

令和元年6月16日現在

機関番号：32620

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2016～2018

課題番号：16K20070

研究課題名(和文) 骨巨細胞腫の発現データベース構築に基づいた新規治療法開発

研究課題名(英文) Development of a new treatment based on the construction of expression database of giant cell tumor of bone

研究代表者

大久保 武人 (OKUBO, TAKETO)

順天堂大学・医学部・助教

研究者番号：90732884

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,000,000円

研究成果の概要(和文)：難治性かつ希少がんである骨巨細胞腫(GCTB)の治療成績の改善を目指し、その要となる腫瘍悪性度・治療抵抗性の機序について特定し、悪性度・治療奏功性に関するバイオマーカーの同定及び、新規治療分子標的の開発を進めた。近年GCTBの新規治療薬として開発されたDenosumabの治療効果予測や著効症例の作用機序解明のために、GCTBの悪性度及びDenosumab治療反応性に関わる生物学的な特徴のタンパク質プロファイリングを行い、特に組織学的硬化に関連するタンパク質発現データベース構築とDenosumab治療の効果判定や予後予測のバイオマーカー候補となりうるタンパク質の同定にも成功した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

骨巨細胞腫の新規治療薬であるDenosumabの治療反応性に関わる生物学的特徴のタンパク質プロファイリング・データベース構築と治療効果判定や予後予測のバイオマーカー候補となりうるタンパク質同定の成功の報告は世界初であり、今後の骨巨細胞腫の病態理解と治療法開発に道筋を示しうる有力な成果である。

本研究より開発されたバイオマーカーによりDenosumab治療の効果判定や予後予測が可能になるのみならず、データベースより同定されたタンパク質が骨巨細胞腫のさらなる新規治療薬開発に結びつく可能性もあり、骨巨細胞腫患者の治療成績向上に期待ができると考えている。

研究成果の概要(英文)：Giant cell tumors of bone (GCTB) are locally aggressive osteolytic bone tumors. Some studies have recently reported that denosumab is a novel and effective therapeutic option for GCTB. But, the prediction of treatment effect and the mechanism in GCTB are still unknown. Therefore, we constructed a profiling database of biological characteristics related to the grade of GCTB and the denosumab therapeutic response.

Histologically, the post-denosumab-treated samples were characterized by two lesions: SL-lesion, and FO-lesion. In this study, to clarify the differences in the protein expression between two lesions, we conducted comparative proteomic studies (12 pairs of pre- and post-denosumab treatment samples). We succeeded in constructing a protein expression database related to the fibro-osseous reactions by denosumab treatment. Based on the results, we also succeeded in determining the potential proteins that could be the biomarker for treatment evaluation and prognosis prediction.

研究分野：骨軟部腫瘍

キーワード：骨巨細胞腫 Denosumab バイオマーカー

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

### 1. 研究開始当初の背景

骨巨細胞腫 (Giant cell tumor of bone: GCTB) は良性骨腫瘍に分類されていたが、高頻度に再発をし関節機能障害をもたらしたり、1-2%の頻度で悪性転化を生じ予後不良な転機をたどる症例もあり、2013年のWHO分類より中間型悪性に分類されるようになった。現在の治療法としては主に手術療法であり、搔爬術又は搔爬術で腫瘍がコントロール不能な症例や頻回再発症例に対しては切除術を行うが、将来的な再発や転移の有無を含めた予後の予測は、現在の単なる病理組織学的観察からは困難であり、最善の治療法の選択プロトコールは定まっていない。

申請者を含む研究グループは、2010年よりGCTBの悪性転化及び再発に関するバイオマーカーの開発を目的とした研究を行い、現在までに *p53* 変異と再発・転移予測の可能性やContiらによってGCTBの予後マーカーとして報告されたGluthathione Peroxidase 1(GPX-1)の発現とGCTBの予後や病理学的特徴との関連を報告してきた(Saito et al. Human Pathol, 2011; Saito et al. Pathol Res Pract, 2011)。

一方、GCTBは組織学的には、Receptor activator of NF- $\kappa$ B ligand (RANKL)を高発現する単核の腫瘍細胞の増殖を背景にして、RANKLの受容体であるRANKを発現する破骨型巨細胞の均一に分布する増殖を特徴とするが、このRANKL-RANKシグナル伝達経路の活性化による破骨型巨細胞が骨破壊を伴うGCTBの本態であるとされている。近年GCTBの分子標的治療薬として、抗RANKL抗体であるDenosumabが開発され一定の治療効果が報告され始めている。申請者らもGCTBに対してDenosumabを用いた症例を数例経験し、臨床的な腫瘍増大・骨吸収像の抑制効果と病理組織学的にRANKを発現していた多核巨細胞の消失・反応性の骨形成を確認している。しかしながらDenosumab使用前後の病理組織学的特徴の変化と治療効果は個体間で差異が見られており、Denosumab治療奏功性に関する詳細な遺伝学的・分子生物学的背景は未だ不明である。

