

科学研究費助成事業 研究成果報告書

令和 6 年 6 月 11 日現在

機関番号：14401

研究種目：若手研究

研究期間：2021～2023

課題番号：21K16669

研究課題名（和文）PAX7-FOX01胞巣型横紋筋肉腫の治療法の開発；患者由来癌モデルを使う研究

研究課題名（英文）Development of a treatment for PAX7-FOX01 alveolar rhabdomyosarcoma; a study using a patient-derived cancer model

研究代表者

申 育實（Sin, Yooksil）

大阪大学・感染症総合教育研究拠点・特任研究員（常勤）

研究者番号：70761352

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,500,000円

研究成果の概要（和文）：横紋筋肉腫は軟部肉腫の一つである。胞巣型横紋筋肉腫（aRMS）高リスク群においては標準治療は未確立である。治療法開発にあたり患者由来細胞株は有用であるが、aRMSを含む希少がんにおいては細胞を得難い。また患者由来細胞株より得られるデータは必ずしも臨床腫瘍の性格を反映していないという指摘がある。研究代表者は手術検体を用いて PAX7-FOX01融合遺伝子を有するaRMS細胞株の樹立に成功した。本研究はこの患者由来細胞株を用いて治療に有効な抗がん剤の同定を行うとともに、*in vitro*で患者由来細胞株のがん関連タンパク質発現プロファイルを臨床腫瘍のものに近似させることが可能な培養条件を特定した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

薬剤スクリーニングの結果、PAX7-FOX01融合遺伝子を有する胞巣型横紋筋肉腫の患者由来細胞株の増殖を抑制する効果のある抗がん剤をいくつか特定できた。しかし従来の培養法で得られたデータは臨床腫瘍を反映しているとは言い難い。そこで本研究では、臨床腫瘍の性質をより反映可能な患者由来細胞株の培養条件を特定を目指した試行を行い、実現に至った。本研究で有用性を見出した手法はあらゆる疾患由来の細胞株に応用可能であることから、本研究成果は希少がんに限らず、疾患研究に必須の培養細胞株全般から得られるデータの信頼性を向上させ得るものであるといえる。

研究成果の概要（英文）：Rhabdomyosarcoma is a soft tissue sarcoma. In the high-risk group of patients with alveolar rhabdomyosarcoma (aRMS), standard treatment has not yet been established. Patient-derived cell lines are useful for therapeutic development, but are difficult to obtain for rare cancers, including aRMS. It has also been pointed out that data obtained from patient-derived cell lines do not necessarily reflect the nature of the clinical tumor. Using surgical specimens, the principal investigator has successfully established an aRMS cell line carrying the PAX7-FOX01 fusion gene. This study used this patient-derived cell line to identify effective anticancer drugs. And the investigator also identified culture conditions that can mimic the expression profile of cancer-related proteins in the patient-derived cell line *in vitro* to that of clinical tumors.

研究分野：分子生物学

キーワード：肉腫 横紋筋肉腫 患者由来細胞株

様式 C-19、F-19-1、Z-19（共通）

1. 研究開始当初の背景

(1) 横紋筋肉腫は未分化型間葉系細胞を発生母体として横紋筋への分化を示す細胞からなる軟部肉腫である。小児の肉腫の中では最も発生頻度が高いのだが、本邦では成人も含めて年間100例程度の発症数であり、希少がんである。低・中間リスク群においては手術、放射線療法、化学療法の集学的治療によって予後は改善されており、今後は長期合併症の少ない治療を目指す必要がある。一方、高リスク群に対する標準治療は確立されておらず、依然として予後不良である。横紋筋肉腫は、異なる臨床病理学的特徴を示す5つのサブタイプからなる。このうち、本研究で対象とする胞巣型横紋筋肉腫（alveolar rhabdomyosarcoma, ARMS）は、組織学的に未分化な小円形細胞の胞巣状構造を示すことが特徴的である。ARMSはその融合遺伝子のタイプから、PAX3-FOXO1あるいはPAX7-FOXO1を有するものに分類される。PAX4/PAX7-FOXO1融合遺伝子は予後因子であり、遠隔転移症例においてPAX3-FOXO1を有するARMSは、PAX7-FOXO1を有するARMSよりも予後不良である。しかしPAX3/PAX7-FOXO1融合遺伝子は横紋筋肉腫のリスク分類（JRS-II臨床試験）にはまだ採用されておらず、リスク分類に導入するほどの有用性があるかどうかについて欧米では臨床試験が行われている。PAX3/PAX7-FOXO1融合遺伝子の臨床的有用性については分子背景の理解に基づいてさらに検討する必要がある。

