

科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成25年 5月 2日現在

機関番号：17102

研究種目：基盤研究（B）

研究期間：2009～2012

課題番号：21390107

研究課題名（和文）悪性軟部腫瘍におけるシグナル伝達分子異常の解析と分子標的治療の可能性の研究

研究課題名（英文）Analysis of the alteration of signal pathway in soft tissue sarcoma

研究代表者

小田 義直 (ODA YOSHINA O)

九州大学・大学院医学研究院・形態機能病理・教授

研究者番号：70291515

研究成果の概要（和文）：非小円形細胞肉腫である平滑筋肉腫、滑膜肉腫、悪性末梢神経鞘腫瘍、粘液線維肉腫、孤立性線維性腫瘍、隆起性皮膚線維肉腫において Akt-mTOR pathway が活性化しており、この pathway の活性化は各腫瘍の病理組織学的悪性度および予後不良と相関していることを明らかにした。以上より Akt-mTOR pathway は非円形細胞肉腫全般において分子標的となりうることを示された。

研究成果の概要（英文）：We demonstrated the activation of Akt-mTOR pathway in leiomyosarcoma, synovial sarcoma, malignant peripheral nerve sheath tumor, myxofibrosarcoma, solitary fibrous tumor and dermatofibrosarcoma protuberans. Activation of this pathway was correlated with histopathological malignancy and poor prognosis in these tumors. Therefore, Akt-mTOR pathway may be the candidate of molecular target in these non-small round cell sarcomas.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2009年度	6,100,000	1,830,000	7,930,000
2010年度	2,800,000	840,000	3,640,000
2011年度	2,100,000	630,000	2,730,000
2012年度	2,100,000	630,000	2,730,000
年度			
総計	13,100,000	3,930,000	17,030,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：基礎医学・人体病理学

キーワード：骨・関節・筋肉・皮膚・感覚器、悪性軟部腫瘍、Akt-mTOR pathway

1. 研究開始当初の背景

軟部悪性腫瘍はまれな腫瘍であるが、その中でも悪性小円形細胞の形態を有する腫瘍

（Ewing 肉腫、横紋筋肉腫）ではキメラ遺伝子などの分子生物学的な病態の解明が進み、化学療法などを組み合わせた集学的治療で

好成績をあげている。しかし、平滑筋肉腫、悪性末梢神経鞘腫、線維肉腫、隆起性皮膚線維肉腫、悪性線維性組織球腫、脂肪肉腫、滑膜肉腫、類上皮肉腫などの非小円形細胞肉腫においては、発生機序の解明や有効な治療法の確立は未だ進んでおらず、外科的切除が行われているものの一旦再発・転移を来した場合は有効な薬物療法がなく依然予後不良である。

近年、細胞内シグナル伝達に関する研究が進むとともに悪性腫瘍でそれらの伝達経路 (pathway) が異常に活性化していることが明らかになってきており、新たな分子標的治療の開発のために各々の腫瘍で活性化している pathway を検索するという戦略が広く用いられている。乳癌におけるトラスツズマブ (Pegram MD, et al. J Clin Oncol. 1998) や消化管間質腫瘍におけるイマチニブ (Dagher R, et al. Clin Cancer Res. 2002) などは、腫瘍特異的に活性化している pathway をブロックすることで効果が認められた薬剤の代表的な例である。しかし今回の研究対象とする非小円形細胞肉腫においては、病態に直結するような pathway は未だ解明されておらず、分子標的の発見のための手がかりは少ないのが現状であった。

2. 研究の目的

非小円形細胞肉腫において、悪性化と密接に関係しているとされる主な3つの pathway (PI3K-AKT-mTOR pathway, MAPK pathway, JAK-STAT3 pathway) についてその活性化を網羅的に検索し、さらに signal pathway の上流、下流に位置する因子の中で腫瘍特異的に過剰発現しているものを同定する。そして cell line を用いて薬剤による block を行い細胞の増殖・浸潤・転移能の変化を観察することで病態への関与の裏づけを行う。

