

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

令和 3 年 5 月 25 日現在

機関番号：83901

研究種目：若手研究

研究期間：2018～2020

課題番号：18K15313

研究課題名（和文）デスモイド型線維腫症PDCによる治療薬の網羅的評価・解析

研究課題名（英文）Comprehensive evaluation and analysis of therapeutic agents utilizing desmoid-type fibromatosis PDC

研究代表者

濱田 俊介（Hamada, Shunsuke）

愛知県がんセンター（研究所）・がん病態生理学分野・研究員

研究者番号：90747289

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）：デスモイド型線維腫症の腫瘍組織よりCTNNB1遺伝子変異を同定し、腫瘍細胞を分離・培養した。臨床的予後が不良とされるS45F変異型の細胞では、他の遺伝子変異型細胞と比較し  $\beta$ -cateninの核内移行を強く認めた。新規治療薬としてドラッグスクリーニングにて候補薬を選定したが、S45F変異型細胞では既存治療薬も含め各薬剤に対する抑制効果が相対的に低いことが示された。またWntシグナル系遺伝子も他の遺伝子変異型細胞と異なった発現プロファイルを呈しており、これがS45F変異型腫瘍における高い薬剤抵抗性や再発率など特異的な臨床経過に関与している可能性が示唆された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

デスモイド型線維腫症においてCTNNB1遺伝子変異はそれ自体が診断的意義を持つと同時に、その変異型が臨床的な術後再発率や薬物治療効果と相関することが報告されており、近年実臨床においても診断や治療方針の決定に有用なツールとなってきている。本研究では治療抵抗性のS45F変異型腫瘍の臨床的特徴と、細胞の分子生物学的性質について相関性が示された。今後さらに解析を進めることで、治療抵抗性の症例に対してより治療効果の高い薬剤の開発や、他の変異型を含めたより厳密な治療マーカーの確立化などが期待される。

研究成果の概要（英文）：TNNB1 mutations were identified in tumor tissue from desmoid fibromatosis, and these tumor cells were isolated and cultured. The tumor cells with S45F mutation, which is considered to have a poor clinical prognosis, showed stronger nuclear migration of  $\beta$ -catenin than cells with other mutations. We selected candidate drugs by drug screening as novel therapeutic agents, but the inhibitory effect of each drug, including existing drugs, was relatively low in S45F mutant cells. The expression profile of Wnt signaling genes also differed from that of other mutant cells, suggesting that these genes may be involved in the unique clinical course of S45F mutant tumors, including high drug resistance and recurrence rates.

研究分野：骨軟部腫瘍

キーワード：デスモイド型線維腫症 CTNNB1変異 Wntシグナル

## 1. 研究開始当初の背景

デスモイド型線維腫症は WHO 腫瘍分類では良悪性中間型に分類される間葉系腫瘍である。転移能はないが局所浸潤性が強く、手術による再発率が極めて高い一方で静止例や自然消退の報告例もあり、その腫瘍学的特性は一般に増大を続ける他の腫瘍と比べて特異的でありその病態に未だ謎の多い腫瘍である。機能障害の大きい広範切除手術は近年回避される傾向にあり、第一選択の治療として wait & see や薬物治療といった保存治療が重要視されている。治療薬としては NSAIDs や抗ホルモン薬、特定の抗癌剤の投与が各国のガイドラインで推奨されている。(Kasper B. *Ann Oncol.* 2017 1;28(19):2399-2408) また近年 Wnt/  $\beta$ -catenin シグナルや Notch シグナルに対する阻害剤の開発や、Pazopanib, Imatinib, Sorafenib などの分子標的治療薬の臨床使用の報告もされるようになり、治療薬剤の選択肢は多彩になってきているものの疾患自体は rare disease であり前向きな臨床比較試験は困難である。そのため従来の薬剤を含め実際に治療効果の確立された薬剤はほとんどなく、また実際に国内でもデスモイド型線維腫症に適応となっている薬剤はない。同時にこうした全身治療薬の治療効果や wait & see による自然経過には症例毎に大きな幅があり、それらを予測する有用なマーカーは現在のところ確立していない。デスモイド型線維腫症の特徴的所見として  $\beta$ -catenin の核内への異常蓄積が以前より報告されており(Bhattacharya B et al. *Am J Surg Pathol* 2005;29:653-9)、Wnt シグナル系の関与が示唆されている。特にデスモイド型線維腫症に特異的で頻度の高い CTNNB1 exon3 の T41A および S45F 変異については、臨床的な behavior の相違に何らかの関与をしていると考えられ、我々は Wnt/  $\beta$ -catenin シグナル活性化の程度や下流遺伝子の発現パターンの違いなどを報告している。(Hamada S et al. *Cancer Med* 2016 5(2):352-60) しかし、こうした遺伝子変異型が治療効果に相違をもたらす分子病態的機序については依然として十分に解明されていない。これらをより詳細に検証することができれば、予後予測困難なこの腫瘍性疾患に対する治療効果予測マーカーの確立やオーダーメイド治療の実現につながるのではと考えられた。

