

令和 3 年 5 月 13 日現在

機関番号：17102

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2018～2020

課題番号：18K09067

研究課題名(和文) Precision medicineによる、軟部肉腫の薬剤耐性克服法の開発

研究課題名(英文) Development of the treatment of drug resistance of soft tissue sarcoma by precision medicine

研究代表者

松本 嘉寛 (Matsumoto, Yoshihiro)

九州大学・医学研究院・准教授

研究者番号：10346794

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,400,000円

研究成果の概要(和文)：悪性骨軟部腫瘍、特に軟部肉腫の抗腫瘍薬に対する耐性化が大きな問題である。本課題では、悪性骨軟部腫瘍の生物学的特性について研究を行い、特に薬剤耐性の観点からみたPrecision Medicineの基盤について、以下の3点を中心とした研究成果を得た。(1)軟部肉腫における代表的な治療薬であるeribulin (Eri)に対する効果が、末梢血免疫関連マーカーを用いて予測可能であること。(2)Beta-tubulin3の発現がEriの薬剤耐性のバイオマーカーとなること(3)骨巨細胞腫において、 $\beta$ -cateninの核内移行を評価することで、抗RANKL抗体投与後の骨硬化を予測することが可能であること。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究により、軟部腫瘍を中心とした悪性骨軟部腫瘍の生物学的特性に関する研究が進んだ。上述の成果により、使用可能な限られたリソース(薬剤)を適切に選択する根拠が明らかとなった。即ち、薬剤投与前に適切に検査を行うことにより、薬剤の治療効果、ひいては各々の症例の予後を改善させることが可能になると思われた。

研究成果の概要(英文)：The resistance of malignant bone and soft tissue tumors, especially soft tissue sarcomas, to anti-tumor drugs is a major problem. In this project, we studied the biological characteristics of malignant bone and soft tissue tumors, and obtained research results on the basis of Precision Medicine, especially from the viewpoint of drug resistance, focusing on the following three points. (1) The efficacy of eribulin (Eri), a typical treatment for soft tissue sarcoma, can be predicted using peripheral blood immune-related markers. (2) Expression of Beta-tubulin3 is a biomarker of drug resistance in Eri. (3) In giant cell tumor of bone, it is possible to predict osteosclerosis after anti-RANKL antibody administration by evaluating the nuclear translation of beta-catenin.

研究分野：骨軟部腫瘍

キーワード：Precision medicine 骨軟部腫瘍

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、研究者個人に帰属します。

## 1. 研究開始当初の背景

これまで、悪性骨軟部腫瘍、特に高悪性度軟部肉腫(軟部肉腫)の治療の主体は外科的根治切除であったが、その5年生存率は満足のものではなかった。近年、複数の臨床研究により、軟部肉腫に対するAI療法を中心とした化学療法の有効性が報告されている。しかし、初診時より転移を有する進行例や、一時的に化学療法が奏功しても経過中に耐性化をきたす症例の予後は未だに不良である。また、軟部肉腫に対して使用可能な薬剤は限られていたが、2010年以降、Eribulin (Eri), Pazopanib (Paz), Yonderis (Yon)といった新規薬剤が開発された。しかし、単剤での奏功率は決して高いとは言えず、投与に伴い耐性化を来す症例もしばしば経験している。よって、各種薬剤の耐性化機序の解明や、投与前に効果を予測するバイオマーカーの開発は喫緊の課題であった。一方、各種のがんにおいて、腫瘍の生物学的特性に関する研究が進み、Precision Medicineを用いたアプローチが実用化され、治療個別化が進められたことで予後の改善が得られている。そのため、悪性骨軟部腫瘍においても、一刻も早く Precision Medicine を導入する必要性があった。

## 2. 研究の目的

本研究においては、悪性骨軟部腫瘍における、治療薬に対する奏功性、耐性化を投与前に予測し、Precision medicine を実践する基盤を構築することを目的とした。

## 3. 研究の方法

上記の目的達成のため、悪性骨軟部腫瘍症例の臨床情報、腫瘍組織の組織学的解析、腫瘍細胞株を用いた分子細胞生物学的解析を行った。また、得られた結果に対する、統計学的解析も行った。

## 4. 研究成果

### (1) 進行軟部肉腫の化学療法における末梢血免疫関連マーカーを用いた奏功性予測

近年、進行軟部肉腫に対しての薬物療法として、Paz、Yon、Eri(新規治療薬)が次々に承認された。しかし、これら3剤の、投与の順番などを含む適切な使用法に関してはコンセンサスが得られていない。大腸癌や乳癌の領域では、リンパ球数(ALC)、好中球リンパ球比(NLR)、血小板リンパ球比(PLR)などの末梢血免疫関連マーカーが予後予測因子となりうることが知られているが、これらの進行軟部肉腫におけるこれらのマーカーの有用性は明らかでない。