3. 研究の方法

非小円形細胞肉腫である平滑筋肉腫、滑膜肉腫、悪性末梢神経鞘腫瘍、粘液線維肉腫、孤立性線維性腫瘍、隆起性皮膚線維肉腫における Akt-mTOR pathway の活性化を重点的に免疫組織化学染色と western blot 法により解析し予後を含む臨床病理学的事項と比較した。

4. 研究成果

1) 平滑筋肉腫における Akt/mTOR 経路の活性化と臨床病理学的背景の検討

129 例の免疫組織化学染色では、リン酸化型の Akt, mTOR, S6 および 4E-BP1 の陽性率はそれぞれ 7~8 割であった。各々のタンパクにおける陽性例は有意に他のタンパクにも陽性であり、また核分裂像が多い傾向にあった。これらのリン酸化型タンパクの陽性はいずれも予後不良因子であった (図 1)。Western blot 法では、非腫瘍組織と比較して腫瘍組織で有意に Akt および mTOR のリン酸化が認められた。一方 PTEN タンパク減弱例はわずか 19.7% であり、Akt 以下のリン酸化タンパクの陽性とは有意な相関はみられなかった。PIK3CA および Akt1 の突然変異は検索しえなかった。

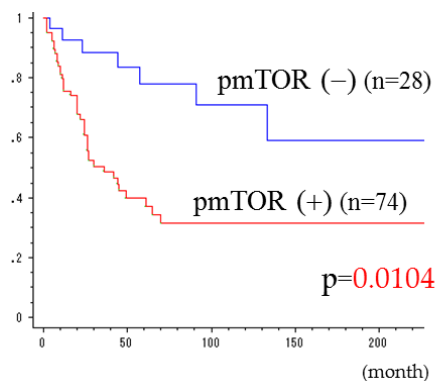


図 1 : pmTOR 発現例は予後不良である

2) 平滑筋肉腫における STAT3 の活性化とその予後的意義

Western blot 法では、非腫瘍組織と比較して腫瘍組織で STAT3 のリン酸化が抑制されていた。SOCS3 はほぼ全ての腫瘍組織で発現していたが、非腫瘍組織では発現を認めなかった(図 2)。免疫組織化学染色では、リン酸化型の STAT3 の陽性率は 38%であり、予後良好と相関していた。SOCS3 の陽性率は 52%であり、SOCS3 の陽性はリン酸化 STAT3 陰性と相関していた。

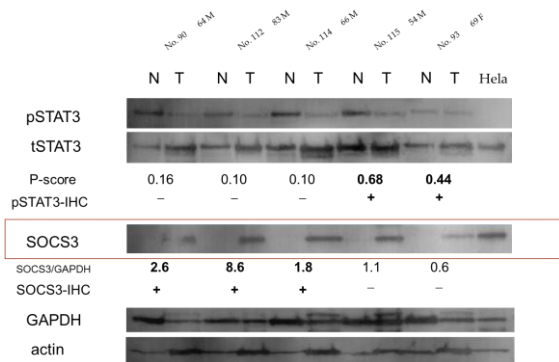


図 2: SOCS3 は腫瘍組織で高発現し、免疫組織化学染色の結果と相関した

3) 滑膜肉腫における Akt/mTOR 経路の活性化と臨床病理学的背景の検討

112 例の免疫組織化学染色における Akt, mTOR, 4E-BP1, S6 の各リン酸化タンパクの陽性率はそれぞれ 76.5%、67.6%、60.0%、41.9%であった。それぞれの陽性は互いに相関していた。pmTOR および p4E-BP1 陽性例は核分裂像が多い傾向にあり、p4E-BP1 陽性例は壊死範囲が広い傾向にあった。pmTOR および p4E-BP1 陽性は予後不良因子でもあった。Western blotting では腫瘍組織において正常組織よりも強い Akt, mTOR, S6 のリン酸化を認めた。