## 2. 研究の目的

本研究の目的は、腹腔外デスモイド型線維腫症の腫瘍より採取した培養細胞: PDC(Patient-derived cell)を用いて in vitro にて、また次の展望として PDX (Patient Derived Xenograft) モデルを作成し in vivo での評価も行い、各薬剤の治療効果のデータを多症例蓄積し、臨床において患者毎に異なる腫瘍抑制効果の違いについて網羅的解析を行うことである。またデスモイド型線維腫症はその主たる病態として Wnt/  $\beta$ -catenin 系の制御異常の関与が示唆されており、治療薬毎のその他の関連シグナルも含めたシグナル変動を評価することで発生・進行機序を解析する。将来的に症例に応じて適切な治療薬・治療法が選択できるようなオーダーメイド治療の開発を目指している。

## 3. 研究の方法

デスモイド型線維腫症 Patient-Derived Cell (PDC) の作成:

臨床で診断目的に採取した生検組織の中から臨床的な病理診断のために用いた後、残余した組織より腫瘍細胞を分離・培養を行う。腫瘍組織および培養細胞から抽出した DNA より Hot spot となる CTNNB1 exon3 の変異解析をサンガー法にて行い変異型毎に分類する。

各薬剤の投与による PDC の抑制効果の評価:

PDC に対して、デスモイド型線維腫症に対して臨床で用いられている各薬剤を投与し腫瘍抑制効果を、マルチパラメータアッセイによる増殖能、TOPFLASH assay や カテニン免疫染色による Wnt 系の活性化レベル、Annexin V assay によるアポトーシス評価などにより薬効や細胞毒性を含めた解析により各薬剤の網羅的な評価を行う。評価薬剤は COX-2 阻害剤(meloxicam 等)を含む実臨床での既存薬剤とともに、drug screening にてデスモイド型線維腫症の PDC 特異的に抑制効果を呈する既存薬を新規治療薬として選定し併せて評価を行う。また PDC 毎に最も抑制効果の高い薬剤を選別し個別治療導入への応用性について検討する。

薬剤治療効果の予後予測マーカーを同定:

上記にて得られた PDC の抑制効果と各臨床因子(年齢、性別、発生部位等、MRI 信号所見、遺伝子変異等)との相関性について評価し、薬剤毎に治療効果の予後予測マーカーを同定する。

システムティックレビュー:

臨床情報や診断・治療・遺伝子変異との関連性を明らかにするため、希少疾患でもあるデスモイド型線維腫症に関する諸家の報告についてシステムティックレビューを行う。

#### 4. 研究成果

デスモイド型線維腫症例の手術もしくは生検標本より得られたPatient-Derived Cell (PDC)を用いた評価を行った。主な変異型であるT41A変異型、S45F変異型および変異型のない腫瘍よりそれぞれ腫瘍細胞を分離し各評価を用いた。ドラッグスクリーニングとして既存薬のライブラリーを用いてMTS assayを行い、有効な増殖抑制効果を示す候補薬を数剤選定した。それらの薬剤に対して再検を行うことで安全な長期投与が可能でかつ高い増殖抑制効果を示す最終候補薬1剤を選定した。保存治療や手術治療において臨床的経過が不良であることが報告されているS45F変異型細胞では、他の遺伝子変異型細胞と比較し、 $\beta$ -cateninの核内移行を強く認め、また臨床的に用いられているメロキシカムや選定された治療候補薬による抑制効果が低いことが示された。Annexin V assayによるアポトーシス評価では、いずれの薬剤を用いてもアポトーシスの有意な発現増加は誘導されなかった。また治療候補薬剤のin vivoでの腫瘍抑制効果についての検討を試みたが、後述のようにデスモイド型線維腫症のPDXモデルの作成が困難であり、評価を行うことができなかった。

Wnt/カテニンシグナルの下流遺伝子(Axin-2, Cyclin-D1, C-myc, COX-2)の発現評価では、他の遺伝子変異型細胞と異なった発現プロファイルを呈しており、S45F変異型腫瘍ではWnt/カテニンシグナル系の過剰亢進が、高い薬剤抵抗性や再発率など特異的な臨床経過に関与している可能性が示唆された。臨床検体40例の免疫染色による評価では、非リン酸化カテニンの核内染色性が、CTNNB1変異型やCOX-2阻害剤に対する治療抵抗性と相関することが示された。(Sakai T. et al. Diagn Pathol 2017 29;12(1):66) In vivoモデルによる薬剤感受性の評価等を目的とし培養細胞をヌードマウスに接種し移植することでPDXモデルの作成を試みたが、腫瘍として生着せず成功しなかった。

臨床面では、治療介入に対する予後予測の判断のため画像所見との関連性について評価を行った。臨床的に使用しているメロキシカム投与症例において治療効果の高かった症例ほどMRI T2強調像での腫瘍内部の低信号領域の割合が高かった。T2強調像における腫瘍内の信号強度の違いは細胞密度と相関している可能性が示唆された。(Shimizu K. et al. Jpn J Clin Oncol. 2020 22;50(11):1274-1281)この結果は治療開始の時点での腫瘍活性と相関する可能性を示唆し、有効な薬物治療の対象となり得る症例の培養細胞の作製の効率化が期待された。またデスモイド型線維腫症の発生部位や画像所見と治療効果の相関性など臨床的予後因子や各種薬物治療の効果など、臨床・疫学的側面についても過去の報告をシステムティックレビューし評価を行った。CTNNB1の診断的有用性についての検討では、デスモイド型線維腫症のCTNNB1変異陽性率が86.8%であり、一方で類似疾患のCTNNB1変異陽性率は0%であり優れた特異度であった。(Sakai T. et al. Jpn J Clin Oncol. 2020.5;50(9):1037-1042) デスモイド型線維腫症におけるCTNNB1の点変異はHot spotの領域も極めて限られており、Sanger法で比較的簡便に評価が可能である。この結果より線維増殖性の類似疾患との病理学的鑑別が難しいこの腫瘍に対して、診断を目的として変異解析を行うことは有用であると考えられ、また同時に得られる変異型の情報は治療方針の決定にも有用な情報となり得る。発生部位と薬物治療効果との関連性についても評価を行った。メロキシカムでは四肢以外の方が有効性が高い一方、MTX+VBL化学療法では四肢症例のほうが有効性が高く、その他の薬剤では同等の有効性であった。(koike et al. Jpn J Clin Oncol. 2020 5;50(9):1032-1036) バイアスも多く正確な評価は困難であり分子病態的な相違についても明らかにはできなかったが、今後さらに解析を進めることで発生部位に応じた最適な薬剤選択するようなオーダーメイド治療につながる可能性が示された。

現在、国内でデスモイド型線維腫症の全ゲノム解析の多施設研究が行われており、新しい遺伝子変異や発現プロファイルが明らかになりつつある。こうした情報も含め今後さらに分子病態的解析を進め、より正確な予後予測や最適なオーダーメイドの確立を目指していく方針である。

