

令和 6 年 5 月 11 日現在

機関番号：14501

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2021～2023

課題番号：21K08901

研究課題名(和文) iPS技術を用いた縦隔原発肉腫に対する個別化精密医療の確立

研究課題名(英文) Establishment of phenotype based precision medicine for mediastinal primary sarcoma using iPS technology

研究代表者

田中 雄悟 (Tanaka, Yugo)

神戸大学・医学部附属病院・講師

研究者番号：20403256

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,200,000円

研究成果の概要(和文)：2008年から2021年に切除された縦隔原発肉腫20例について予後因子、治療効果因子を探索するために、切除標本を用い検討を行った。組織型については肺動脈内膜肉腫；12例(うち2例は同一症例での再発時の検体を使用)、脂肪肉腫；5例、平滑筋肉腫；1例、骨外性骨肉腫；1例、Sarcoma NOS；1例であった。Next Generation Sequencer (NGS)にてRNA-Seq解析、Pathway解析を行った。肺動脈内膜肉腫について、予後不良群(術後2年未満の生存)でH2BC12およびリボソーム関連遺伝子が有意に高発現しており病勢の増悪に寄与している可能性が示唆された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

縦隔原発肉腫は疾患自体の悪性度及び治療困難な発生部位のため予後不良な腫瘍として知られている。非常に稀な疾患であるため外科治療以外の治療効果については明らかにされておらず、切除不能および再発時の治療については未だ手探りで行われている状況である。また、本疾患に対し分子生物学的なアプローチについて検討を行った報告はこれまでに認めない。そのため、今回、我々が行った研究による結果は、本疾患を扱う研究者にとって、新規性のある情報であり、今後の病態解明への足掛かりになるとともに、治療薬開発に貢献する可能性がある点からも学術的、社会的意義は高いと考える。

研究成果の概要(英文)：We conducted an investigation using resected specimens to explore prognostic factors and treatment efficacy factors for 20 cases of primary mediastinal sarcoma that were resected from 2008 to 2021. Regarding the histological types, our cases included pulmonary artery intimal sarcoma: 12 cases, liposarcoma: 5 cases, leiomyosarcoma: 1 case, extraosseous osteosarcoma: 1 case, Sarcoma NOS: 1 case. RNA-Seq analysis and pathway analysis were performed using Next Generation Sequencer (NGS). Regarding pulmonary artery intimal sarcoma, H2BC12 and ribosome-related genes were significantly highly expressed in the poor prognosis group (survival less than 2 years after surgery), suggesting that those genes might be associated with poor prognosis.

研究分野：呼吸器外科学

キーワード：縦隔原発肉腫 iPS 個別化精密医療 RNA-Seq解析 Exome解析

1. 研究開始当初の背景

縦隔原発肉腫は 50 代前後の比較的若年層に好発する。その発生頻度は全軟部腫瘍の 2%以下と非常に稀な疾患であるにも関わらず、組織型(亜型)も多種に亘るため、組織型別の症例はさらに稀である。そのため、治療および予後についてまとまった報告はこれまでにほとんど認めない。治療については化学療法、放射線療法への抵抗性を示すことが多く、外科的切除が治療の第一選択とされている。また、予後については非手術症例(非治療症例は除く)の 5 年生存率は 10%以下、手術症例では 20%前後と手術症例の方が良好ではあるが、十分な予後が得られているとは言い難い状況である。手術については、完全切除が望ましく、完全切除症例の予後(5 年生存率 40~50%)は非完全切除症例(5 年生存率 10~20%)と比較し良好であることが分かっている。しかし、腫瘍が心臓や大血管内に発生するもの、発見時から腫瘍径が大きく周囲臓器を強く圧排しているもの、周囲臓器に広範囲に浸潤しているものが多く、侵襲の高い手術が行われているにも関わらず完全切除率が低い(50%以下)。また、再発については再発部位及び治療方針に関しての報告はこれまでに認めない。