4) 悪性末梢神経鞘腫瘍における Akt/mTOR 系

活性化に関する研究成果

135 例の免疫染色の陽性率はそれぞれリン酸化 AKT 58.2%、リン酸化 mTOR 47.3%、リン酸化 S6RP 53.8%、リン酸化 p70S6K 57.1%、リン酸化 4E-BP1 62.6%、リン酸化 MEK1/2 93.4%、リン酸化 ERK1/2 81.3%であった。凍結サンプルが入手可能な症例はウエスタンブロッティングを行い、対応する症例の免疫染色結果にはほぼ一致する結果を得た。リン酸化 4E-BP1 陽性例およびリン酸化 ERK1/2 陽性例では、組織学的悪性度が高かった。予後との関連を単変量解析で解析すると、リン酸化 AKT、リン酸化 mTOR、リン酸化 S6RP 陽性例は予後不良であった(図 3A)。また、リン酸化 mTOR およびリン酸化 S6RP は多変量解析でも有意に予後不良と相関し、独立した予後因子であることが明らかとなった。以上の結果から、MPNST では MAPK 系はほぼ全ての症例で活性化している一方、Akt/mTOR 系は高悪性度で予後不良な症例でのみ活性化しており、Akt/mTOR 系の活性化が MPNST の高悪性化に大きな影響を及ぼしていることが示唆された。次に代表的な Akt/mTOR 系阻害薬である everolimus を用いて、MPNST 細胞株 6 株に対する抗腫瘍効果を検討した。まず everolimus による細胞増殖抑制効果を調べたところ、すべての細胞株で濃度依存性に細胞増殖が抑制された。Everolimus による Akt/mTOR ならびに MAPK 系シグナル伝達系への影響をウエスタンブロッティングと immunocytochemistry で確認したところ、everolimus による S6RP および p70S6K のリン酸化抑制が観察された。Everolimus 投与による Akt, mTOR, MEK1/2, ERK1/2 の活性化亢進はみられなかった(図 3B)。浸潤能の変化を Matrigel invasion assay で確認したところ、1 株を除いた 5 株で everolimus 投与による浸潤能の低下が観

察された。遊走能の変化を wound healing assay で確認したところ、everolimus 投与によりすべての細胞株で遊走能が低下した(図 3C)。以上の結果より、everolimus は MPNST 細胞株の増殖能、浸潤能、遊走能を低下させることが明らかとなった。

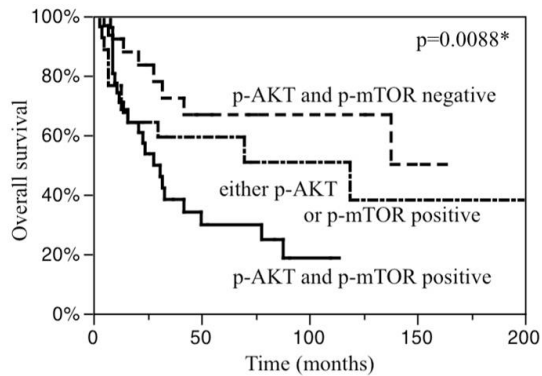


図 3A: MPNST における Akt-mTOR pathway の活性化と予後の関連。

リン酸化 AKT、リン酸化 mTOR、リン酸化 S6RP 陽性例は予後不良であった

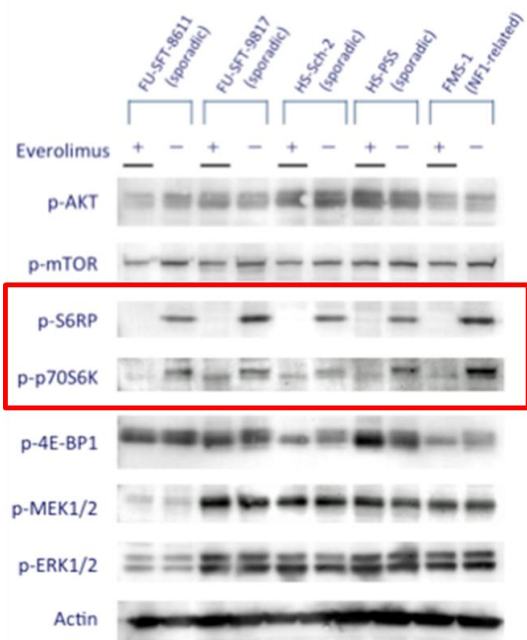


図 3B: MPNST 細胞株において everolimus 投与により S6RP および p70S6K 発現抑制を引き起こされるが、AKT、mTOR、MEK1/2、ERK1/2

