

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

令和 5 年 6 月 14 日現在

機関番号：13301

研究種目：研究活動スタート支援

研究期間：2020～2022

課題番号：20K22802

研究課題名（和文）マルチキナーゼ阻害薬による新規骨肉腫治療の開発

研究課題名（英文）Development of a novel treatment for osteosarcoma with multi-kinase inhibitors

研究代表者

樋口 貴史（Higuchi, Takashi）

金沢大学・医学系・協力研究員

研究者番号：00728719

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 2,200,000円

研究成果の概要（和文）：本研究の目的は骨肉腫に対するマルチキナーゼ阻害剤の有効性を検討することで、結果が臨床に直結するように、薬剤感受性試験の予測能が高い患者由来組織同所移植モデルを骨肉腫患者組織を用いて樹立した。二系統の骨肉腫患者由来組織同所移植モデルに対し、臨床応用されているマルチキナーゼ阻害薬であるパゾパニブ、ソラフェニブ、スニチニブ、レゴラフェニブ、クリゾチニブと第一選択薬のシスプラチンを投与した。スニチニブ群とソラフェニブ群の軽度増殖抑制効果とレゴラフェニブ群での著明な抗腫瘍効果を認め、レゴラフェニブ群では、病理切片で腫瘍の完全壊死を認めた。レゴラフェニブが骨肉腫において有用であると考えている。

研究成果の学術的意義や社会的意義

患者由来組織同所移植モデルによる解析は、研究結果が臨床に直結しやすく、見出した薬剤をドラッグリポジショニングすることで、新規の治療薬として臨床応用に繋げることが期待できる。骨肉腫は希少がんである故に、治療法の進歩が少ないため、他の癌腫に比べ、使用できる薬剤が少なく、治療成績も30年以上にわたり変化していない。マルチキナーゼ阻害薬も他癌腫では広く用いられており、骨肉腫に有用な可能性を指摘されているが、臨床応用されていない。本研究の解析結果でレゴラフェニブが骨肉腫に有用な可能性を見出すことができ、骨肉腫治療に対する新しい治療戦略の開発に寄与すると確信している。

研究成果の概要（英文）：The purpose of this study was to investigate the efficacy of multi-kinase inhibitors in osteosarcoma. To make the results relevant to clinical practice, a patient-derived orthotopic xenograft model, which has been reported to have high predictive ability in drug sensitivity test, was established using osteosarcoma patient tissues. Two osteosarcoma patient-derived orthotopic xenograft models were treated with the clinically available multi-kinase inhibitors pazopanib, sorafenib, sunitinib, regorafenib, crizotinib, and the first-line drug cisplatin. Mild growth inhibition in the sunitinib and sorafenib groups and marked growth inhibition with tumor regression in the regorafenib group were observed. In the regorafenib group, pathologic sections showed complete necrosis of the tumor. We believe that regorafenib is effective in osteosarcoma.

研究分野：整形外科

キーワード：骨肉腫 マルチキナーゼ阻害薬 患者由来組織移植モデル 化学療法

## 様式 C-19、F-19-1、Z-19 (共通)

### 1. 研究開始当初の背景

近年、分子標的薬や免疫療法の開発に伴い、多くの癌腫において治療成績が向上している。一方、骨肉腫の発生数は本邦において年間 200 人前後に過ぎず、新規治療の開発が進行せず、今でも臨床使用可能な化学療法はシスプラチン、ドキソルビシン、イホスファミドとメソトレキセートに限られている。このように薬剤開発が進まない希少がんにおいて、別の疾患の治療薬を転用する **drug repurposing** が高い関心を集めている。

我々は患者由来腫瘍をヌードマウスに同所性移植したモデル(患者由来組織同所移植モデル)を用いて、既存薬の中から骨肉腫に有効な薬剤を解析している。その中で、マルチキナーゼ阻害薬に分類され、腎癌治療に用いられるソラフェニブが骨肉腫の増殖を抑制することを報告し、マルチキナーゼ阻害薬が骨肉腫に対して効果的に作用する可能性を見出した。これまでに、ソラフェニブ以外にも数種類のマルチキナーゼ阻害薬が、一部の癌腫に対して使用されているが、骨肉腫に対する効果は明らかではない。骨肉腫に有用なマルチキナーゼ阻害薬を見出すことは、骨肉腫の新たな治療戦略を開発することに繋がると考えている。