上記のように縦隔原発肉腫は比較的若年層に好発する予後不良な疾患である。しかし、希少疾患のためその病態及び治療法については明らかにされていないことが殆どである。そのため今後の予後を改善していくためには、さらなる病態の把握とともに個別化精密医療、“phenotype based precision medicine”の確立が必要と考える。

2. 研究の目的

縦隔原発肉腫の外科切除検体を使用し Next Generation Sequencer (NGS)にて RNA-Seq 解析及び Exome 解析を行うことにより縦隔肉腫で特異的な遺伝子発現状況を解析し抽出する。抽出された遺伝子について Tissue array を用いタンパク発現を確認し予後不良因子を同定する。

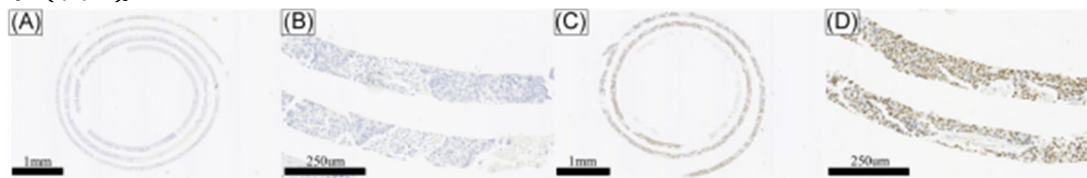
軟部肉腫オルガノイドを鶏卵漿尿膜培養に供し、病理組織学的観察を行うことにより、漿尿膜上での浸潤のメカニズム、癌宿主相互作用のダイナミクスを明らかにする。軟部肉腫細胞の動きをリアルタイムで評価する。

患者検体から採取された腫瘍組織で鶏卵漿尿膜培養を行い抗癌薬の負荷による培養検体の反応を細胞レベルおよび分子レベルで精密に捉える。患者生体における癌表現型のシミュレーション法として利用し個別化精密医療、“phenotype based precision medicine”の手法を確立する。

3. 研究の方法

【I】Next Generation Sequencer (NGS)を用いた RNA-Seq 解析及び Exome 解析

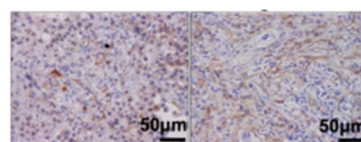
これまでに当院で切除された縦隔原発肉腫 18 例を対象とする。組織型は肺動脈内膜肉腫; 10 例、脂肪肉腫; 5 例、平滑筋肉腫; 1 例、骨外性骨肉腫; 1 例、Sarcoma NOS; 1 例であり、同腫瘍のパラフィンブロックより DNA 及び RNA を抽出し、Next Generation Sequencer (NGS)にて RNA-Seq 解析及び Exome 解析を行う。癌関連遺伝子を始めとした約 3 万種類の遺伝子について正常組織をコントロールとし肉腫組織で特異的に高発現している遺伝子を確認する。発現した遺伝子について Pathway 解析も追加で行う。上記で予後不良因子の可能性が考慮される遺伝子については引き続き Tissue array を用いタンパク発現の有無についての評価も行う。Tissue array に関しては、組織の不均一性をより適切に反映するために Spiral array を作成し免疫染色を行う(図 1)。



(図 1) Spiral array を用いた肺癌免疫染色 (Tanaka et al. J Surg Oncol. 2020;122(2):243-253.)

【II】肉腫オルガノイド作成と漿尿膜培養による肉腫オルガノイドの微小環境の評価

iPS 細胞を作製する上で必要な体細胞初期化因子(山中因子: OCT3/4、SOX2、KLF4)を軟部肉腫細胞株に導入し、人工軟部肉腫幹細胞を作製する。引き続き人工軟部肉腫幹細胞を間葉系幹細胞(MSC)及びヒト臍帯静脈内皮細胞(HUVEC)と 3 次元培養し、軟部肉腫オルガノイドを作製する(図 2)。軟部



(図 2)人工肺腺癌幹細胞と同葉系幹細胞の混合培養により得られた癌オルガノイド(左)と肺腺癌臨床検体(右)の組織像。(極めて類似した構造を形成された。)(Gen Thorac Cardiovasc Surg 2016, 64: 517-523, Ogawa H, et al.)

