

令和 3 年 6 月 22 日現在

機関番号：82606

研究種目：若手研究

研究期間：2019～2020

課題番号：19K18136

研究課題名(和文) 腹膜偽粘液腫の治療法の開発：ゲノム解析と患者由来がんモデルを用いたスクリーニング

研究課題名(英文) Development of treatment in pseudomyxoma peritonei: using genome analysis and high-throughput drug screening of patient-derived model

研究代表者

野口 玲 (Noguchi, Rei)

国立研究開発法人国立がん研究センター・研究所・特任研究員

研究者番号：30779682

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)：本研究の目的は、希少がんである腹膜偽粘液腫に対する奏効性を有する抗がん剤を見つかることである。腹膜偽粘液腫は、標準治療はなく、外科的治療による原発巣の切除と粘液物質の除去およびマイトマイシンCの腹腔内灌流化学療法が効果的とされている。しかし、腫瘍の完全切除は困難で、数年の経過で約40%が再発を繰り返す。細胞株や実験動物などのモデル系がないため、基礎研究や前臨床試験を行うことが難しい。本研究は、患者由来がんモデルを作製し、それを薬剤スクリーニングを行い、既存薬の適応拡大を行った。

研究成果の学術的意義や社会的意義

100万人に1人の割合で発症する希少がんである腹膜偽粘液腫は研究に用いることのできるモデル生物がない。そのため、治療法開発が進まず、既存の治療法で治療を行っている。本研究で腹膜偽粘液腫の患者由来がんモデルを作製し、それをを用いて、薬剤標的および薬剤を同定することで、腹膜偽粘液腫の治療に前臨床段階にて貢献することができる。

研究成果の概要(英文)：Pseudomyxoma peritonei (PMP) is a rare tumor with an estimated incidence of 1-2 per million per year. PMP shows a variety of clinical manifestations by the dissemination of mucin producing tumor cells in peritoneal cavity. The current standard therapy for PMP is complete cytoreductive surgery (CRS) followed by hyperthermic intraperitoneal chemotherapy (HIPEC), which improved the prognosis of patients with PMP. However, 30-40% of patients were not treated by HIPEC by their advanced disease, and patients with recurrent disease are difficult to cure. Novel therapies are required to treat PMP. Although patient-derived cell lines are a critical tool for basic and pre-clinical research, only one PMP cell line is reportedly available for analysis. Thus, we aimed to establish and characterize a novel patient-derived cell line for PMP. Using tumor tissue of a patient with PMP, we established two PMP cell lines and identified effective anti-cancer drugs using the established PMP cell lines.

研究分野：希少がん

キーワード：腹膜偽粘液腫 患者由来がんモデル セルソーター 無血清培地

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

腹膜偽粘液腫 (Pseudomyxoma peritonei: PMP) はきわめて希少な悪性腫瘍で、年間 100 万人に 1-2 人の割合で発症する。主に虫垂から発生し、播種により腫瘍細胞が腹膜に転移する。腫瘍細胞が粘液を大量に産生し、腹腔内に貯留し、様々な症状を呈す。腹膜偽粘液腫の発生メカニズム解明のため、次世代シーケンサーを用いた遺伝子変異解析が 2011 年頃から海外で実施されている。申請者は、次世代シーケンサーによる遺伝子解析を行い、PMP の発生には KRAS, GNAS 遺伝子変異、悪性化に関わる TP53 遺伝子異常が関与すると明らかにした (表 1)。

表1. PMPにおける遺伝子変異

組織学的分類		DPAM※1										PMCA※2							
サンプル番号		1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	1	2	3	4	5	6	7	8
変異のあった遺伝子	KRAS	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■
	GNAS			■				■	■	■	■			■	■	■	■	■	■
	TP53											■	■					■	■
	PIK3CA													■					
	AKT1											■							
	SMAD4	■								■					■				
	NRAS																		■
	PDGFRA															■			
	RET		■	■															
	VHL	■																	
免疫染色	p53											■						■	■

※1: DPAM (disseminated peritoneal adenomucinosis), 低悪性度群 ※2: PMCA (peritoneal mucinous carcinomatosis) 高悪性度群  
Noguchi R et al. Cancer med 2015

