

令和 5 年 6 月 22 日現在

機関番号：82713

研究種目：基盤研究(C)（一般）

研究期間：2019～2022

課題番号：19K09661

研究課題名（和文）PDXとCDK4阻害剤を用いた脱分化型脂肪肉腫の治療戦略の確立

研究課題名（英文）Development of therapeutic strategies for DDLS with CDK4 inhibitor in PDX

研究代表者

比留間 徹（HIRUMA, Toru）

地方独立行政法人神奈川県立病院機構神奈川県立がんセンター（臨床研究所）・その他部局等・部長

研究者番号：20254188

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）：脱分化型脂肪肉腫（DDLS）の手術検体から確立した2系統のPDXマウスに、CDK4/6阻害剤であるPalbociclibを投与し、その腫瘍抑制効果を示した。投与群と対照群の腫瘍から抽出したRNAの塩基配列解析を行ったところ、インタラクトーム解析からはがん細胞（ヒト）と間質細胞等（マウス）の相互作用の大きな変化は見られなかった。一方、がん細胞、間質細胞それぞれで、Palbociclib投与による遺伝子発現変化を指標にしたパスウェイ解析を行ったところ、前者でペントースリン酸系（非酸化リン酸化を含む）が、後者でRNAポリメラーゼII複合体系で発現の変化が大きかった。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究では、CDK4陽性DDLSの患者由来ゼノグラフト（PDX）でPalbociclibの腫瘍抑制効果を示すことが出来た。RNA塩基配列を基にしたパスウェイ解析から、がん細胞ではPalbociclib投与により、ペントースリン酸系（非酸化リン酸化を含む）、タンパク質ユビキチン化系や低酸素応答系などで、間質細胞では、RNAポリメラーゼII複合体系、アンドロゲンシグナル系やサーチュインシグナル系などで遺伝子発現が変化していた。これらの経路は治療法開発の標的候補となる可能性がある。

研究成果の概要（英文）：We investigated the tumor-suppressive effects of Palbociclib, a CDK4/6 inhibitor, in two established PDX mouse models derived from surgical specimens of dedifferentiated liposarcoma. Mice in the treatment group received Palbociclib, while the control group received a placebo. RNA sequencing analysis was performed on tumor samples extracted from both groups to examine the gene expression changes. Interactome analysis revealed no significant alterations in the interaction between human cancer cells and mouse stromal cells. However, pathway analysis based on gene expression changes indicated substantial differences in the pentose phosphate pathway (including non-oxidative phosphorylation) in cancer cells and the RNA polymerase II transcriptional complex system in stromal cells upon Palbociclib treatment.

研究分野：骨軟部腫瘍外科

キーワード：患者由来ゼノグラフト 脱分化型脂肪肉腫

様式 C-19、F-19-1、Z-19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

多型肉腫は組織形態学的な診断が困難な腫瘍であるが、適格な病理診断をすることで、予後や、局所再発、或いは遠隔転移のリスクを予測し診療に活かすことが可能となる。近年は、一部の組織型については、特異的な分子マーカーが見出され、免疫染色や染色体構造変化を検出する FISH 等を用いて、より適格な病理診断がされるようになってきている。特に、高分化成分を伴わない脱分化型脂肪肉腫 (DDLs) と他の多型肉腫の病理組織学的鑑別は困難であったが、90%以上の高分化型脂肪肉腫 (well differentiated liposarcoma, WDLs) / 脱分化型脂肪肉腫 (dedifferentiated liposarcoma, DDLs) では染色体 12q13-15 領域の増幅を伴う染色体構造変化の結果、MDM2、CDK4 などの遺伝子増幅と遺伝子産物 (タンパク質) の増加があることが発見され、MDM2/CDK4 の免疫染色や FISH が診断の強力なツールとなっている (Hornick JL. *Ann Diag Pathol*, 2018)。

