

令和 5 年 6 月 19 日現在

機関番号：82606

研究種目：基盤研究(C)（一般）

研究期間：2019～2022

課題番号：19K09589

研究課題名（和文）肉腫の分化を標的とした新規治療開発

研究課題名（英文）The Development of Novel Therapy Targeting Differentiation in Bone and Soft Tissue Sarcomas

研究代表者

小林 英介（Kobayashi, Eisuke）

国立研究開発法人国立がん研究センター・中央病院・医長

研究者番号：40365292

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,300,000円

研究成果の概要（和文）：肉腫の分化に着目した治療薬開発のために2つの研究を行った。1つはWintシグナル調節因子であるTRAF2 and NCK-interacting protein kinase (TNIK)の肉腫における治療標的としての有用性の検討である。滑膜肉腫に対する治療薬の可能性を証明することができた。2つ目は脱分化という肉腫の悪性化メカニズムに着目した新規薬剤の臨床応用である。軟骨肉腫の脱分化機構に注目し、遺伝子解析により軟骨肉腫脱分化の新しい形態を証明することができた。

研究成果の学術的意義や社会的意義

希少がんである肉腫では治療開発が進まず、医師主導での研究で見つかった有望なシーズを臨床応用に繋げることが求められている。今回の研究は滑膜肉腫や軟骨肉腫など、予後不良かつ治療選択のすくない肉腫において新たな視点で治療開発に応用できる可能性を有した結果を得ることができた。学術的にも社会的にも極めて意義深いと考える。脱分化に関しては引き続きの研究を継続中である。

研究成果の概要（英文）：Two studies were conducted to develop therapeutic agents focusing on sarcoma differentiation: First, the Wnt signaling regulator TRAF2 and NCK-interacting protein kinase (TNIK) were examined for their usefulness as therapeutic targets in sarcoma. The second is the clinical application of a novel drug focusing on the malignant transformation mechanism of sarcoma, i.e., dedifferentiation. Focusing on the mechanism of chondrosarcoma dedifferentiation, we were able to prove a new form of chondrosarcoma dedifferentiation by genetic analysis.

研究分野：骨軟部腫瘍

キーワード：肉腫 分化 脱分化

1. 研究開始当初の背景

悪性骨軟部腫瘍は骨肉腫を代表とする悪性骨腫瘍, および脂肪肉腫、未分化多型肉腫などを代表する悪性軟部腫瘍の2つに大別され、肉腫と総称される。症例自体が極めて少なく、近年は希少がんとも称され、がん対策基本法の改訂もあり、当院でも希少がんセンターを設立し、肉腫のトランスレーショナルリサーチに尽力している。しかし希少性かつマーケットが限定される経済的観点からも新規の治療開発がなかなか進んでいない。加えて組織型、発症年齢、発生部位の多様性も開発を困難にする一因である。現在までに個別の肉腫で標準の薬物治療が存在するのは骨肉腫、ユーイング肉腫、横紋筋肉腫と非常に限られた疾患のみである。初診時転移のない軟部肉腫 期(UICC/AJCC)の5年生存率が約50-60%、転移のない骨肉腫は65%程度であり、化学療法の導入で改善してきたものの、AYA世代を始めとする若年者に多い疾患でもあり、未だ予後不良である。教科書的に軟部肉腫の治療には1stラインの薬剤として確立されている抗腫瘍薬は古典的なDoxorubicinとIfosfamideの2剤のみであるが、薬剤耐性肉腫も多い。近年は2ndライン以降の薬剤の開発も進んでいるものの、未だ治療に難渋することが臨床上の大きな問題点である。また免疫療法含めて、新規の有効な薬剤の開発が過去35年肉腫でほとんどないのが現状である。このような状況において新規治療標的の開発のため、肉腫の分化メカニズムに着目した。またWntシグナルを介した治療開発にも着目した。Wntは骨形成や骨代謝の制御のみならず、骨肉腫の化学療法抵抗性や転移、予後、がん幹細胞の維持などに関与することが示されている。様々な基礎研究で同経路を標的とした骨肉腫治療の可能性が示されてきたが、現在までに医薬品として実用化されたものはない。これは、同経路にリン酸化酵素等のdruggableな制御分子が発見されていなかったからである。肉腫の中で特に骨肉腫では様々な分子機構でWntシグナル経路が活性化し、治療標的になると考えられている。我々はWntシグナルの調節因子としてTNIKを同定し、タンパク質リン酸化酵素のTNIKを阻害することで、Wntシグナルを遮断できることをできることを見出し、その阻害化合物NCB-0846を開発し、大腸がん治療に応用できることを報告した。NCB-0846はMYC(c-myc)等の幹細胞の未分化性保持に必須な遺伝子の転写を抑制することで、骨肉腫細胞を脂肪細胞へ分化転換させ、強い抗腫瘍効果を示すことを見出した。このため骨肉腫の新規薬剤としての開発に着想が及んだ。