**KRAS, GNASはPMPの発生、TP53はPMPの悪性化に関連する。**

2014 年頃から、全エクソンシーケンス解析が Sio らや Nummela らにより報告されている。しかし、治療応用可能な遺伝子変異・パスウェイは同定されていない。腹膜偽粘液腫において治

療のターゲットとなる遺伝子やパスウェイはあるのであろうか？これがわかれば、腹膜偽粘液腫に有効な治療を開発することができる。

腹膜偽粘液腫にはいまだ確立された標準治療がない。姑息的には、外科的治療による原

**PMPは高頻度に再発する。**

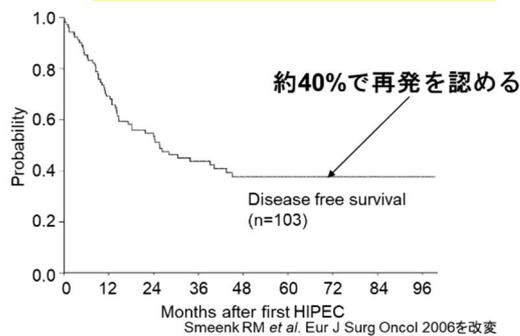


図1: PMPの再発率

図1: PMPの生存曲線。103人のHIPEC施行後のPMP患者におけるdisease free survivalを示す。

表2: PMPの治療内容

研究者	センター	エビデンスレベル ※1	人数	治療内容
Sugarbaker	Washington	level 4	501	MMC※2
Sugarbaker	Washington	level 4	356	MMC
Zoetmulder	Amsterdam	level 4	103	MMC
Zoetmulder	Amsterdam	level 4	103	MMC
Loggie	Winston-Salem	level 4	110	MMCもしくはcisplatin
Piso	Regensburg	level 4	28	MMC+cisplatin
Deraco	Milan	level 4	33	MMC+cisplatin
Glehen	Lyon	level 4	27	MMC+cisplatin
McGregor	Vanvouver	level 4	11	MMC+5-FU
Morris	Sydney	level 4	50	MMC

※1:エビデンスレベル:level 4:コントロール群のない観察研究。※2:MMC:マイトマイシンC Yan TD et al. J Clin Oncol 2006

**PMPにおいて標準治療が存在しない**

発巢の切除と粘液物質の除去およびマイトマイシンCの腹腔内灌流化学療法が用いられている(表2)。腫瘍の完全切除は困難で、約40%が再発を繰り返し(図1)、根治可能な治療法はない。腹膜偽粘液腫に奏効性を有する抗がん剤を探すことによって根治に近づく治療を開発することができると考えた。しかし、疾患の希少性と細胞株やモデルマウスなどの患者由来がんモデルがないことから前臨床試験の施行が難しく、治療法開発が遅れていることが問題である。これを解決するために、腹膜偽粘液腫の患者由来がんモデルは作製が必須である。

2. 研究の目的

本研究の目的は、希少がんである腹膜偽粘液腫に対する奏効性を有する抗がん剤を見つけることである。腹膜偽粘液腫 (Pseudomyxoma peritonei: PMP) は、年間 100 万人に 1-2 人の割合で発症する、希少な粘液産生腫瘍である。腹膜偽粘液腫に対して、確立された標準治療はなく、外科的治療による原発巣の切除と粘液物質の除去およびマイトマイシン C の腹腔内灌流化学療法が最も効果的とされている。しかし、腫瘍の完全切除は困難であり、数年の経過で約 40% が再発を繰り返す。根治可能な治療法は未だ存在しない。腹膜偽粘液腫が希少であること、細胞株や実験動物などのモデル系がないことから、基礎研究や前臨床試験を行うことが難しい。そのために、腹膜偽粘液腫の治療開発が停滞している。

本研究は、別の疾患治療薬として開発された既存薬剤の中から腹膜偽粘液腫に奏効性を有する抗がん剤を見つける「既存薬の適応拡大」を行う。アプローチとして「ゲノム解析」と「患者由来がんモデルを用いたスクリーニング」の 2 つを用いる。本研究の成果をもって、前臨床試験を行い、研究終了後に臨床試験を行う予定である。