肉腫オルガノイドの in vivo で増殖・浸潤能と癌-宿主相互作用すなわち phenotype の評価を行うべく鶏卵漿尿膜培養を行い、単層培養、マウス皮下培養したものと比較を行う。ミクロレベルでは実体顕微鏡下に腫瘍の増大速度や浸潤、血管新生などのダイナミクスをリアルタイムに捕捉し、組織切片を作成し HE 染色や免疫組織化学染色を行うことで病理組織学的に腫瘍増殖能、浸潤能、血管新生能の評価を行うとともに蛍光標識によりオルガノイドの浸潤を蛍光顕微鏡下にも確認する（図 3-5）。

【III】縦隔原発肉腫治療における Phenotype based precision medicine の確立

患者由来の腫瘍組織を鶏卵漿尿膜上で培養し、【II】と同様の解析を行う。また、【I】で得られた情報を含め血管新生や上皮・間葉移行など癌-宿主相互作用を中心としたがん微小環境のダイナミクス、各種の薬剤に対する反応、耐性化に関する詳細な遺伝子レベルでのデータバンクを作成する。そこで得られた特定因子を発現した細胞を sorting し、single cell にしたうえで single cell PCR、single cell transcriptome を行うことで新規薬剤の標的因子の詳細を明らかにする。このデータバンクと実際の臨床経過および過去の蓄積されたデータをリンクさせることにより、より個別化された縦隔原発肉腫制御の手法を確立する。これにより、個々の症例の浸潤能や薬剤感受性をライブ・イメージングで確認したうえで、その結果に対応した最適な薬剤選択を行う我々独自の個別化精密医療、phenotype based precision medicine の手法を確立することを最終目標とする。

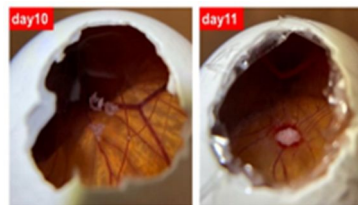


図3 移植したオルガノイドペレット（左）と、24時間後に形成されたオルガノイド組織。

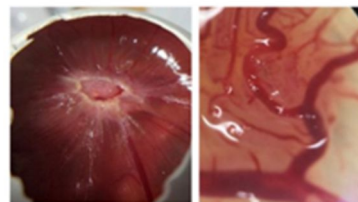


図4 移植後5日でオルガノイド組織は漿尿膜内に増殖・浸潤し（左）、その周辺には鶏卵由来の血管新生がみられる（右）。

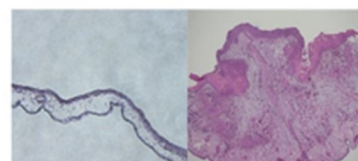


図5 正常の漿尿膜（左）とオルガノイド生育（右）の断面、組織像（上が外側側）。

4. 研究成果

Next Generation Sequencer (NGS)を用いた RNA-Seq 解析及び Exome 解析について

2021 年度

当院で 2008 年から 2021 年までに切除された縦隔原発肉腫 20 例についての予後因子、治療効果因子を探索するために、切除標本を用い検討を行うこととした。組織型については肺動脈内膜肉腫；12 例（うち 2 例は同一症例での再発時の検体を使用）、脂肪肉腫；5 例、平滑筋肉腫；1 例、骨外性骨肉腫；1 例、Sarcoma NOS；1 例であった。まず、腫瘍の PD-L1 発現の有無を確認するために未染組織ブロックより薄切標本を作製し、腫瘍細胞の PDL-1 タンパクの発現の有無を調べた。結果については、すべての組織検体において発現は低発現（5%以下）であった。