の活性化亢進はみられない

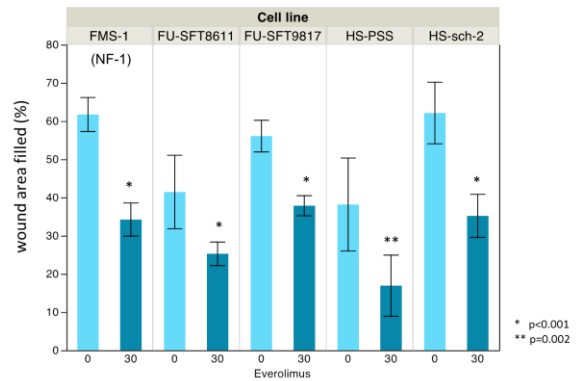


図 3C: MPNST 細胞株 6 株全てにおいて everolimus 投与により有意な、遊走能の抑制が観察された

5) 粘液線維肉腫における Akt-mTOR pathway の解析

MFS の原発例 75 例では Akt, mTOR, S6RP, 4EBP1 のリン酸化は 65%、45%、41%、66%の症例に認め、再発例についても 66%、71%、47%、38%に見られ、原発例、再発例ともに高い陽性率を示し、Akt-mTOR pathway の活性化を確認できた。さらに凍結標本を用いて Western blot を行い、リン酸化蛋白発現を確認した。Akt と mTOR については、リン酸化発現例について比較検討したところ、有意な ($p=0.012$) 相関が得られた。Pathway 全体が発現している症例は 12 例(16%)であった。悪性度については FNCLCC で high grade な腫瘍と p-mTOR の発現に相関を認めた ($p=0.011$)。MAP kinase (MEK) pathway においては、MEK のリン酸化は 64%の症例で見られ、S6RP との有意な相関 ($P=0.032$) を認めた。これによって、Akt-mTOR 系の下流である S6RP の発現は MAP kinase との関連も示唆された。原発例(凍結材料)で、Akt (AKT1) とその上流にある PIK3(PIK3CA) の mutation を確認したが、いずれも mutation は認めなかった。

6) 孤立性線維性腫瘍 (SFT) における Akt/mTOR 系活性化とチロシンキナーゼ受容体発現に関する研究

SFT66例の50-80%においてAkt, mTOR, 4E-BP1, S6RPのリン酸化が見られた。各タンパクのリン酸化は互いに有意な相関を有し、Akt-mTOR系が活性化されていることが示唆された。PDGFR α , PDGFR β , c-met, IGF-1R β のリン酸化はそれぞれ39, 52, 37.8, 16.6%の症例に見られ、PDGFR α , PDGFR β , IGF-1R β のリン酸化とAktのリン酸化に有意な相関が見られた。PDGF-BとPDGFR β , HGF α とc-met, IGF-1およびIGF-2とIGF-1R α の共発現をそれぞれp-PDGFR β , p-c-met, p-IGF-1R β の陽性と比較し、有意な相関を得た。Akt-mTOR系およびRTKの活性化は再発・転移との関連は明らかでなかったが、mTORのリン酸化は組織学的悪性所見と相関があった。免疫組織化学の結果はWestern blotで得られた結果と概ね一致した。

7) 隆起性皮膚線維肉腫における Akt/mTOR 系活性化と PDGFR 発現に関する研究

DFSP54例、DFSPとFSの混在症例(以下DFSP+FS)24例、表在性FS4例の免疫染色結果を評価したところ、まずDFSP54例において、リン酸化AKT44.4%、リン酸化mTOR31.5%、リン酸化4E-BP157.4%、リン酸化S6RP44.4%、リン酸化PDGFRB50%の陽性率であった。またDFSP+FS24例のDFSP領域においては、リン酸化AKT45.8%、リン酸化mTOR33.3%、リン酸化4E-BP150%、リン酸化S6RP33.3%、リン酸化PDGFRB58.3%の陽性率でありDFSP単独と同様の結果であった。また、DFSP+FS24例のFS領域におい