### 2. 研究の目的

本研究の目的は、複数の骨肉腫患者由来組織同所移植モデルを用いて、マルチキナーゼ阻害薬の中から骨肉腫に有用な薬剤を明らかにすることである。さらに治療した腫瘍の病理学的解析を行い、見出した薬剤の骨肉腫に対する抗腫瘍効果メカニズムを明らかにすることで、骨肉腫の新たな治療薬の可能性を検討することである。

### 3. 研究の方法

(1) 動物：4~6 週齢のヌードマウスを使用。マウスに対するすべての侵襲的処置は、National Institutes of Health Guide for the Care and Use of Animals の原則と手順に従って、動物の苦痛を最小限に抑えるために適切な麻酔と鎮痛剤の下で行った。

(2) 患者腫瘍：患者 1, 14 歳, 骨盤の骨芽細胞型骨肉腫患者の生検検体の一部を使用した。生検前に化学療法も放射線療法も行われていない。患者 2, 23 歳, 左脛骨の転移病変の手術検体の一部を使用。本症例は大腿骨の骨芽細胞型骨肉腫に対し、シスプラチン (CDDP) ベースの化学療法の治療後、肺転移を呈した。

患者およびその両親から書面によるインフォームドコンセントを取得している。

(3) 患者由来同所移植モデルの作成：検体を on ice で研究室に運び、小切片にしてヌードマウスの皮下背部に移植し、増殖させることで腫瘍のストックを作成した。

骨肉腫 PDOX モデル。直径 10mm 以上に成長した皮下移植腫瘍を切除し、切除した腫瘍から小断片 (2~3mm) を作成した。ヌードマウスへの腫瘍の SOI は、前述のように行った；大腿遠位部の外側で 10-15mm の皮膚切開を行った。外側広筋と大腿二頭筋を分割し、膝蓋大腿靭帯外側を切断して大腿骨遠位端に到達させた。大腿骨の外側顆をハサミで切除し、空間を作った。このスペースに 1 個の腫瘍片を挿入し、筋肉だけでなく皮膚も 6-0 ナイロンで縫合した。

(4) 薬剤：骨肉腫の標準的な第一選択薬であるシスプラチン (CDDP)、軟部肉腫と腎細胞癌で承認されたマルチキナーゼ阻害薬であるパゾパニブ (PAZ)、消化管間質腫瘍 (GIST) および腎細胞癌で承認されたスニチニブ (SUN)、腎細胞癌、肝細胞癌、甲状腺癌で承認された sorafenib (SFN)、非小細胞肺癌、悪性リンパ腫で承認された crizotinib (CZT)、転移性大腸がん、GIST、転移性肝癌で承認された regorafenib (RGF)、Vehicle としてリン酸緩衝塩 (PBS) をそれぞれマウスモデルに投与した。

(5) 分類：骨肉腫の患者由来同所移植モデル (患者 1 と 2) をそれぞれ 7 つの治療群に分けた Group 1, コントロール (PBS, 100  $\mu$ l/マウス, 経口, 毎日, n = 6) ; Group 2, CDDP (6mg/kg, 腹腔内注射, 週に 1 回, n = 6) ; Group 3, PAZ (50mg/kg, 経口, 毎日, n=6) ; Group 4, SUN (40mg/kg, 経口, 毎日, n=6) ; Group 5, SFN (30mg/kg, 経口, 毎日, n=6) ; Group 6, CZT (25mg/k, 経口, 毎日, n=6) ; Group 7, RGF (30mg/kg, 経口, 毎日, n=6)。

(6) 治療と測定：マウスモデル作成 3 週間後に開始した。治療期間は 2 週間とした。腫瘍の径とマウスの体重は、1 週間に 2 回、デジタルノギスとデジタルスケールを用いて測定した。腫瘍サイズは、腫瘍体積 [mm<sup>3</sup>] = 長径 [mm] × 短径 [mm] × 短径 [mm] × 0.5 による計算で概算した。