引き続き、同腫瘍のパラフィンブロックより DNA 及び RNA の抽出を行った。20 検体中の 2 検体で組織量が少なく抽出が少ない可能性が示唆された。

2022 年度

昨年度、抽出した検体を用い、引き続き Next Generation Sequencer (NGS)にて RNA-Seq 解析を行った。ライブラリーのデータを用い癌関連遺伝子を始めた約 3 万種類の遺伝子について縦隔肉腫組織内で特異的に高発現している遺伝子について確認を行った。

2023 年度

縦隔肉腫組織内で特異的に高発現している遺伝子については、明らかにできなかったため、肺動脈内膜肉腫（最も観察期間が長く、症例数が多い）について、予後良好群（生存期間 24 ヶ月以上）と予後不良群（生存期間 24 ヶ月未満）に分類し、その発現を比較した。

多重検定を行い、予後不良群に有意に高発現を認めた遺伝子は 18 遺伝子であった。（表 1、図 6）有意な差があった。

その中で H2BC12 は glioma の予後因子として報告されており、本研究でも病勢の悪化に関与している可能性が高いと考え、免疫染色にてタンパクレベルでの発現を確認の上で上記結果を論文として報告予定である。また、パスウェイ解析では、リボソーム関連遺伝子が病勢の増悪に寄与している可能性があり、今回の病変との関連性については、さらに評価を行う予定である。