GCTBの治療成績向上のためには、

(1) GCTBの悪性度及びDenosumab治療反応性に関わるタンパク質レベルでの発現データベースの構築

(2) それらで同定されたGCTBの悪性度及び治療反応性に関わる分子生物学的機能解析やネットワークの解明

が重要であると考え、我々はDenosumab使用前後のGCTB検体を用いてプロテオミクス分析を行い、GCTBの骨溶解過程とDenosumabの治療効果において重要な機能的役割を果たすタンパク質を同定し報告してきた。引き続きGCTBの治療成績向上のためにはバイオマーカーの同定や新規治療分子標的の開発を大規模検証の基に進めることが重要であると考え研究を行った。

### 2. 研究の目的

本研究は、GCTBの腫瘍発生・再発・悪性転化の機序についての解析を行い、再発・転移に関する予後予測マーカーの同定及び、新規治療分子標的の開発を行った。特に、GCTBの分子標的治療薬として使用され始めたDenosumabのターゲットであるRANKL-RANKシグナル伝達経路のGCTBにおける解明を目的に、主にタンパク質の網羅的発現解析を用い、GCTBにおける予後規定因子・Denosumabに対する治療反応性に関する因子を同定し、これらに対し遺伝学的・分子生物学的機能解明を加えることにより、GCTBの治療成績の向上を目指すことを目的とした。

### 3. 研究の方法

本研究は順天堂大学整形外科・人体病理病態が共同し、2年の研究計画で進めた。

本研究は申請者を中心に研究連携者として、順天堂大学整形外科学(末原義之\_\_臨床一般・タンパク質発現解析・一般的機能解析を専門)・人体病理病態学(齋藤剛\_\_病理診断・遺伝子変異発現解析・細胞生物学全般の機能解析を専門)及び、研究協力者として、順天堂大学整形外科学(窪田大介、向井原健太、赤池慶祐、石井翠)のサポートの下に研究遂行した。

研究対象と実施環境については、凍結手術検体等は、順天堂大学内の骨軟部腫瘍バイオバンク、大規模発現検証に必要なFFPE(パラフィン検体)は人体病理病態学のライブラリーを使用した。機器については、1)タンパク質発現解析は、順天堂大学の研究基盤センターに各種質量分析計等を使用した。特にタンパク質発現解析は、i-TRAQ(isobaric tags for relative and absolute quantification)で行った。2)遺伝子発現・変異解析・機能解析及びネットワーク解析は、順天堂大学整形外科教室、病理学教室、共同機器室の器機及びシステムを使用した。

(1)GCTBの凍結手術検体を使用した網羅的タンパク質発現解析:

様々な観点からのGCTBの生物学的な特徴をプロファイリングするために、凍結手術検体を用いて網羅的なタンパク質発現解析を行った。本研究では特にDenosumab使用後の病理組織学的特徴が主に2つの病変、すなわち数個の多核巨細胞を伴う残存間質細胞病変(SL病変)および線維性骨病変(FO病変)によって特徴付けられることに注目し、Denosumab使用後の凍結手術検体セットを用いてタンパク質のプロファイリングを作成した。その結果よりDenosumab使用後の病理組織学的特徴を規定するタンパク質を同定し、治療・予後関連バイオマーカーの

開発を進めた。

方法：

凍結手術検体から目的に応じたタンパク質抽出を行った。検体全例で臨床病理データを収集した。

プロテオミクス：比較する両群間での定量的なタンパク質発現プロファイルを作成するために、iTRAQ (isobaric tags for relative and absolute quantification)を方法として用い、Mass Spectrometry ベースで約 2000 個のタンパク質(20000 のアミノ酸フラグメント)の観察を行った。

獲得されたタンパク質プロファイリングは IPA (The Ingenuity Pathway Analysis software program (Ingenuity Systems, Redwood City, CA)) を使用したネットワーク解析を行い、各検討項目に対してタンパク質ネットワーク解析を行った。

同定されたタンパク質については特異抗体を使用したウエスタンブロット・免疫染色にて発現を確認した。

免疫染色にて発現差を確認できたタンパク質については、バイオマーカーとしての有効性を確認するために、骨巨細胞腫の FFPE データセットを使用し、タンパク質発現の大規模検証を行った。