(7) 病理学的解析：切除した腫瘍は、ホルマリンで十分に固定した後、パラフィンに包埋し、切片化し、染色を行った。キシレンおよびエタノールで組織切片を脱パラフィンした後、切片をヘマトキシリン・エオジン (HE) で染色した。

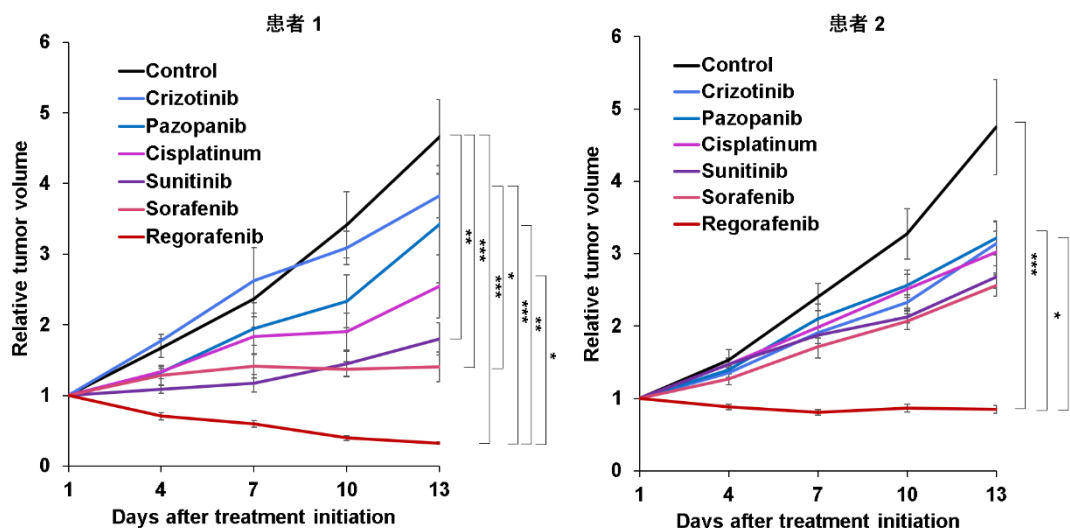
(8) 統計解析：統計解析には、統計ソフト EZR (自治医科大学埼玉医療センター) を用いた。One-way ANOVA または paired t-test を行った。データは、平均値 ± 標準誤差 (SEM) で示した。p 値はすべて両側で、p ≤ 0.05 を有意とした。

### 4. 研究成果

(1) 骨肉腫患者由来組織同所移植モデルに対するマルチキナーゼ阻害薬の有効性：RGF のみが 2 つの骨肉腫モデルの腫瘍を退縮させた (RGF-コントロール [患者 1・2, p < 0.001], RGF-CZT [患