当科にて、新規治療薬の使用経験のある進行軟部肉腫患者48例(男性25例、女性23例、平均年齢61.2歳(20-82歳))を対象とした。新規治療薬3剤のうち初めに投与した薬剤に基づき、症例を3群(Eri 28例、Yon 4例、Paz 16例)に分類した。1コース目投与前の血液検査結果をもとに、NLR、ALC、PLRを計算した。Cut-off値をNLR=3.0、ALC=1500、PLR=200とし、overall survival (OS)、progression free survival (PFS)との相関を比較検討した。

PFSに関しては、すべての項目において末梢血免疫関連マーカーとの相関を認めなかった。OSに関しては、Eri初回投与群のみで、PLR低値群では高値群よりOSが延長していた(744日 vs 393日、 $p=0.043$ )。Eri初回投与群のALC、NLRおよび他の薬剤の末梢血免疫関連マーカーにOSとの相関は認められなかった。また、Eri初回投与群と他薬剤初回投与群それぞれのPLR低値群を比較すると、Eri初回投与群にOSの延長を認めた(744日 vs 579日、 $p=0.030$ )。

末梢血免疫関連マーカーは、患者個人の免疫力を反映する指標と考えられている。また Eri

は腫瘍周囲環境の血流を改善させ、腫瘍への免疫細胞の集簇を促す効果を持つことも予想されている。よって、PLR 低値群では、Eri を最初に用いることで OS の延長が得られる可能性がある。今後は、より多数例を前向きに集積し、結果の再現性を検討する必要がある。

## (2) Class III $\beta$ -tubulin (TUBB3)を用いた、軟部肉腫に対する Eribulin の奏功性予測

Eri は、微小管を構成する tubulin の重合を阻害する事により腫瘍の細胞分裂を阻害する抗腫瘍薬である。しかし、その臨床成績は症例により大きく異なる。いくつかの癌領域に於いては、 $\beta$ -tubulin アイソタイプのうち、特に class III  $\beta$ -tubulin (TUBB3)の過剰発現が薬剤耐性と関連したとの報告がある。軟部肉腫に於いては、我々はまず、Eri 抵抗性の平滑筋肉腫細胞株で TUBB3 が過剰発現しており、ノックダウンにより Eri への感受性が回復した事を報告した。今回我々は、Eri を使用した軟部肉腫症例の臨床成績と TUBB3 発現との関連を解析し、治療効果予測因子となり得るか検討を行った。

当科にて Eri を使用した STS 患者 37 例(男性 19 例, 女性 18 例, 平均年齢 62.2 歳(21-82 歳))を対象とした。化学療法前の腫瘍組織生検標本または外科的切除標本を用いて抗 TUBB3 抗体による免疫組織化学的染色を行い、TUBB3 発現を評価した。低発現群と高発現群の 2 群に分け、OS, PFS の比較検討を行った。その結果、OS の中央値の比較では、TUBB3 低発現群は高発現群よりも有意な延長を認めた(662 日 vs 351 日,  $p=0.0440$ )。PFS の中央値の比較では、2 群間に有意差は認めなかった(6.5 ヶ月 vs 4 ヶ月,  $p=0.1575$ )。

軟部肉腫に於ける TUBB3 高発現は、Eri 治療抵抗性のバイオマーカーとなる可能性がある。今後の課題として、より症例数を増やした検討、および Eri 非使用症例との比較検討が必要と考えられる。

## 3) Denosumab を用いた骨巨細胞腫(Giant cell tumor of bone: GCTB)治療に際する、投与後の骨形成を予測するバイオマーカーの同定

GCTB は紡錘形の腫瘍細胞 (GCTB-cell)と多数の破骨細胞様の多核巨細胞(巨細胞)によって構成される。GCTB は著明な骨破壊を生じ、手術後の局所再発率が高い治療困難な骨腫瘍である。近年、GCTB の研究領域において 2 つの大きな進歩があった。1 つは、GCTB cell の特異的マーカーとしてヒストン変異(H-G34W)が同定された点である。またもう 1 つは、破骨細胞の分化に必須な RANKL (receptor activator of NF- $\kappa$ B ligand)に対する中和抗体である denosumab(deno)により腫瘍内骨形成、巨細胞の消失が生じ、切除困難/不能な GCTB に対する治療のブレイクスルーとなった事である。一方、deno の使用経験が蓄積されるにつれ、deno に対する反応性が症例により異なることが明らかとなってきたが、これまで GCTB に対する deno による骨形成メカニズムや、deno の反応性を投与前に予測するバイオマーカーは明らかにされていなかった。