上記に引き続き追加機能解析を行った。

#### 4 . 研究成果

##### (1)GCTB の凍結手術検体を使用した網羅的タンパク質発現解析

Denosumab 使用後に SL 病変を有した 4 症例から 8 対の試料および FO 病変を有した 2 症例から 2 対の試料、合計 10 対の試料を得てタンパク質抽出を行った。

iTRAQ を実施し、そして各分析において約 1500~2200 のタンパク質を同定した。

SL 病変については、最終的に Denosumab 使用前後のサンプルで差次的に発現された 8 つのタンパク質プロファイルを取得した。各 8 タンパク質プロファイルの比較による Denosumab 使用前後の有意に発現変化のあったタンパク質数は、それぞれタンパク質プロファイル A: 263 (P<0.05)、タンパク質プロファイル B:281 (P<0.05)、タンパク質プロファイル C:334 (P<0.05)、タンパク質プロファイル D:174 (P<0.05)、タンパク質プロファイル E:180 (P<0.05)、タンパク質プロファイル F:212 (P<0.05)、タンパク質プロファイル G:222 (P<0.05)、タンパク質プロファイル H:225 (P<0.05)であった。

FO 病変については差次的に発現される追加の 4 つのタンパク質プロファイルを取得した。各タンパク質プロファイルの比較による Denosumab 使用前後の有意に発現変化のあったタンパク質数はそれぞれタンパク質プロファイル I: 202 (P<0.05)、タンパク質プロファイル J:154 (P<0.05)、タンパク質プロファイル K:140 (P<0.05)、タンパク質プロファイル L:113(P<0.05)であった。

SL 病変のデータセットでは、8 つのタンパク質プロファイル (プロファイル A~H) のうち、Denosumab 使用前サンプルと比較して使用后サンプルにおいて 32 のタンパク質の発現に差が見られた、うち 19 は下方制御、13 は上方制御であった。FO 病変のデータセットでは、4 つのタンパク質プロファイル (プロファイル I~L) のうち、Denosumab 使用前サンプルと比較して使用后サンプルにおいて 59 のタンパク質の発現に差が見られた、うち 27 は下方制御、32 は上方制御であった。

SL 病変データセットおよび FO 病変データセットを含む複合分析では、12 個のタンパク質プロファイルのうち、11 個のタンパク質 (ACON、CAH2、ENPL、G3P、KCRB、SERPH の 6 個が下方制御され、ALBU、CO3、HEMO、LUM、TRFE の 5 個が上方制御された) が 2 群間で重複していた。その一方で、SL 病変データセット内の 21 個のタンパク質 (RCN1、TCPG、VATA、VATE1、VATB2、AHNK、FLNA、IGHG3、IGHG1、IGKC、A1AT、LMNA、EF2、ECHA、IDHP、PLSL、CYC、CYTB、MMP9、PPA5、TPM3) および FO 病変データセット内の 48 個のタンパク質 (HMGB1、PDIA4、CALR、PDIA1、HS90B、TAGLN、CALX、NUCL、GLU2B、XRCC6、TBA1B、PPIB、HS90A、S10A4、TYPH、ENOA、HSP7C、DPYL3、PDIA3、GANAB、ACTN4、CD109、PEBP1、COR1A、VIME、APOA4、ZA2G、PRDX2、FIBB、AACT、A1BG、CERU、VTDB、HPT、HRG、PEDF、A2MG、CAH1、ANT3、A1AG1、HBD、PPBT、APOA2、HBA、APOA1、A1AT、C01A2) は独立して発現していた。特に、これらの 21 個のタンパク質は SL 病変データセットにのみ出現しており、GCTB における Denosumab 治療による線維性骨反応の過程において重要な役割を果たしていることが示唆されると共に、これらのタンパク質は GCTB における Denosumab 治療効果を予測するバイオマーカーとなりうる可能性を秘めていると考えた。

IPA を用いて得られたタンパク質発現プロファイルのネットワーク分析を行った。各タンパク質プロファイルに対して独立した IPA を実施した。LXR/RXR 活性化、急性期反応シグナル伝達および FXR/RXR 活性化は、SL 病変と FO 病変の間の共通の重要な経路として同定された。また上皮細胞におけるタンパク質応答とアルドステロンシグナル伝達は FO 病変において独立して同定された。

得られたプロファイリングのタンパク質発現を検証するために、抗 TPM3 抗体を用いて

SL 病変および FO 病変サンプルに対してウエスタンブロッティングを行ったところ、SL 病変が治療前および FO 病変よりも TPM3 の発現が高いことが判明した。また抗 NUCL 抗体を用いて SL 病変および FO 病変サンプルに対してウエスタンブロッティングを行ったところ、FO 病変が治療前の発現と比べて低下していることが判明した。これらの結果はこれまでのタンパク質プロファイリングと一致しており、プロテオーム解析の正確さを示していると考えた。

以上の成果より我々は GCTB に対する Denosumab 治療効果に関与しているタンパク質プロファイルを同定した。その結果から Denosumab 治療の効果判定や予後予測のバイオマーカー候補となりうるタンパク質の同定にも成功した。今後はバイオマーカー候補タンパク質も病理組織内での動態やその有用性を病理検体と臨床データを用いて解析していく予定である。

