。
- (F) 患者No.15において、GNE-617による抗腫瘍効果がNMN添加によりレスキューされることを示す。
- (G) 腹水を採取した卵巣がん患者18例におけるNAMPT阻害剤感受性および、機能的解析に基づくNAD<sup>+</sup>産生パスウェイ依存性の分類を示す。
- (H) 患者No.15由来3Dスフェロイドにおける、GNE-617投与による細胞内NAD<sup>+</sup>量低下を示す。
- (I) 患者No.15由来3Dスフェロイドにおける、GNE-617投与による細胞内ATP産生量低下を示す。

## 考 察

卵巣がんは病勢進行に伴い、腹水貯留による腹部膨満感や重苦感といった症状を呈し、日常生活の活動性を低下させる予後不良の悪性疾患である。近年、がん代謝を標的とした新たな治療戦略の可能性が注目されているものの、卵巣がんにおける有望な代謝標的はいまだ十分に明らかになっていない。本研究では、卵巣がん患者腹水由来の3Dスフェロイドを用いることで、実臨床における腹水穿刺による症状緩和を行いつつ、腫瘍細胞が有する代謝依存性を機能的に評価できることを示した。

これまでの卵巣がん研究の多くは、2D培養細胞や腫瘍組織解析に基づいて代謝特性を評価してきた。一方で、本研究は患者腹水由来の3Dスフェロイドという、より臨床病態をリアルタイムに反映したモデルを樹立・検証した点に独自性がある。腹水中腫瘍細胞に着目した本アプローチは、卵巣がん特有の進展様式を踏まえた新しい視点を提供するものであり、卵巣がんにおける代謝標的治療の新たな方向性を提示すると考えられる。

既報より、NAD<sup>+</sup>産生阻害が有用な治療戦略となり得る可能性が示唆されてきたものの、これまでに実施された臨床試験においてNAMPT阻害薬の明確な抗腫瘍効果は示されていない<sup>3</sup>。さらに、腫瘍細胞が依存するNAD<sup>+</sup>産生経路を機能的に同定した報告は限られている。本研究の重要な点は、NAD<sup>+</sup>産生経路への依存性が症例間で大きく異なること、ならびにNAMPT阻害が一部症例において有効な抗腫瘍効果を示すことを明らかにした点にある。本研究は、これまでの臨床試験では十分に評価されてこなかったNAMPT阻害という治療戦略の可能性を支持する知見を提供するものである。

本研究にはいくつかの限界がある。症例数が限られている点や、前臨床モデルでの検証にとどまっている点は、結果の一般化に慎重な解釈を要する。また、NAD<sup>+</sup>産生経路への依存性を規定する分子機構については、今後さらなる解析が必要である。将来的には、より多くの症例解析や遺伝学的手法を組み合わせることで、本知見の妥当性を一層強化することが求められる。

本研究において、我々は患者腹水由来3Dスフェロイドを用いることで、NAD<sup>+</sup>産生経路に基づく治療層別化の重要性を示した。さらに、同スフェロイドを用いて腫瘍細胞の代謝脆弱性を個別に評価する本

アプローチは、将来的に治療反応性を事前に予測する機能的バイオマーカーとしての応用が期待でき、さらに卵巣がんにとどまらず腹水形成を伴う他のがん種への応用も期待される。これらの知見は、個別化代謝治療の実現に向けた基盤を提供するものである。

## 謝 辞

本研究の遂行にあたり、多大なご支援を賜りました、公益財団法人神澤医学研究振興財団ならびに関係者の皆様に深く御礼申し上げます。

## 引用文献

1. Kei Kudo, Yoshimi Endo Greer, Teruhiko Yoshida, et al. Dual-inhibition of NAMPT and PAK4 induces anti-tumor effects in 3D-spheroids model of platinum-resistant ovarian cancer. *Cancer Gene Ther.* 2024 May;31(5):721-735.
2. Kei Kudo, Yoshimi Endo Greer, Daniel R Crooks, et al. Targeting metabolic vulnerability by combining NAMPT inhibitors and disulfiram for treatment of recurrent ovarian cancer. *Cell Death Dis.* 2025 Apr 25;16(1):342.
3. Yichen Wei, Haotian Xiang, Wenqiu Zhang. Review of various NAMPT inhibitors for the treatment of cancer. *Front Pharmacol.* 2022 Sep 7;13:970553.

## **Abstract**

Ovarian cancer is a highly lethal malignancy that frequently develops malignant ascites during disease progression, leading to abdominal distension and discomfort that markedly impair activities of daily living. Although cancer metabolism has emerged as a promising source of novel therapeutic targets, clinically actionable metabolic vulnerabilities in ovarian cancer remain insufficiently defined. We previously focused on three-dimensional (3D) spheroids, which recapitulate tumor cell aggregates present in ascites, and demonstrated that these spheroids exhibit elevated NAD<sup>+</sup> production capacity. However, NAD<sup>+</sup> can be generated through multiple metabolic pathways, posing a major challenge for clinical translation, as it requires identification of the specific NAD<sup>+</sup> biosynthetic pathway on which each patient's tumor cells depend. In this study, we established 3D spheroids from ascites-derived tumor cells obtained from patients with ovarian cancer and systematically identified the NAD<sup>+</sup> biosynthetic pathways supporting spheroid viability. By selectively inhibiting these pathways, we evaluated the feasibility of targeting NAD<sup>+</sup> production as a novel therapeutic strategy in ovarian cancer.

Ascites samples were collected from approximately 20 patients with ovarian or fallopian tube cancer by December 2025, achieving successful tumor cell culture, serial propagation, and spheroid formation in over 70% of cases. Importantly, we delineated patient-specific dependencies on distinct NAD<sup>+</sup> biosynthetic pathways and experimentally identified subsets of patients for whom NAD<sup>+</sup> production inhibition may be therapeutically effective. Collectively, this study demonstrates that ascites-derived 3D spheroids provide a powerful platform for real-time assessment of tumor metabolic heterogeneity and support the development of personalized metabolic therapies. Beyond sample acquisition, this approach may also contribute to symptom relief associated with ascites and holds potential applicability across multiple ascites-forming malignancies.