まず、GCTB の組織標本より H-G34W 陽性の p-GCTB cell を分離、初代培養系を確立した。90%以上の細胞が H-G34W 陽性であり、純度の高い細胞群であることを確認した。この初代培養細胞株に骨分化誘導メEDIUMを添加することで、p-GCTB-cell は in vitro で、アルカリフォスファターゼ陽性の骨芽細胞へ分化することを確認した。さらに、pGCTB-cell の骨分化に伴い、 $\beta$ -catenin が核内へ移行することを、蛍光免疫染色や western blotting を用いて確認した。一方、 $\beta$ -catenin の核内移行阻害剤により p-GCTB-cell の骨分化は、濃度依存的に阻害されることを見出した。生検標本の  $\beta$ -catenin 免疫染色での検討では、7 例に  $\beta$ -catenin の核内移行を認めたが(移行群)、6 例では移行を認めなかった(非移行群)。deno 投与後の病変の CT 画像においては、移行群は非移行群に比べ deno 投与後に有意に高い骨形成を示した。このことは deno 投与に伴い、移行群において高度な腫瘍内骨形成を生じていることを示している。

本研究により、GCTB-cell の骨分化に  $\beta$ -catenin の核内移行が必須であること、臨床検体で  $\beta$ -catenin の核内移行を認める症例は、認めない症例に比べ deno 投与後に有意に高度な腫瘍内骨形成を生じていることが明らかとなった。即ち、 $\beta$ -catenin の核内移行を deno 投与

前に評価することで、投与後の骨硬化を予測することが可能であり、GCTB に対する deno による治療の Precision medicine として有用であると思われた。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計5件（うち査読付論文 3件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 1件）

1. 著者名 Yahiro K, Matsumoto Y, Yamada H, Endo M, Setsu N, Fujiwara T, Nakagawa M, Kimura A, Shimada E, Okada S, Oda Y, Nakashima Y.	4. 巻 69
2. 論文標題 Activation of TLR4 signaling inhibits progression of osteosarcoma by stimulating CD8-positive cytotoxic lymphocytes.	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Cancer Immunol Immunother.	6. 最初と最後の頁 745-758
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1007/s00262-020-02508-9	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Matsumoto Y, Matsunobu A, Kawaguchi K, Hayashida M, Iida K, Saiwai H, Okada S, Endo M, Setsu N, Fujiwara T, Baba S, Nomoto S, Nakashima Y.	4. 巻 24
2. 論文標題 Clinical results of carbon-ion radiotherapy with separation surgery for primary spine/paraspinal sarcomas.	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Int J Clin Oncol	6. 最初と最後の頁 1490-1497
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1007/s10147-019-01505-y	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Iura K, Kohashi K, Yasutake N, Ishii T, Maekawa A, Bekki H, Otsuka H, Yamada Y, Yamamoto H, Ohishi Y, Matsumoto Y, Iwamoto Y, Oda Y.	4. 巻 15
2. 論文標題 Cancer-testis antigens are predominantly expressed in uterine leiomyosarcoma compared with non-uterine leiomyosarcoma.	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Once Lett.	6. 最初と最後の頁 441-446
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.3892/ol.2017.7274.	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Yamamoto H, Iwasaki T, Yamada Y, Matsumoto Y, Otsuka H, Yoshimoto M, Kohashi K, Taguchi K, Yokoyama R, Nakashima Y, Oda Y.	4. 巻 73
2. 論文標題 Diagnostic utility of histone H3.3 G34W, G34R, and G34V mutant-specific antibodies for giant cell tumors of bone.	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Hum Pathol	6. 最初と最後の頁 41-50
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.humpath.2017.11.020.	査読の有無 無
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Yahiro K, Matsumoto Y, Fukushi JI, Kawaguchi KI, Endo M, Setsu N, Iida K, Fukushima S, Nakagawa M, Kimura A, Oda Y, Nakashima Y	4. 巻 なし
2. 論文標題 Class III -Tubulin Overexpression Induces Chemoresistance to Eribulin in a Leiomyosarcoma Cell Line.	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Anal Cell Pathol	6. 最初と最後の頁 8987568
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1155/2018/8987568	査読の有無 無
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -

〔学会発表〕 計1件 (うち招待講演 1件 / うち国際学会 0件)

1. 発表者名 松本 嘉寛
2. 発表標題 軟部肉腫に対する新規薬物療法
3. 学会等名 第51回日本整形外科学会骨軟部腫瘍学術集会 (招待講演)
4. 発表年 2018年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
---------------------------	-----------------------	----

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------