ては、リン酸化AKT70.8%、リン酸化mTOR54.2%、リン酸化4E-BP175%、リン酸化S6RP41.7%、リン酸化PDGFRB66.7%の陽性率であり、表在性FS4例はいずれの染色結果も100%陽性であり、DFSP単独例より陽性率が高かった。また、腫瘍組織凍結標本を用いたウエスタンブロットの結果は免疫染色の結果と概ね一致した。免疫染色結果の統計解析を行い、DFSP例ではAKT-mTOR系の各因子(AKT, mTOR, S6RP, 4E-BP1), PDGFRB間には、正の相関を認めた。DFSPにおいてはAKT-mTOR系は3から6割弱の症例で、PDGFRBは5割程度の症例で活性化していることが示唆された。DFSPとDFSPに発生したFSにはAKT-mTOR系とPDGFRBの活性化に差があることが明らかとなった。

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文] (計 70 件)

1. Endo M, Yamamoto H, Setsu N, Kohashi K, Takahashi Y, Ishii T, Hakozaki M, Aoki M, Iwasaki H, Dobashi Y, Nishiyama K, Iida K, Matsumoto Y, Iwamoto Y, Oda Y:

Clinicopathologic and prognostic significance of AKT/mTOR and MAPK pathways and antitumor effect of mTOR inhibitor in NF1-related and sporadic malignant peripheral nerve sheath tumors. Clin Cancer Res 査読有 Jan 15;19(2):450-461, 2013 (Corresponding)
doi: 10.1158/1078-0432.CCR-12-1067.

2. Setsu N, Yamamoto H, Kohashi K, Endo M, Matsuda S, Yokoyama R, Nishiyama K, Iwamoto Y, Dobashi Y, Oda Y: The Akt/mammalian target of rapamycin

pathway is activated and associated with adverse prognosis in soft tissue leiomyosarcomas. Cancer 査読有 118(6) Mar 15:1637-48, 2012 (Corresponding)
doi: 10.1002/cncr.26448.

[学会発表] (計 73 件)

1. 小田義直:

軟部腫瘍の分子基盤と診断・治療における統括病理学

第 101 回日本病理学会総会 2012 年 4 月 27 日、東京、シンポジスト

2. Endo M, Setsu N, Takahashi Y, Ishii T, Kohashi K, Yamamoto H, Tamiya S, Matsuda S, Iwamoto Y, Hakozaki M, Iwasaki H, Oda Y: Clinicopathological and prognostic significance of Akt-mTOR and MAPK pathways and antitumor effect of mTOR Inhibitor in malignant peripheral nerve sheath tumor. 101st USCAP Annual Meeting, March 17-23, 2012 Vancouver, BC, Canada

[図書] (計 5 件)

1. 小田義直:

各論第 16 章 骨・関節・軟部組織
青笹克之編. 解明 病理学 第二版
医歯薬出版, 2013 年 pp743-778

2. Oda Y, Dal Cin P, Laskin WB:

Epithelioid sarcoma. Fletcher CDM, Bridge JA, Hogendoorn PCW, Mertens F Eds.
WHO Classification of Tumours of Soft Tissue and Bone. IARC, Lyon 2013, pp216-218.

[その他]

ホームページ等

<http://www.surgpath.med.kyushu-u.ac.jp/ap/>

<http://hyoka.ofc.kyushu-u.ac.jp/search/details/K000918/index.html>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

小田 義直 (ODA YOSHINAO)

九州大学大学院医学研究院・教授

研究者番号: 70291515

(2) 研究分担者

(2009-2011)

田宮 貞史 (TAMIYA SADAFUMI)

九州大学大学院医学研究院・准教授

研究者番号: 60284486

(2012)

孝橋 賢一 (KOHASHI KENICHI)

九州大学大学院医学研究院・助教

研究者番号: 10529879

(3) 連携研究者

なし