

令和元年6月5日現在

機関番号：12601

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2016～2018

課題番号：16K10014

研究課題名(和文) AYA世代のがん発症に関わる標的分子の探索と治療戦略の確立

研究課題名(英文) STAT3 inhibitor, cucurbitacin I, exerts growth-suppressive effects against neuroblastoma cells

研究代表者

樋渡 光輝 (Hiwatari, Mitsuteru)

東京大学・医学部附属病院・講師

研究者番号：40597126

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)：神経芽腫に対するスクリーニングでは、450種類の分子標的療法に用いられる低分子化合物ライブラリーを用い、神経芽腫細胞株20株に対して検討した結果、STAT3阻害剤であるcucurbitacin Iが抗腫瘍効果を持つ事を見出した。神経芽腫ではALK阻害剤のcrizotinibがALK F1174L変異を持つものでは効果がない。STAT3はALKの下流シグナルであることから、ALK変異を伴う神経芽腫に対してcrizotinibの効果はないものでも、その下流のSTAT3を阻害することで抗腫瘍効果を持つと考えられた。

研究成果の学術的意義や社会的意義

従来の化学療法を強化するのみでは難治例白血病や固形腫瘍のような小児がんに対する生存率の改善の期待はできない、更に晩期合併症による生活の質の低下も懸念される。本研究ではSTAT3阻害剤が神経芽腫に対して抗腫瘍効果を認めており、STAT3が神経芽腫のある部分では特異分子として考えられ、直接の標的とする分子標的療法の開発が、それまで難治性であった神経芽腫の生存率を大きく向上させ、また晩期合併症の軽減にも有用であると期待される。本研究の成果が実用化されれば、がん克服者の晩期障害の軽減が達成可能となり、医療費や医療資源の削減が達成され、社会福祉といった観点からも大きな効果がある。

研究成果の概要(英文)：We implemented a high throughput chemical screen in 23 neuroblastoma-derived cell lines, using a curated library of ~450 compounds. We evaluated the therapeutic effects of crizotinib and its combined treatment with JAK-STAT inhibitor (cucurbitacin I) in neuroblastoma cell lines.

In the drug screen, JAK-STAT kinase inhibitor (cucurbitacin I) was the most discriminatory with regard to sensitivity for ALK-mutated cell lines. In neuroblastoma cell lines harboring F1174L or R1275Q-mutated ALK, crizotinib combined with cucurbitacin I enhanced tumor responses and showed synergistic cytotoxicity. Analysis of downstream molecules through MAPK, AKT and STAT3 pathways showed that TGW, a cell line harboring R1275Q-mutated ALK, expressed lower levels of pERK, pAKT and pSTAT3 in combination therapy compared with cells treated with cucurbitacin I or crizotinib alone.

研究分野：小児血液・腫瘍学

キーワード：神経芽腫 STAT3 cucurbitacin I

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19、CK - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

Adolescents and Young Adults = 「AYA」世代と称される 15-29 歳の患者は小児と成人の境界であり、この世代の悪性腫瘍に関する研究は他の世代の悪性腫瘍に比べ進んでおらず、治療成績の改善も乏しい。しかし、本邦の人口動態統計では AYA 世代の死因は悪性新生物が第 3 位を占めており、この世代においても悪性腫瘍の克服は重要な課題である。一方で、AYA 世代の悪性腫瘍の種類は他の世代のがんと異なるだけでなく、同じ疾患であっても固有の分子病態の基盤を背景にしており、AYA 世代のがんをひとつの独立した疾患概念ととらえて取り扱う必要があると必要と考えられる

2. 研究の目的

Adolescents and Young Adults = 「AYA」世代と称される 15-29 歳の患者の悪性腫瘍に関する分子病態研究は他の世代に比べ進んでおらず、治療成績の改善にも乏しい。

AYA 世代の様々ながんの臨床検体を用い、がん細胞に生じている DNA・RNA の配列異常および構造異常を包括的に把握し、その生物学的特性をより詳細に明らかにすることを目的とする。

本研究の成果は、AYA 世代に生じたがんの固有の分子遺伝学的特性を明らかにし、病態の理解を深め、より適正化された治療戦略の確立につながることを期待される。

3. 研究の方法

本研究では、年長児発症の神経芽腫をはじめとした AYA 世代の腫瘍発生の分子病態を明らかにし、治療標的を同定するために、次世代シーケンサーを用いた exome シーケンス、RNA シーケンスおよび全ゲノムシーケンセスといったハイスループットシーケンセスを用いて、包括的なゲノムスキニングを行う。対象とする疾患は、年長児神経芽腫、年長児肝芽腫および思春期白血病とする。抽出された候補遺伝子に関しては、多数検体における頻度の検証を行うことで候補を絞り、発現ベクターを用いた機能解析を行う。さらに、ゲノムデータを統合し、AYA 世代腫瘍特有の genetic landscapes を作成し、分子診断、治療の層別化への応用を試みる。

