

令和 2 年 5 月 20 日現在

機関番号：12601

研究種目：若手研究

研究期間：2018～2019

課題番号：18K15303

研究課題名(和文) 悪性軟部腫瘍に対するトラベクテジンの奏効性を予測するバイオマーカーの探索

研究課題名(英文) Exploration of biomarkers of the efficacy of trabectedin in soft tissue sarcoma

研究代表者

小林 寛 (Kobayashi, Hiroshi)

東京大学・医学部附属病院・助教

研究者番号：20407951

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,200,000円

研究成果の概要(和文)：悪性軟部腫瘍に対する化学療法薬には複数選択肢がある。その中で進行例悪性軟部腫瘍に対してトラベクテジンがあり、本薬剤の奏効性を予測する指標が明らかとなれば、治療選択に非常に有用である。本研究は、腫瘍の遺伝子解析とトラベクテジン抵抗性の腫瘍細胞を用いた解析を行うことで、トラベクテジンの奏効性を予測する指標を探索することを目的として行なった。本研究の結果、効果予測の候補となる遺伝子が挙げられたため、さらなる解析を行う予定である。

研究成果の学術的意義や社会的意義

悪性軟部腫瘍に対する化学療法薬の複数選択肢がある中で、そのバイオマーカーを同定することが求められている。本研究は進行例悪性軟部腫瘍に対して保険適応となっているトラベクテジンの奏効性を予測する指標を腫瘍の遺伝子解析を行うことで、同定することを目的とした。本研究の結果、効果予測の候補となる遺伝子が挙げられたためさらなる解析を行う予定である。

研究成果の概要(英文)：There are several chemotherapy regimen to treat soft tissue sarcoma. Trabectedin is one of the drugs for advanced soft tissue sarcoma. It is important to reveal the biomarker to predict the efficacy of trabectedin. The purpose of this research was to elucidate the biomarker of trabectedin to predict the efficacy through genomic analysis of tumor specimens and mechanism of resistance to trabectedin. We identified several possible genomic biomarker, and will perform more analysis in the future.

研究分野：骨軟部腫瘍

キーワード：悪性軟部腫瘍 バイオマーカー

1. 研究開始当初の背景

悪性軟部腫瘍は、全身のあらゆる軟部組織に発生する悪性腫瘍で、希少かつ組織型が多様であることから、治療方針決定が困難なことがある。5年生存率は60~70%程度であり、主に肺転移をきたし、再発および転移が生じた進行例は予後不良である。悪性軟部腫瘍進行例に対する化学療法として、ドキシソルビシンを含む化学療法が1次治療として用いられている。一方、2次治療以降の薬剤として、パゾパニブ、トラベクテジン、エリブリンが近年保険適応となり、進行例に対する治療選択肢が増えたことから、薬剤選択基準が急務の課題となっている。2次治療以降の治療薬選択基準として、これまでの臨床試験の結果に基づき、腫瘍の組織型ごとの奏効性を頼りにすることが多い(Kawai A, *Adv Ther.* 2017)。しかし、同一組織型でも奏効性が異なること、臨床試験で無効とされていた組織型でも効果がみられることがある。また、臨床試験に含まれなかった組織型では、各薬剤の奏効性は不明である。

トラベクテジンは、nucleotide excision repair (NER)に関連した遺伝子発現、SNPとその奏効性の関連が報告されている。Trabectedinの作用機序として、NERを介したものの他、免疫微小環境において tumor associated macrophage (TAM)の抑制による cytotoxic T cell (CTL)の活性化(Allavena P, *Cancer Res*, 2005)、転写因子として作用する融合遺伝子の転写抑制(Aune GJ, *Clin Cancer Res*, 2008)など、その作用機序が多様であることから、奏効性に関する他のバイオマーカーも存在すると考えられる。

先述のように、同一の組織型においても薬剤の奏効性が大きく異なることがあること、効果がないと考えられている組織型でも治療効果が見られることがあることから、各組織型特異的な遺伝子異常が治療奏効性と関わっているだけでなく、トラベクテジンの奏効性に関連する遺伝子異常が存在する可能性が考えられる。これまで網羅的遺伝子解析により悪性軟部腫瘍の化学療法奏効性に関するバイオマーカーの探索を行った研究はなく、本研究により新規バイオマーカーの解明が期待される。