2. 研究の目的

本研究は肉腫のBreakthrough therapyの開発のため、Wntシグナル調節因子であるTRAF2 and NCK-interacting protein kinase (TNIK)および肉腫ではしばしば認められる脱分化という悪性化メカニズムの2つに着目し、新規薬剤の臨床応用を目指すことが目的である。

(1) TNIK 阻害の肉腫新規分子標的としての有効性と脂肪分化誘導

骨肉腫は学童～青年期を中心に、いわゆるAYA世代に発症する希少がんである。原発性骨悪性腫瘍の1/3を占め、最も頻度が高い。集学的治療の進歩に伴いその予後は改善しているが、化学療法が著効性は50%未満であり、特に再発転移症例に関して未だ予後不良であり、新規薬剤開発のニーズが高い(Meazza et al., Expert Rev Anticancer Ther 2016)。近年Wntシグナルが骨肉腫の発生や化学療法抵抗性、予後などに関与する事が報告されている(Mol Cancer Ther. 2010)。大腸がんにおいては90%以上の症例でWntシグナルの異常が指摘されている。多くの研究者が同経路を標的とした創薬を試みているが、現在まで医薬品として実用化されていない。TNIKはWntシグナルの活性をTCF4, カテニンと結合し、最下流で正に制御する重要な因子である。我々はWntシグナルを最下流で制御するTNIKが大腸がんの有効な治療標的となりうる可能性を報告した(Shitashige et al., Cancer Res. 2010)。さらにTNIKを標的とした阻害剤NCB-0846を発見した(Masuda et al., Nature Commun., 2016)。本研究の目的はNCB-0846より構造展開された誘導体を網羅的にスクリーニングし、適切な化合物を同定することでTNIK阻害剤による分化転換誘導の機序を解明し、治療薬の作用機序(Mode of Action; MOC)を明らかにすることである。

(2) 肉腫における脱分化

肉腫は臨床経過の中で脱分化し、高悪性度腫瘍になることが知られているが、そのメカニズムは未だ明らかでなく、脱分化に着目した治療開発はない。今回我々はこの「脱分化」を標的としたメカニズム解析と治療開発に注目している。この現象は軟部肉腫の約1/3を占める脂肪肉腫で最もよく知られている。脂肪肉腫には現在までに4亜型が知られているが、脱分化型脂肪肉腫が代表的な組織型の1つである。12q14-15(MDM2/CDK4)の遺伝子増幅を高頻度に有するが、薬物療法が確立されておらず、手術のみが治療になることから、切除困難例は予後不良である。また高分化型脂肪肉腫という比較的予後良好な脂肪肉腫が臨床経過の中で10%程度脱分化を生じ、脱分化型脂肪肉腫になることが知られている。また骨肉腫でも近年低悪性度骨肉腫の脱分化の存在が新規疾患概念「脱分化型骨肉腫」として提唱されている。しかし現在までにまとまった報告がなく、その正確な予後のみならず、診断や治療もいまだ確立していない。またいずれの腫瘍においてもこの脱分化の時期を予測することはできず、標的とした治療薬もないことから、臨床上での脱分化のバイオマーカーや薬剤開発が望まれている。細胞分化において、DNAメチル