そして、これらは診断ツールのみならず治療の標的ともなっているが、MDM2 阻害剤 nutlin-3 は、2004 年の発表以来、未だ試験薬の域を出ていない (Vassilev LT, et al. *Science* 303, 844-8, 2004)。一方、CDK4 阻害剤については、CDK4/6 阻害剤の Palbociclib、Abemaciclib が、ホルモン療法薬との併用で、ホルモン受容体陽性 / HER2 陰性の進行再発乳癌の治療薬としてごく最近承認された (Rubico C et al. *Clin Ca Res*, 2018)。Laroche-Clary らは、樹立された DDLs の細胞株を移植したマウスの動物実験で、nutlin-3 と Palbociclib の併用が、移植片の増殖抑制とマウス OS を改善したと報告している (*J Hematol Oncol* 10(1):123, 2017)。進行 WD / DDLs に対する Palbociclib 単剤での第 2 相試験は、2 試験が実施され、無増悪生存期間の延長が報告されたが、血液学的毒性等からその後の開発は進んでいない (Dickson MA et al. *J Clin Oncol* 31: 2024-29, 2013. Dickson MA et al. *JAMA Oncol* 2:937-40, 2016)。

腫瘍細胞とこれを取り巻く間質、微小環境との相互作用を理解することは、治療法の開発に有用である。これまで、このような研究は上皮性の癌細胞を中心に進められ、癌細胞の生存に必要な増殖因子-受容体、血管誘導 / 新生、運動 / 浸潤等に係わる重要な関係が見出されている。一方、肉腫については、肉腫細胞そのものが間葉系の間質を構築する成分を発生母地とする事も多いことから、十分に研究されていない現状にある。肉腫腫瘍細胞と間質細胞での網羅的遺伝子発現解析を行った報告は皆無である。

2. 研究の目的

CDK4/6 阻害剤が最近上市され、CDK4 遺伝子増幅 / タンパク質高発現を伴う DDLs について、分子標的治療を開発するチャンスが生まれている。一方で、先行する第 2 相試験や、ホルモン受容体陽性 / HER2 陰性の転移陽性乳癌での知見から、CDK4/6 阻害剤単剤での制御は困難であること、また、二次的な遺伝子変異の獲得を背景として治療耐性が生ずることが想定される。本研究では、それを制御・抑制することにより CDK4 阻害剤との併用で相乗的な治療効果が期待されるような標的分子 / 標的経路、を、これまで肉腫に応用されたことのない「PDX を用いたインターオーム解析」による「網羅的で詳細な微小環境と肉腫細胞の相互作用解析」を実施して見出し、DDLs の新規治療戦略の基礎となる概念を確立することを目的とする。

本研究では、切除不能の進行 / 転移陽性肉腫では未だに予後の改善が見られないことから、他がん種での分子標的治療薬の実臨床での承認の機会を捉えて、DDLs の分子標的治療の開発を試みるものである。既に樹立している 2 系統の DDLs の PDX という独自性の高い研究資源の活用に加えて、超免疫不全マウス NSG で作製する PDX の特性を活かした「網羅的で詳細な微小環境と肉腫細胞の相互作用解析」を進めて、肉腫細胞そのものを標的とする分子標的治療薬の効果や二次耐性の発生に対処する治療戦略を探る。

3. 研究の方法

既に乳がん治療薬として承認されている CDK4/6 阻害剤 Palbociclib について、樹立済みの DDLs-PDX モデル、DDLs-1、DDLs-2 の 2 系統を NSG マウスに移植し、in vivo の抗腫瘍効果を検討する。

マウス皮下に PDX を移植し、腫瘍が肥大し始める時点で、治療薬または溶媒のみの投与を開始する (各群 n=4)。DMSO に溶解した Palbociclib と、0.5%PEG3000/ 0.5%Tween80 を投与直前に 4:6 で混合する。1 回 150mg/kg を週 3 回経口投与する。対照群の腫瘍が 1000 mm³ を越えた時点で屠殺する。採取した腫瘍は、液体窒素で凍結、10%中性緩衝ホルマリン固定パラフィンに包埋 (FFPE) して保存する。