## 5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計6件（うち査読付論文 2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 Shimizu Koki, Hamada Shunsuke, Sakai Tomohisa, Ito Shinji, Urakawa Hiroshi, Arai Eisuke, Ikuta Kunihiro, Koike Hiroshi, Ishiguro Naoki, Nishida Yoshihiro	4. 巻 63
2. 論文標題 MRI characteristics predict the efficacy of meloxicam treatment in patients with desmoid type fibromatosis	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Journal of Medical Imaging and Radiation Oncology	6. 最初と最後の頁 751 ~ 757
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1111/1754-9485.12940	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 Koike Hiroshi, Nishida Yoshihiro, Kohno Kei, Shimoyama Yoshie, Motoi Toru, Hamada Shunsuke, Kawai Akira, Ogose Akira, Ozaki Toshifumi, Kunisada Toshiyuki, Matsumoto Yoshihiro, Matsunobu Tomoya, Ae Keisuke, Gokita Tabu, Sakai Tomohisa, Shimizu Koki, Ishiguro Naoki	4. 巻 84
2. 論文標題 Is immunohistochemical staining for $\beta$ -catenin the definitive pathological diagnostic tool for desmoid-type fibromatosis? A multi-institutional study	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Human Pathology	6. 最初と最後の頁 155 ~ 163
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.humpath.2018.09.018	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 Sakai Tomohisa, Hamada Shunsuke, Koike Hiroshi, Shimizu Koki, Yoshida Masahiro, Nishida Yoshihiro	4. 巻 50
2. 論文標題 Is mutation analysis of $\beta$ -catenin useful for the diagnosis of desmoid-type fibromatosis? A systematic review	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Japanese Journal of Clinical Oncology	6. 最初と最後の頁 1037 ~ 1042
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1093/jjco/hyaa080	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 Koike Hiroshi, Hamada Shunsuke, Sakai Tomohisa, Shimizu Koki, Yoshida Masahiro, Nishida Yoshihiro	4. 巻 50
2. 論文標題 Is tumour location a prognostic factor for pharmacological treatment in patients with desmoid-type fibromatosis? a systematic review	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Japanese Journal of Clinical Oncology	6. 最初と最後の頁 1032 ~ 1036
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1093/jjco/hyaa078	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 Nishida Yoshihiro, Hamada Shunsuke, Kawai Akira, Kunisada Toshiyuki, Ogose Akira, Matsumoto Yoshihiro, Ae Keisuke, Toguchida Junya, Ozaki Toshifumi, Hirakawa Akihiro, Motoi Toru, Sakai Tomohisa, Kobayashi Eisuke, Gokita Tabu, Okamoto Takeshi, Matsunobu Tomoya, Shimizu Koki, Koike Hiroshi	4. 巻 111
2. 論文標題 Risk factors of local recurrence after surgery in extraabdominal desmoid type fibromatosis: A multicenter study in Japan	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Cancer Science	6. 最初と最後の頁 2935 ~ 2942
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1111/cas.14528	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 Nishida Yoshihiro, Hamada Shunsuke, Urakawa Hiroshi, Ikuta Kunihiro, Sakai Tomohisa, Koike Hiroshi, Ito Kan, Emoto Ryo, Ando Yuichi, Matsui Shigeyuki	4. 巻 111
2. 論文標題 Desmoid with biweekly methotrexate and vinblastine shows similar effects to weekly administration: A phase II clinical trial	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Cancer Science	6. 最初と最後の頁 4187 ~ 4194
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1111/cas.14626	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0件

〔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
研究協力者	西田 佳弘 (Nishida Yoshihiro)	名古屋大学  (13901)	
研究協力者	酒井 智久 (Sakai Tomohisa)	名古屋大学  (13901)	
研究協力者	小池 宏 (Koike Hiroshi)	  (13901)	

6. 研究組織（つづき）

	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
研究協力者	筑紫 聡  (Tsukushi Satoshi)	愛知県がんセンター（研究所）  (83901)	
研究協力者	吉田 雅博  (Yoshida Masahiro)	愛知県がんセンター（研究所）  (83901)	
研究協力者	藤原 那沙  (Fujihara Nasa)	愛知県がんセンター（研究所）  (83901)	

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