2. 研究の目的

本研究の目的は、悪性軟部腫瘍に対するトラベクテジンの奏効性を予測するバイオマーカーを探索しより適した治療薬選択につなげること、さらにトラベクテジン抵抗性に関連する遺伝子を探索し、そのメカニズムを解明することでトラベクテジンと相加および相乗効果を有する併用薬剤を探索することである。薬剤奏効性を予測するバイオマーカー探索を目的として、オンコパネルおよび shRNA ライブラリーを用いた多角的かつ網羅的遺伝子解析は、これまで行われておらず、本研究によってこれまでの研究では検出し得なかった遺伝子異常の解明につながる。さらに、本研究の手法を他の悪性軟部腫瘍の適応薬であるパゾパニブおよびエリブリンにも適応することによって、ゲノム情報に基づいた治療薬選択が可能となり、今後、臨床試験に発展させることで、悪性軟部腫瘍の診療体系の発展に大いに貢献するものと考えられる。

3. 研究の方法

本研究は、悪性軟部腫瘍に対するトラベクテジンの奏効性を予測するバイオマーカーを探索し、より適した治療薬選択につなげることを目的としている。(1)でがん遺伝子パネルによる解析と臨床情報を統合してバイオマーカーの探索を行うとともに、(2)で shRNA ライブラリーを用いてがん遺伝子パネルに含まれない遺伝子について薬剤抵抗性に関連する遺伝子を探索する。以上の2つの手法によって同定した薬剤奏効性・抵抗性に関連する遺伝子について、in vitro および in vivo の解析を行う。薬剤抵抗性に関連する遺伝子に関しては、その遺伝子が関与する主要なシグナルを解明し、その阻害剤によりトラベクテジンの治療効果に相加または相乗効果があるか否かを検証し、新規治療手段の開発につなげる。

(1) がん遺伝子パネルを用いたトラベクテジン奏効性を予測するバイオマーカーの探索

(1)- 検体および臨床情報の収集

トラベクテジンを投与し、RECISTによる画像評価でPRまたは12週以上のSDとなった症例を Responder、PDとなった症例を non-Responder とし、それぞれ15症例、計30症例を目安に解析を行う。症例に関しては、骨軟部腫瘍ゲノムコンソーシアム参加施設にアンケートをすでに行い、各群のサンプルサイズが十分であることを確認している。FFPE サンプルおよび臨床情報(年齢、性別、原発(部位、サイズ、ステージ)、再発、転移(臓器数)、PS、前後の化学療法レジメン数、投与量、ORR、PFS、OS)を収集する。

(1)- がん遺伝子パネルによる解析

FFPE 検体の腫瘍部位および正常部位から遺伝子を抽出し、がん遺伝子パネルにより遺伝子の点突然変異・挿入欠失・コピー数異常、遺伝子の融合、遺伝子発現の解析を行う。

(1)- 臨床情報およびがん遺伝子パネル解析情報の統合によるバイオマーカーの探索

Responder と non-Responder における遺伝子異常・発現を比較する。統計は、二乗検定、ログランク検定、Cox 比例ハザードモデルを使用する。

(2) shRNA ライブラリーによるトラベクテジン抵抗性に関連する遺伝子の探索

(2)- 薬剤抵抗性に関連する遺伝子を探索

トラベクテジン抵抗細胞株に対して shRNA ライブラリーを強制導入し、トラベクテジン投与に

よる細胞増殖抑制について解析する。

(2)- 薬剤抵抗性に関与する遺伝子と治療奏効性の解析

(1)で使用した検体において候補に挙げられた遺伝子の発現とトラベクテジン奏効性について解析し、薬剤抵抗性に関与する遺伝子を同定する。

(3) 同定された遺伝子のトラベクテジン抵抗性に関するメカニズムの探索

(1)および(2)で同定されたトラベクテジン抵抗性に関与する遺伝子について、その遺伝子の強制発現および抑制系において変化するシグナルを pathway 解析や GSEA 解析などを用いて探索する。