### 3. 研究の方法

研究の方法として 2 つのアプローチをとる。「ゲノム解析」と「患者由来がんモデルを用いたスクリーニング」である (図 3)。

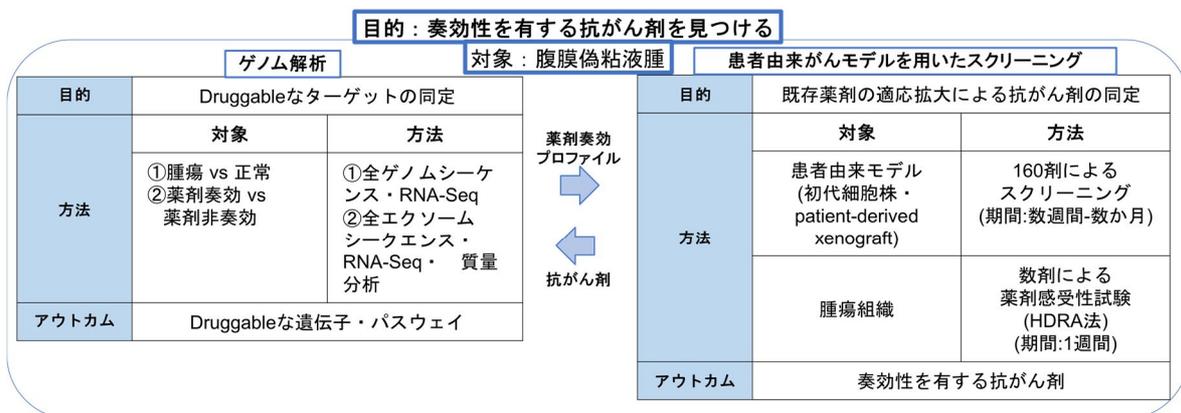


図3: 本研究の研究計画。目的は奏効性を有する抗がん剤を見つけることで、対象は腹膜偽粘液腫である。「ゲノム解析」と「患者由来がんモデルを用いたスクリーニング」の2つのアプローチからなる。各アプローチは目的・方法・アウトカムで構成される。

第一のアプローチとしてゲノム解析を使用する。申請者は腹膜偽粘液腫の臨床検体 10 例分を用いて全ゲノムシーケンスと RNA-Seq 解析を施行し、PI3K-AKT パスウェイを治療標的として同定した。この情報に基づき、mTOR パスウェイの既存阻害薬について患者由来がんモデルを用いた薬剤感受性試験を行い、mTOR パスウェイ阻害薬の奏効性を確認する。第二に、「患者由来がんモデルを用いたスクリーニング」である。これは患者由来がんモデルと既存抗がん剤のライブラリーを用いて、抗腫瘍効果を示す抗がん剤を同定するスクリーニングである。使用するモデルは 2 種類である。まず、腫瘍組織を体外で維持して薬効評価系に使用する HDRA 法 (Histoculture Drug Response Assay 法) そして腫瘍組織から樹立する培養細胞株を使用する。有望な抗がん剤については、patient-derived xenograft (PDX) を使用して、抗腫瘍効果および薬効関連するパスウェイ・遺伝子を確認する。

### 4. 研究成果

腹膜偽粘液腫の 10 症例分の腫瘍組織と正常組織を用いて、RNA-Seq を行い (論文作成中)、腫瘍に特異的な pathway を同定した。その RNA-Seq のデータをもとに無血清培地を数種類作製し (論文作成中)、培養を行う基質とともに検討を行った。検討の結果、腫瘍組織から腹膜偽粘液腫の上皮細胞のみを回収し、回収細胞を腹膜偽粘液腫のための無血清培地と特殊基質 (MEF + マトリ

ゲルで作製したもの)で腹膜偽粘液腫の初代培養株を2細胞株樹立することに成功した。樹立した細胞株は5か月間培養し、25代継代することができた。樹立株では腹膜偽粘液腫に特徴的なKRASの遺伝子変異を認め、またSTK11の欠失を認めた。同樹立細胞をヌードマウスに腹腔内に同所性移植を行ったところ、腹腔内に細胞が播種し、結節形成を認め、臨床像と同じ所見を再現することができた。同樹立細胞株において214剤の抗がん剤で薬剤感受性試験を行い、普段腹膜偽粘液腫に用いるマイトマイシンCが奏効すること、また新規の薬剤3種(論文投稿予定のため非公開)を同定した。今後、薬剤標的を同定するために質量分析およびキナーゼ活性解析を行う予定である。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔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
--	---------------------------	-----------------------	----

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