化に代表されるエピゲノムは遺伝子発現制御の重要な役割を担っているが、肉腫発生とエピゲノム異常との関連を報告したものは殆どない。そこで今回、肉腫の脱分化におけるエピゲノム異常を明らかにし、新規治療薬の開発へ発展させることも目的の1つである。脂肪肉腫に加えて骨原発の軟骨肉腫や骨肉腫にも脱分化の現象が知られているが、脱分化型骨肉腫に至ってはWHO分類が確立していない。肉腫の脱分化の予測は困難で、克服は実臨床での課題である。本研究の目的は肉腫脱分化のゲノム異常と機構を明らかにし、新たな疾患概念確立および予測のためのバイオマーカー同定、脱分化を標的とした新規治療開発も目的である。

3. 研究の方法

TNIK 阻害の肉腫新規分子標的としての有効性と脂肪分化誘導

今回は肉腫の中でも比較的頻度が高く、治療開発が望まれている骨肉腫・滑膜肉腫に注目した。これらの腫瘍は、Wnt シグナルの活性化が報告されている骨・軟部腫瘍の中でも細胞株・動物モデル等の実験系が確立しているうえに、臨床的にも患者数の多い代表的な疾患である。また、Wnt シグナル阻害剤として、大腸癌への有効性が既に立証され機能解析が進んでいる TNIK (TRAF2 and NCK-interacting protein kinase) 阻害剤を用いた。

(1) in vitro での増殖抑制効果の評価・メカニズム解析

TNIK 阻害剤投与に伴う増殖抑制効果を、肉腫細胞株を用いて評価する。また、増殖抑制の機序を、Wnt シグナルパスウェイ上の各分子の発現 (mRNA、タンパク質)、細胞形態、細胞周期に着目して解析を行う。Transcript の解析には、RNA-seq を用いる。

(2) 肉腫がん幹細胞に及ぼす影響の検討

大腸癌において、TNIK 阻害剤投与により、がん幹細胞が制御されることが既に示されている (Masuda et al, Nat Commun, 2016)。肉腫においても同様に、本薬剤によってがん幹細胞が制御され分化傾向に大きな変化がおこる可能性が高いと考えた。そこで、Wnt シグナル阻害前後での、細胞形態や、各分化マーカーの発現変化を解析する。さらにメタボロームの解析を行い、細胞内の代謝経路の変化についても検証する。

(3) Xenograft を用いた in vivo 解析

NOD/SCID マウスに骨肉腫細胞株、滑膜肉腫細胞株を皮下移植した Xenograft マウスを作成し、TNIK 阻害剤投与の有無で腫瘍増大速度、および腫瘍細胞の分化傾向の比較を行う。

(4) 臨床検体での検討

診療で得られる手術検体を用いて、Wnt シグナルパスウェイ上の各分子の発現を後方視的に調査する。化学療法奏功性や、転移の有無、生命予後など臨床情報と Wnt シグナルの相関や、原発巣と転移巣との発現量の違い等を比較することで、骨軟部腫瘍における Wnt シグナルの役割について言及する。

肉腫における脱分化に関して

3 症例の脱分化型脂肪肉腫を対象として、計 29 箇所 (WD 成分 11 箇所、DD 成分 18 箇所) の腫瘍組織検体を採取して WES 解析及び RNAseq を施行し、その腫瘍内不均一性を検討した。また異時性脱分化を認めた脱分化型軟骨肉腫症例を用いて検討を行い、全エクソームシーケンシング (WES) を行った。

4. 研究成果

TNIK 阻害の肉腫新規分子標的としての有効性に関しては滑膜肉腫に対してその発現および細胞株での TNIK 阻害剤に対する有効性を検証した。われわれは滑膜肉腫の 4 つの細胞株 (HS-SY-、SYO-1、Yamato、SS、AskaSS) で Wnt シグナルと TNIK の活性化を評価した。また TNIK 阻害剤である NCB-0846 の有効性を検討した結果、2 つの滑膜肉腫細胞株で Wnt シグナルと TNIK の活性化が認められ、これらの細胞株は阻害剤である NCB-0846 に対して高い感受性を示した。これらの薬剤高感受性の細胞株を用いて様々な遺伝子に対する siRNA を用いて増殖抑制効果を検討した結果、NOD/SCID 免疫不全マウスに腫瘍細胞を移植した xenograft で in vivo の増殖抑制効果を確認できた。