(4) 薬剤抵抗性に関与するシグナルの阻害剤併用によるトラベクテジンの奏効性の検証

(3)で同定されたシグナルの阻害剤が存在する場合は、阻害剤を併用することによりトラベクテジンの奏効性に与える影響について解析する。In vitro で相加および相乗効果がみられた場合は、xenograft モデルにより in vivo においても薬剤併用効果について検証する。

4. 研究成果

(1) がん遺伝子パネルを用いたトラベクテジン奏効性を予測するバイオマーカーの探索

トラベクテジンが投与された患者のうち、RECIST による画像評価で PR または 12 週以上の SD となった症例を Responder、PD となった症例を non-Responder として、協力施設にアンケートを行い、悪性軟部腫瘍のなかでも特に頻度が高く、トラベクテジンの有効性が高い粘液型脂肪肉腫と滑膜肉腫の検体を、Responder と non-Responder として各 8 例の FFPE 検体を収集した。また、臨床情報として、年齢、性別、原発、再発、転移、PS、前後の化学療法レジメン数、投与量、ORR、PFS、OS) などを収集した。

その後、がん遺伝子パネルによる解析を行なった。最初に収集した Responder および non-Responder それぞれ 5 例から DNA を抽出して、がん遺伝子パネルにより遺伝子の点突然変異・挿入欠失・コピー数異常の解析を行った。得られた遺伝子異常のデータと臨床情報およびがん遺伝子パネル解析情報の統合によるバイオマーカーの探索を行なった。

Responder と non-Responder をそれぞれ 5 検体で、体細胞変異の有無による治療効果について検討したが、体細胞変異と治療奏効性との関係は見られなかった。原因として肉腫におけるがん遺伝子パネルで得られる体細胞変異の頻度が少ないことが考えられた。これまで、トラベクテジンの奏効性について解析された研究、メチル化に注目したものがあること、また nucleotide excision repair に関与する因子や BRCA などの homologous recombination repair に関与する因子の発現が関与していることがわかってきたことから、メチル化、遺伝子発現解析を行った。5 例ずつの検討で、治療奏効性と関連すると考えられる候補となる遺伝子 X があげられたが、症例数を 3 例ずつ増やし、患者背景因子などを調整して統計解析したところ、当初見られた遺伝子 X のメチル化異常と治療奏効性の関係がみられなかった。今後は、症例数を追加で 5 症例ずつ増やすなどさらなる解析をすることを検討している。

(2) shRNA ライブラリーによるトラベクテジン抵抗性に関与する遺伝子の探索

まず、ヒト滑膜肉腫細胞株を入手し、in vitro でトラベクテジンを繰り返し投与し、生存する細胞を抽出してトラベクテジン抵抗性細胞株とした。これを用いて、shRNA による遺伝子発現抑制によってトラベクテジン感受性促進に繋がる遺伝子を同定することとした。約 2000 個の遺伝子を含む shRNA ライブラリーをこの細胞株に強制発現し、トラベクテジンを in vitro で投与した。トラベクテジン投与後に生存していた細胞とトラベクテジン非投与の細胞をコントロールとして遺伝子発現解析を行い、両群で比較し、トラベクテジン感受性に関与する遺伝子をスクリーニングした。繰り返し実験を行ったが、この過程で再現してトラベクテジンの感受性に関与する遺伝子は検出できなかった。また、候補になる遺伝子の shRNA を作成し、これを強制発現してトラベクテジンを投与したが、薬剤感受性に明確な変化がみられなかった。

そのため、さらなる解析を行うために未分化多形肉腫の細胞株を入手し、in vitro でトラベクテジンを繰り返し投与し、生存する細胞をトラベクテジン抵抗性細胞株として使用した。先ほどと同様に shRNA を強制発現し、トラベクテジン投与群と非投与群で遺伝子発現解析を行い、shRNA ライブラリーに含まれる遺伝子の中でトラベクテジン非投与群の細胞の遺伝子発現とトラベクテジン投与群で生存していた細胞の遺伝子発現を比較し、トラベクテジン感受性に関与する遺伝子の同定を試みた。本細胞株を用いた解析においても同様に再現性のある結果が得られなかったため、shRNA を用いてトラベクテジンの感受性に関与する遺伝子の同定には至らなかった。