凍結組織から total RNA を抽出し、ヒトとマウスの mRNA 塩基配列の違いから、がん細胞（ヒト）と間質細胞等（マウス）の遺伝子発現を区別し、がん細胞と微小環境（リガンド-受容体間等）の相互作用を解析する「インタラクトーム解析」や、がん細胞と間質細胞等でのパスイ解析を行う。

4. 研究成果

DDLS-1、DDLS-2 の PDX 2 系統で Palbociclib を投与した。それぞれ対照群と投与群 4 匹のマウスの両腹側に PDX を移植した。DDLS-1 は移植後 2 4 日目から投与を開始して 4 2 日後に腫瘍体積(長径 X 短径²/3)を測定した。図には対照群の PDX 7 個、投与群 8 個の PDX の結果を、DDLS-2 は移植後 1 3 日目から投与を開始して 3 1 日目の腫瘍体積を対照群、投与群共に 8 個の PDX の結果を示した。両系統とも有意差を以て Palbociclib 投与により腫瘍の増殖抑制効果が見られた(図 1)。

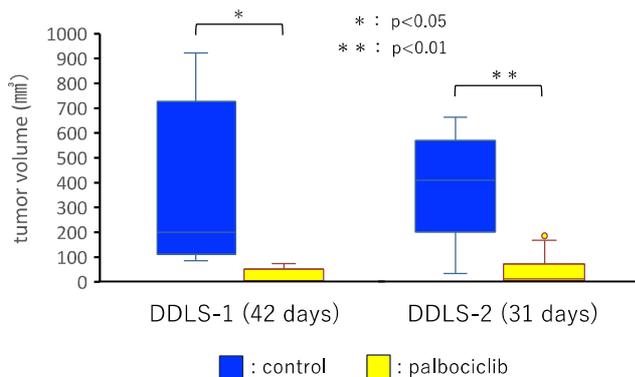


図1. Palbociclibによる腫瘍の増殖抑制効果

これらの PDX から作製したパラフィン包埋切片で免疫染色を行ったところ、CDK4、CDK6、MDM2 では Palbociclib 投与群と対照群で差は見られなかった。一方、Ki-67 は Palbociclib 投与群で陽性細胞が少なく、画像解析ソフト (HALO) により求めた Ki-67 index は投与群で有意に低く、増殖が抑制されていると考えられる(図 2)。