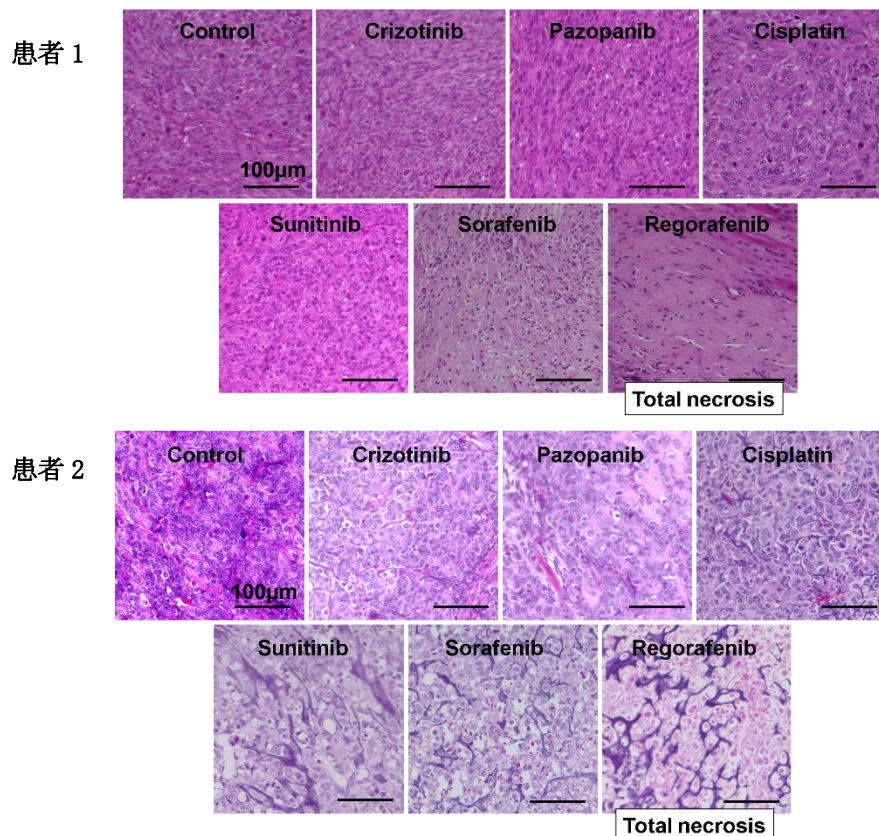
者 1,  $p < 0.001$ , 患者 2,  $p = 0.02$ ], RGF-PAZ [患者 1,  $p = 0.001$ , 患者 2,  $p = 0.01$ ], RGF-CDDP [患者 1,  $p = 0.04$ ]. 患者 1 では, SFN ( $p < 0.001$ ) および SUN ( $p = 0.003$ ) はコントロールと比較して腫瘍の成長を有意に抑制したが, 患者 2 では抑制されなかった (図 1).

図 1.



(2) 骨肉腫モデルの組織像: 2つのモデルにおいて, コントロール群の腫瘍は, 多くの核分裂と類骨形成を伴う細胞密度の高い viable な腫瘍細胞で構成されていた. 2つのモデルにおいて, CZT, PAZ, CDDP 群, または患者 1 の SUN 群では, コントロールと比較して viable な腫瘍細胞の密度が低かった. 患者 2 の SUN 群と両モデルの SFN 群の腫瘍では, 石灰化や間質組織の線維化を伴う少数の viable な腫瘍細胞で構成されていた. RGF を投与した腫瘍では, PDOX の両モデルにおいて, 石灰化や線維化を伴う完全な壊死が見られた (図 2).

図 2.



(3) マルチキナーゼ阻害薬によるマウス体重変化: どのグループにおいても, マウスの死亡は見られなかった. コントロール ( $p = 0.04$ ) および PAZ ( $p = 0.008$ ) では, マウス体重の有意な増加が見られた. 他の群では, 有意な体重変化は認められなかった.

(4) 考察：本研究では、スクリーニングした5種類のマルチキナーゼ阻害薬のうち、RGFのみが、標準治療のCDDPや他のマルチキナーゼ阻害薬に抵抗した2種類の薬剤耐性骨肉腫モデルにおいて、腫瘍退縮と完全壊死を引き起こした。マルチキナーゼ阻害薬は、fibroblast growth factor receptor (FGFR), vascular endothelial growth factor receptor (VEGFR), stem cell factor (c-KIT) などの複数の過活性化した受容体キナーゼを阻害することにより、多くの種類の癌の進行を抑制する。これらの受容体キナーゼの異常は肉腫でも報告されている。PAZは進行した軟部肉腫に使用されているが、効果は限定的である。臨床における骨肉腫の治療では、多くの受容体キナーゼの異常があるにもかかわらず、現在マルチキナーゼ阻害薬は使用できない。おそらく、この腫瘍の希少性が、臨床および前臨床のエビデンスの蓄積を困難にするためであると考えられる。本研究では、骨肉腫患者由来組織同所移植モデルを用いて複数のマルチキナーゼ阻害薬を試験することで、RGFの高い有効性を見いだした。RGFは経口の低分子マルチキナーゼ阻害薬で、血管新生(VEGFR, angiopoietin-1, -2), 間質(platelet-derived growth factor receptor  $\beta$  [PDGFR $\beta$ ], FGFR), 受容体チロシンキナーゼ(c-KIT, RAF, RET)などを標的とする。RGFは当初、転移性大腸癌の治療薬として承認され、その後、肝細胞癌や、GISTの治療薬として承認されたが、肉腫に対しては承認されていない。今回、2種類の骨肉腫患者由来組織同所移植モデルにおいて、RGFによる腫瘍の退縮と完全壊死が観察され、骨肉腫に対するRGFの有用性を示唆することができた。