本実験では滑膜肉腫と未分化多形肉腫の細胞株を用いて行なったが、他の悪性軟部腫瘍の細胞株、特に粘液型脂肪肉腫などの細胞株を用いた解析を行うことが今後の課題と考えている。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計4件（うち査読付論文 0件／うち国際共著 0件／うちオープンアクセス 0件）

1. 著者名 Kobayashi Hiroshi, Okuma Tomotake, Oka Hiroyuki, Okajima Koichi, Ishibashi Yuki, Zhang Liuzhe, Hirai Toshihide, Ohki Takahiro, Tsuda Yusuke, Ikegami Masachika, Sawada Ryoko, Shinoda Yusuke, Akiyama Toru, Kawano Hirotaka, Goto Takahiro, Tanaka Sakae	4. 巻 24
2. 論文標題 Body composition as a predictor of toxicity after treatment with eribulin for advanced soft tissue sarcoma	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 International Journal of Clinical Oncology	6. 最初と最後の頁 437 ~ 444
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1007/s10147-018-1370-8	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 Kobayashi Hiroshi, Hirai Toshihide, Makise Naohiro, Ushiku Tetsuo, Ito Nobuaki, Koga Minae, Ikegami Masachika, Shinoda Yusuke, Akiyama Toru, Tanaka Sakae	4. 巻 2019
2. 論文標題 Reconstruction Using Frozen Autograft for Disseminated Phosphaturic Mesenchymal Tumor of the Humerus after a Pathological Fracture	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Case Reports in Orthopedics	6. 最初と最後の頁 1 ~ 7
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1155/2019/3015675	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 Tsuda Yusuke, Hirata Makoto, Katayama Kotoe, Motoi Toru, Matsubara Daisuke, Oda Yoshinao, Fujita Masashi, Kobayashi Hiroshi, et al	4. 巻 145
2. 論文標題 Massively parallel sequencing of tenosynovial giant cell tumors reveals novel CSF1 fusion transcripts and novel somatic CBL mutations	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 International Journal of Cancer	6. 最初と最後の頁 3276 ~ 3284
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1002/ijc.32421	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 Kobayashi H, Iwata S, Wakamatsu T, Hayakawa K, Yonemoto T, Wasa J, Oka H, Ueda T, Tanaka S.	4. 巻 125
2. 論文標題 Efficacy and safety of trabectedin for patients with unresectable and relapsed soft-tissue sarcoma in Japan: A Japanese Musculoskeletal Oncology Group study.	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Cancer.	6. 最初と最後の頁 1253~1263
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1002/cncr.32661.	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 -

〔学会発表〕 計4件（うち招待講演 1件 / うち国際学会 1件）

1. 発表者名 小林寛、岡敬之、岩田慎太郎、若松透、早川景子、和佐潤志、角永茂樹、箱崎道之、柳川天志、筑紫聡、米本司、田中栄、上田孝文
2. 発表標題 日本人における軟部肉腫に対するトラベクテジンの有効性と安全性
3. 学会等名 第52回日本整形外科学会骨軟部腫瘍学術研究会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 小林寛
2. 発表標題 骨軟部腫瘍におけるクリニカルシーケンスの現状と今後の課題、シンポジウム
3. 学会等名 第52回日本整形外科学会骨軟部腫瘍学術研究会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 小林寛
2. 発表標題 Chemotherapy for bone and soft tissue sarcoma -Realizing precision medicine-
3. 学会等名 4th - Japan & Korea musculoskeletal oncology forum (招待講演)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Hiroshi Kobayashi, Naohiro Makise, Tetsuo Ushiku, Nobuaki Ito, Yuka Kinoshita, Yusuke Shinoda, Seiji Fukumoto, Sakae Tanaka
2. 発表標題 Infiltrative nature of tumor-induced osteomalacia lesions in bone: correlation between radiological and histopathological features
3. 学会等名 RCOST (国際学会)
4. 発表年 2019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
--	---------------------------	-----------------------	----