4. 研究成果

本研究に用いた RNA シーケンスの予備実験として乳児 ALL 症例を解析し、*ARID5B-MLL* 融合遺伝子を同定した (Hiwatari, *Oncol. Lett.* 2017)。既報では、*ARID5B* の遺伝子多型は、小児高 2 倍体性 B 前駆細胞型 ALL の発症リスクに寄与していることが示されている。このことから、*ARID5B-MLL* 融合遺伝子は、この症例の白血病発症に関与していることが予想され、機能解析を行うことによって白血病発症のメカニズムの一つを明らかにすることができると期待している。また、神経芽腫臨床検体から *TLN1-USP34* 融合遺伝子、IMR-32 細胞株から *CPSF6-SRSF1* 融合遺伝子をはじめとした複数の新規融合遺伝子を同定した。これまで、神経芽腫発症には融合遺伝子が関与するという概念はなく、本検討で見出された融合遺伝子の機能解析は、神経芽腫発症の全く新しいメカニズムを明らかにできる可能性がある。

さらに今回、新たに神経芽腫に対する低分子化合物ライブラリーを用いたスクリーニングでの予備実験では、450 種類の分子標的療法に用いられる低分子化合物ライブラリーを用い、神経芽腫細胞株 20 株に対して検討した結果、STAT3 阻害剤である cucurbitacin I が抗腫瘍効果を持つ事を見出した。当研究室ではマイクロアレイをもちいて神経芽腫における *ALK* チロシンキナーゼ変異を同定し、神経芽腫発症に関与している事を突き止めた。しかし、神経芽腫では *ALK* 阻害剤の crizotinib が *ALK F1174L* 変異を持つものでは効果がなく、新規分子標的療法の開発が急務である。STAT3 は *ALK* の下流シグナルであることから、*ALK* 変異を伴う神経芽腫に対して crizotinib の効果はないものでも、その下流の STAT3 を阻害することで抗腫瘍効果を持つと考えられた。また、STAT3 阻害剤以外にも低分子化合物ライブラリーから survivine、Auroa、PDGFR、HIF-1、proteasome 阻害剤などが神経芽腫細胞に対し、抗腫瘍効果があることを見出した。今後その阻害メカニズムを検討していくことで、新規分子標的療法の開発に本研究は繋がる。

5 . 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計 2 件)

1. Hiwatari M, Seki M, Akahoshi S, Yoshida K, Miyano S, Shiraishi Y, Tanaka H, Chiba K, Ogawa S, Takita J. Molecular studies reveal MLL-MLLT10/AF10 and ARID5B-MLL gene fusions displaced in a case of infantile acute lymphoblastic leukemia with complex karyotype. *Oncol Lett.* 2017. 14(2295-2299).
2. 樋渡光輝. 神経芽腫に対する新規分子標的療法の探索. *The Japanese Journal of Pediatric Hematology/Oncology* 2017. 54(1-7).

〔学会発表〕(計 8 件)

1. Hiwatari M, Watanabe K, Kubota Y, Kimura S, Takita J: Identification of Novel Pathways and Small Molecules Able to Down Regulate Oncogenes Expression By Compounds Screening Approaches in Acute Leukemia and Neuroblastoma Cells. 60th ASH Annual Meeting & Exposition, San Diego, 2018/12/01
2. Hiwatari M, Watanabe K, Kimura S, Takita J: Synergistic activity of ALK and STAT3 inhibitors for the treatment of ALK mutated neuroblastoma cells. The 50th Annual Congress of the International Society of Paediatric Oncology, Kyoto, 2018/11/15
3. 樋渡光輝, 木村俊介, 渡邊健太郎, 関口昌央, 久保田泰央, 滝田順子: STAT3 阻害剤 cucurbitacin I は T-ALL の増殖を抑制する, 第 60 回日本小児血液・がん学会学術集会, 京都, 2018/11/16
4. 樋渡光輝, 渡邊健太郎, 木村俊介, 関口昌央, 久保田泰央, 岡 明, 滝田順子: 造血器および固形腫瘍における STAT3 阻害剤、cucurbitacin I の抗腫瘍効果の検討, 第 80 回日本血液学会学術集会, 大阪, 2018/10/13
5. Hiwatari M, Seki M, Kimura S, Sekiguchi M, Kubota Y, Watanabe K, Takita J: Synergistic effects of ALK and STAT3 inhibitors on ALK mutated neuroblastoma cells, *Advances in Neuroblastoma Research 2018*, San Francisco, 2018/05/12
6. Hiwatari M, Seki M, Sekiguchi M, Kimura S, Kubota Y, Watanabe K, Oka A, Takita J: STAT3 inhibitor, Cucurbitacin I, synergies with crizotinib in vitro preclinical models of Neuroblastoma. 第 59 回小児血液・がん学会学術集会, 松山, 2017 年 11 月 9 日 ~ 11 日
7. Hiwatari M, Seki M, Takita J: Identification of novel pathways and molecules by in vitro drug screening approaches in pediatric cancers. 第 58 回日本小児血液・がん学会学術集会, 東京, 2016 年 12 月 16 日 ~ 18 日
8. Hiwatari M, Seki M, Oka A, Takita J: Identification of novel pathways and molecules able to down regulate oncogenes expression by in vitro drug screening approaches in neuroblastoma cells. *ANR, Cairns*, June 19-23, 2016

〔図書〕(計 件)

〔産業財産権〕

出願状況 (計 件)

名称:

発明者：
権利者：
種類：
番号：
出願年：
国内外の別：

取得状況（計 件）

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
取得年：
国内外の別：

〔その他〕
ホームページ等

6．研究組織

(1)研究分担者

(2)研究協力者

研究協力者氏名：滝田 順子
ローマ字氏名：Taki ta Junko

科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属されます。