3 症例の脱分化型脂肪肉腫を対象として、計 29 箇所 (WD 成分 11 箇所、DD 成分 18 箇所) の腫瘍組織検体を採取して WES 解析及び RNAseq を施行した結果、少なくとも一部の脱分化型脂肪肉腫においては、腫瘍発生の極めて早期に高分化成分 (WD) のクローン脱分化成分 (DD) のクローンが分岐し、それぞれが別個にクローン進化した後多様性を獲得して WD 成分と DD 成分を形成することで腫瘍内不均一性が生じているという知見を得た。本結果は WD 成分から DD 成分が発生するという古くからの仮説を否定するものであり、脱分化のメカニズムに迫る上で重要な所見であることが示唆された。一方、本研究においても 3 例 18 箇所の DD サンプル全てに共通した遺伝子異常は見つからなかった。また脱分化型軟骨肉腫においては denovo での発生、もしくは通常型軟骨肉腫からの異時性脱分化が知られているが、原発巣とは異なる部位に異時性に脱分化成分のみが生じる現象は知られていない。通常型軟骨肉腫治療後に異時性に別部位に肉腫を生じた症例で、原発軟骨肉腫と異時性に発生にした肉腫両者の全エクソームシーケンシ

グ(WES)を行った結果、軟骨成分を有さない高悪性度肉腫が原発である通常型軟骨肉腫と同じ遺伝子変異を生じていることを証明し、この肉腫が脱分化成分であることを遺伝学的に証明しえた。原発巣と異なる部位に発生した軟骨肉腫異時性脱分化の存在を世界で初めて分子遺伝学的に証明することができた。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計3件（うち査読付論文 1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 Hirozane Toru, Masuda Mari, Sugano Teppei, Sekita Tetsuya, Goto Naoko, Aoyama Toru, Sakagami Takato, Uno Yuko, Moriyama Hideki, Sawa Masaaki, Asano Naofumi, Nakamura Masaya, Matsumoto Morio, Nakayama Robert, Kondo Tadashi, Kawai Akira, Kobayashi Eisuke, Yamada Tesshi	4. 巻 6
2. 論文標題 Direct conversion of osteosarcoma to adipocytes by targeting TNIK	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 JCI Insight	6. 最初と最後の頁 e137245
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1172/jci.insight.137245	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 Sekita Tetsuya, Yamada Tesshi, Kobayashi Eisuke, Yoshida Akihiko, Hirozane Toru, Kawai Akira, Uno Yuko, Moriyama Hideki, Sawa Masaaki, Nagakawa Yuichi, Tsuchida Akihiko, Matsumoto Morio, Nakamura Masaya, Nakayama Robert, Masuda Mari	4. 巻 12
2. 論文標題 Feasibility of Targeting Traf2-and-Nck-Interacting Kinase in Synovial Sarcoma	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Cancers	6. 最初と最後の頁 1258 ~ 1258
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3390/cancers12051258	査読の有無 有
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 -

1. 著者名 Toki S., Kobayashi E., Yoshida A., Ogura K., Wakai S., Yoshimoto S., Yonemori K., Kawai A.	4. 巻 101-B
2. 論文標題 A clinical comparison between dedifferentiated low-grade osteosarcoma and conventional osteosarcoma	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 The Bone & Joint Journal	6. 最初と最後の頁 745 ~ 752
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1302/0301-620X.101B6.BJJ-2018-1207.R1	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2件（うち招待講演 0件/うち国際学会 0件）

1. 発表者名 関田哲也、山田哲司、小林英介、増田万里
2. 発表標題 滑膜肉腫に対するTNIK阻害剤の有効性
3. 学会等名 第39回日本分子マーカー研究会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 E. Kobayashi, S. Toki, A. Yoshida, A. Kawai
2. 発表標題 Clinical Outcome of Dedifferentiated Low-grade Osteosarcoma
3. 学会等名 20th General Meeting of the International Society of Limb Salvage
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
---------------------------	-----------------------	----

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
---------	---------