<引用文献>

Higuchi T, Igarashi K, Yamamoto N, Hayashi K, Kimura H, Miwa S, Bouvet M, Tsuchiya H, Hoffman RM. Multikinase-Inhibitor Screening in Drug-resistant Osteosarcoma Patient-derived Orthotopic Xenograft Mouse Models Identifies the Clinical Potential of Regorafenib. *Cancer Genomics Proteomics*. 2021;18(5):637-643. doi: 10.21873/cgp.20286.

## 5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計3件（うち査読付論文 3件/うち国際共著 3件/うちオープンアクセス 3件）

1. 著者名 Higuchi T, Igarashi K, Yamamoto N, Hayashi K, Kimura H, Miwa S, Bouvet M, Tsuchiya H, Hoffman RM	4. 巻 18
2. 論文標題 Multikinase-Inhibitor Screening in Drug-resistant Osteosarcoma Patient-derived Orthotopic Xenograft Mouse Models Identifies the Clinical Potential of Regorafenib	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Cancer Genomics Proteomics	6. 最初と最後の頁 637-643
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.21873/cgp.20286	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 該当する

1. 著者名 Higuchi T, Igarashi K, Yamamoto N, Hayashi K, Kimura H, Miwa S, Bouvet M, Tsuchiya H, Hoffman RM	4. 巻 12
2. 論文標題 Review: Precise sarcoma patient-derived orthotopic xenograft (PDOX) mouse models enable identification of novel effective combination therapies with the cyclin-dependent kinase inhibitor palbociclib: A strategy for clinical application	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Frontiers in Oncology	6. 最初と最後の頁 957844
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.3389/fonc.2022.957844. eCollection 2022.	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 該当する

1. 著者名 Higuchi T, Igarashi K, Yamamoto N, Hayashi K, Kimura H, Miwa S, Bouvet M, Tsuchiya H, Hoffman RM	4. 巻 41
2. 論文標題 Osteosarcoma Patient-derived Orthotopic Xenograft (PDOX) Models Used to Identify Novel and Effective Therapeutics: A Review	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Anticancer research	6. 最初と最後の頁 5865-5871
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.21873/anticanres.15406.	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 該当する

〔学会発表〕 計4件（うち招待講演 2件/うち国際学会 1件）

1. 発表者名 樋口貴史, 山本憲男, 林克洋, 武内章彦, 三輪真嗣, 五十嵐健太郎, Robert, M.Hoffman, 土屋弘行
2. 発表標題 マルチキナーゼ阻害薬による骨肉腫治療の可能性：患者由来組織同所移植モデルを用いた解析
3. 学会等名 第37回日本整形外科学会基礎学術集会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 Higuchi T, Yamamoto N, Hayashi K, Takeuchi A, Miwa S, Igarashi K, Taniguchi Y, Morinaga S, Asano Y, Hoffman RM, Tsuchiya H
2. 発表標題 Efficacy of multi-kinase inhibitors in osteosarcoma treatment: A patient-derived orthotopic xenograft study
3. 学会等名 21st International Society Of Limb Salvage (ISOLS) General Meeting (国際学会)
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 樋口貴史
2. 発表標題 肉腫の転移浸潤メカニズムの解明と新規治療の開発
3. 学会等名 令和3年度(2021)金沢大学十全医学会学術集会(招待講演)
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 樋口貴史
2. 発表標題 患者由来組織同所移植モデル (patient-derived orthotopic xenograft: PDOX)を用いた解析
3. 学会等名 第14回金沢骨軟部腫瘍セミナー(招待講演)
4. 発表年 2021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
---------	---------