肉腫オルガノイド作成と漿尿膜培養による肉腫オルガノイドの微小環境の評価

縦隔原発肉腫治療における Phenotype based precision medicine の確立

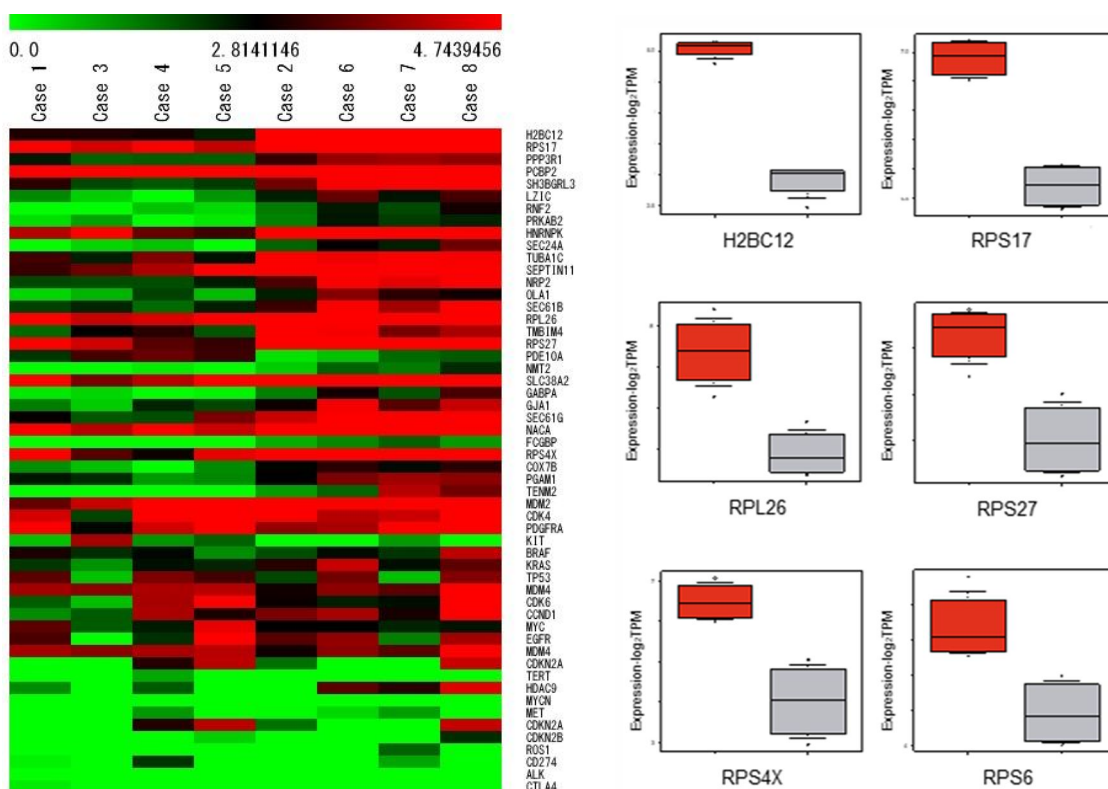
2021 年度～2023 年度

肺動脈内膜肉腫について 1 例の外科治療症例があったため、切除直後の腫瘍組織を採取し、人工軟部肉腫幹細胞の作製を試みた。しかし、腫瘍細胞周囲の間質細胞の量が上皮系悪性腫瘍と比較し著明に多く、オルガノイド作成には至らなかった。その後、新たな縦隔肉腫症例がないため、作成には至らなかった。稀な症例であるが、計画時の予定よりもかなり少ない症例であったため、今後も同様の症例の切除検体を用い肉腫オルガノイドの作成を行ったうえで、の研究で得られた情報との相関を確認する予定である。

表 1 肺動脈内膜肉腫 予後不良群 発現遺伝子

Rank	Gene name	Relative gene expression level, Mean (± SD)		P-value	
		All patients (n=8)	Good prognosis group (n=4)	Poor prognosis group (n=4)	
1	H2BC12	3.961 ± 1.093	2.886 ± 0.249	5.035 ± 0.143	0.002395
2	RPS17	5.801 ± 1.133	4.712 ± 0.332	6.890 ± 0.291	0.002859
3	PCBP2	6.629 ± 1.125	5.579 ± 0.416	7.679 ± 0.394	0.008954
4	HNRNPK	5.024 ± 1.141	4.002 ± 0.576	6.046 ± 0.426	0.027264
5	TUBA1C	4.180 ± 1.270	3.054 ± 0.530	5.306 ± 0.641	0.022995
6	SEPTIN11	5.090 ± 1.203	4.006 ± 0.626	6.174 ± 0.391	0.022995
7	RPL26	6.136 ± 1.409	4.893 ± 0.511	7.380 ± 0.786	0.028143
8	RPS27	5.164 ± 1.294	4.042 ± 0.722	6.287 ± 0.555	0.026071
9	SLC38A2	5.675 ± 1.212	4.629 ± 0.672	6.720 ± 0.547	0.026071
10	NACA	6.281 ± 1.849	4.598 ± 0.311	7.964 ± 1.039	0.027823
11	RPS4X	5.255 ± 1.398	4.027 ± 0.840	6.484 ± 0.430	0.027823
12	GAPDH	6.932 ± 1.396	5.781 ± 0.828	8.083 ± 0.748	0.035373
13	RPS6	6.147 ± 1.487	4.925 ± 0.824	7.368 ± 0.871	0.034488
14	MT-CO3	8.420 ± 1.491	7.200 ± 0.835	9.640 ± 0.878	0.034488
15	RPS24	5.696 ± 1.396	4.539 ± 0.935	6.854 ± 0.587	0.035939
16	RAP1B	5.728 ± 1.608	4.395 ± 0.652	7.061 ± 1.091	0.035939
17	MT-CO1	9.06 ± 1.337	8.002 ± 0.872	10.130 ± 0.744	0.039336
18	MT-ND4L	7.811 ± 1.464	6.646 ± 0.963	8.975 ± 0.807	0.039336

図 6 RNA-seq 解析 (ヒートマップ)



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 第64回日本肺癌学会学術集会
2. 発表標題 肺動脈内膜肉腫に対し肺動脈内膜摘除術及び肺切除術を行った4例の検討
3. 学会等名 田中 雄悟, 光井 卓, 西久保 愛実, 土井 健史, 田根 慎也, 法華 大助, 眞庭 謙昌
4. 発表年 2023年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

研究成果については、現在論文作成中で2024年度内に英文雑誌に投稿予定である。

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	青井 貴之 (Aoi Takashi) (00546997)	神戸大学・科学技術イノベーション研究科・教授 (14501)	
研究 分担者	眞庭 謙昌 (Maniwa Yoshimasa) (50362778)	神戸大学・医学研究科・教授 (14501)	

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