## 5 . 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計 12 件)

- ①Kurihara T, Suehara Y, Akaike K, Hayashi T, Okubo T, Kim Y, Takagi T, Kaneko K, Yao T, Saito T. Squamous cell carcinoma arising from chronic osteomyelitis massively expanding into the medullary cavity: A case report. (Human Pathology Case reports 16: 100289 2019)
- ②Saito T, Motoi T, Suehara Y, Takagi T, Okubo T, Kurihara T, Hayashi T, Kudo T, Maruyama Y, Kaneko K, Yao T. Fibrocartilaginous mesenchymoma of the tibia with predominant microcystic features: A case report and literature review (Human Pathology Case reports 16: 100288 2019)
- ③Ishii M, Suehara Y\*†, Kohsaka S, Tanabe Y, Hayashi T, Kazuno S, Tanabe Y, Akaike K, Mukaiharu K, Kim Y, Okubo T, Takamochi K, Takahashi F, Kaneko K, Saito T. Proteomic signatures corresponding to the SS18/SSX fusion gene. (Oncotarget 9:37509-37519 2018)
- ④Suehara Y, Akaike K, Mukaiharu K, Kurisaki-Arakawa A, Kubota D, Okubo T, Mitomi H, Mitani K, Takahashi M, Toda-Ishii M, Taguchi T, Takagi T, Kaneko K, Yao T, Saito T. KCTD12 may be negatively regulated by KIT in gastrointestinal stromal tumors. (Oncotarget 9:27016-27026, 2018)
- ⑤Tanabe Y, Suehara Y\*, Kohsaka S, Hayashi T, Akaike K, Mukaiharu K, Kurihara T, Kim Y, Okubo T, Ishii M, Kazuno S, Kaneko K, Saito T. IRE1α-XBP1 inhibitors exerted anti-tumor activities in Ewing's sarcomas. (Oncotarget 9:14428-14443. 2018)

〔学会発表〕(計 6 件)

- ①Hayashi T, Kohsaka S, Takamochi K, Takahashi F, Suehara Y, Saito T, Suzuki K, Mano H, Yao T. Clinicopathological characteristics of lung adenocarcinoma with EGFR compound mutations. USCAP, the 2019 Annual Meeting, March 16-21, National harbor, Maryland, USA
- ②Sasa K, Suehara Y, Akaike K, Hayashi T, Taka H, Youngji K, Okubo T, Kaneko K, Saito T. Metabolic fluctuations in adriamycin-resistant osteosarcomas using metabolomic approaches the 65th Annual Meeting of the Orthopaedic Research Society Feb 2-5 2019, Austin, USA
- ③Kurihara T, Suehara Y, Hayashi T, Akaike K, Okubo T, Kim Y, Kaneko K, Saito T. IRE1α-XBP1 Inhibitor exerts antitumor activity in osteosarcoma. the 64th Annual Meeting of the Orthopaedic Research Society Feb 2-5 2019, Austin, USA
- ④Suehara Y, Kohsaka S, Kurisaki A, Akaike K, Hayashi T, Mogushi K, Okubo T, Kim Y, Sato S, Kobayashi E, Kaneko K, Mano H, Saito T. Comprehensive mRNA-based screen for tyrosine kinase fusions and a de novo alternative transcription initiation site in soft tissue sarcomas. European Society For Medical Oncology – ASIA, Nov 23-25th 2018, Singapore
- ⑤Kurihara T, Suehara Y, Hayashi T, Akaike K, Okubo T, Kim Y, Kaneko K, Saito T. IRE1α-XBP1 Inhibitor exerts antitumor activity in osteosarcoma. Connective Tissue Oncology Society, 23th Annual Meeting, November 14 - 17, 2018, Roma, Italy

## 6 . 研究組織

(1)研究分担者  
なし

(2)研究協力者

研究分協力者氏名：末原 義之

ローマ字氏名：(Yoshiyuki, SUEHARA)

研究分協力者氏名：齋藤 剛  
ローマ字氏名：(Saito, Tsuyoshi)

研究協力者氏名：林 大久生  
ローマ字氏名：(Hayashi, Takuo)

研究協力者氏名：窪田 大介  
ローマ字氏名：(Kubota, Daisuke)

研究協力者氏名：向井原 健太  
ローマ字氏名：(Mukaihara, Kenta)

研究協力者氏名：赤池 慶祐  
ローマ字氏名：(Akaike, Keisuke)

研究協力者氏名：田邊 雄  
ローマ字氏名：(Tanabe, Yu)

研究協力者氏名：石井 翠  
ローマ字氏名：(Ishii, Midori)

研究協力者氏名：栗原 大聖  
ローマ字氏名：(Kurihara Taisei)

研究協力者氏名：佐野 慶  
ローマ字氏名：(Sano Kei)

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。