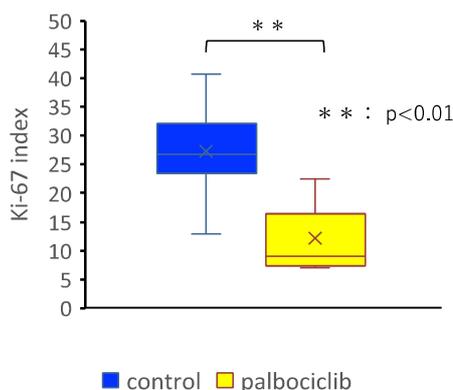


図2. PDXのKi-67免疫染色

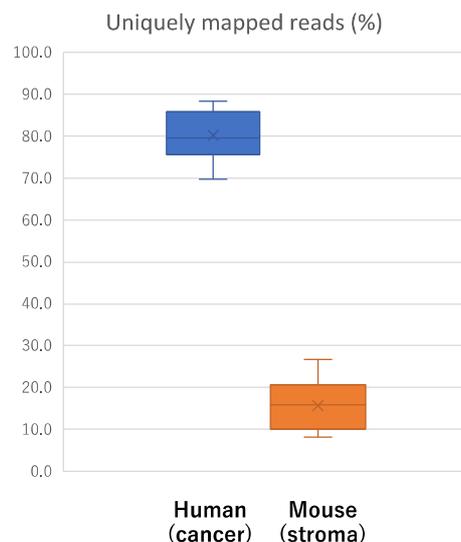


図3. RNA塩基配列から見たがん細胞と間質細胞の比率

治療実験を行った PDX (DDLS-1: 対照群 4 個、投与群 3 個、DDLS-2: 対照群 4 個、投与群 4 個) から RNA を抽出し、塩基配列を決定した。継代した PDX では間質系の細胞がヒトからマウスの細胞に置き換わって言えることから、各リードはヒトの配列であればがん細胞、マウスの配列であれば間質細胞由来と考えられる。各 PDX のリードをヒト、マウスにマップした結果、およそ 8 割の RNA がヒトの配列、即ち癌細胞由来と考えられた(図 3)。

免疫染色の結果から CDK4、MDM2 は Palbociclib 投与群と対照群で差は見られなかったが、RNA 発現解析においても同様の結果が得られた。CDK4、MDM2、TP53 の遺伝子発現量を FPKM (fragments per kilobase of exon per million reads mapped) で表したグラフを図 4 に示す。

得られた RNA 塩基配列からインタラクトーム解析を行ったところ、Palbociclib 投与群と対照群で大きな変化は見られなかった。これは解析に用いた「CASTIN」システムに登録されているリガンド受容体の遺伝子発現は Palbociclib 投与により大きな変化はないことを示している。

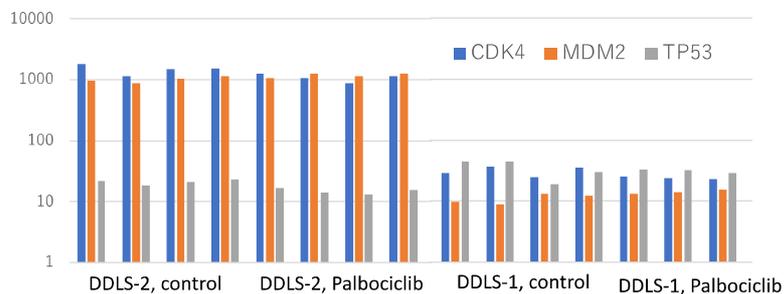


図4. CDK4、MDM2、TP53の遺伝子発現

一方、RNA 塩基配列を基にしたパスウェイ解析 (IPA、QIAGEN 社) から、がん細胞では Palbociclib 投与により、ペントースリン酸系 (非酸化的リン酸化を含む) タンパク質ユビキチン化系や低酸素応答系などで、間質細胞では、RNA ポリメラーゼ II 複合体系、アンドロゲンシグナル系やサーチェインシグナル系などで遺伝子発現が変化していた。今後、これら経路の解析により、新たな治療法開発の標的候補が見つかる可能性がある。また、これまで実施していない融合遺伝子の解析を進めていけば新規のドライバー変異が見つかる可能性もある。

以上

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計1件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 大津敬、笠島理加、比留間徹、宮城洋平、他8名
2. 発表標題 肉腫患者由来ゼノグラフトのRNA発現解析
3. 学会等名 第79回日本癌学会学術総会
4. 発表年 2020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
研究分担者	宮城 洋平 (MIYAGI Yohei) (00254194)	地方独立行政法人神奈川県立病院機構神奈川県立がんセンター（臨床研究所）・臨床研究所・所長 (82713)	
研究分担者	大津 敬 (OHTSU Takashi) (10270696)	地方独立行政法人神奈川県立病院機構神奈川県立がんセンター（臨床研究所）・その他部局等・副技官・主任研究員 (82713)	
研究分担者	笠島 理加 (KASAJIMA Rika) (20630875)	地方独立行政法人神奈川県立病院機構神奈川県立がんセンター（臨床研究所）・臨床研究所・副技官・主任研究員 (82713)	

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