(2) 患者由来がんモデルは、疾患の分子背景の研究には必須のツールである。PAX3-FOXO1融合遺伝子を有するARMSについては細胞株が数多く報告され公的細胞バンクから入手することができる。一方、PAX7-FOXO1を有するARMSの細胞株はほとんど報告がなく、公的細胞バンクから入手することができない。また、ゼノグラフトやオルガノイドの報告はない。そのため、PAX7-FOXO1融合遺伝子の機能については、ほとんど報告がない。

2. 研究の目的

(1) 研究代表者は、腫瘍組織を用いて、世界で3例目となるPAX7-FOXO1融合遺伝子を有するARMSの患者由来細胞株（PDCs）[1]および世界初の患者由来ゼノグラフト（PDXs）とオルガノイド（PDOs）の樹立に成功した。本研究では申請者の樹立したPDCs、PDXs、PDOsを用いて、①PAX7-FOXO1融合遺伝子を有するARMSの治療に有効な抗がん剤の同定、②PAX7-FOXO1融合遺伝子の病態における役割の解明、そして③プロテオゲノミクスによって治療奏効性予測バイオマーカーの開発、を通してPAX7-FOXO1融合遺伝子を有するARMSの新しい治療法の開発に資する知見を得ることを目的とする。

(2) 患者由来がんモデルは、がん研究ではさまざまな局面で役に立ってきた。患者由来がんモデルがなければできなかった発見は多い。しかし、患者由来がんモデルから得られるデータはかならずしも臨床的な腫瘍の性格を反映していないことも指摘されている。すなわち、昔ながらの方法で患者由来がんモデルを使っていたのでは、成功する確率は低いかもしれないということである。そのため、患者由来がんモデルの可能性を追求し、よりよい方法論の確立に向けた改善案を見出すことも、本研究の目的とする。

3. 研究の方法

(1) 研究代表者は、腫瘍組織を用いてPAX7-FOXO1融合遺伝子を有するARMSの患者由来がんモデルを樹立した。本研究では、この細胞株を用いて、薬剤応答性のデータ、融合遺伝子産物の複合体の解析、そしてゲノムとプロテオームの統合的解析（プロテオゲノミクス解析）という複数の多層的なアプローチによって、PAX7-FOXO1融合遺伝子を有するARMSの治療法の開発に資する知見を得る。

(2) 患者由来細胞株を含む従来の患者由来がんモデルには臨床的な腫瘍の性格を反映しきれていないという課題がある。有用な解析結果を得るためには適切な患者由来がんモデルが必要であるため、一連の解析を通して既存モデルの限界に直面した際には、特に肉腫の微小環境を再現することに重きをおいた新たな患者由来がんモデル開発を行う。これら一連の研究を通して、患者由来がんモデルを用いた研究によって横紋筋肉腫に有効な抗がん剤が本当に開発できるのかを検討し、改善策を構築してゆく。

4. 研究成果

(1) 脱細胞組織と共培養した ARMS 患者由来細胞株の質量分析

PAX7-FOXO1 融合遺伝子を有する ARMS の患者由来細胞株を用いた薬剤応答性のデータは細胞株樹立時に取得した。210 種類の薬剤を用いた感受性試験の結果、横紋筋肉腫の標準的治療として採用されている 3 剤併用治療の繰り返し療法である VAC 療法で使用される Vincristine を含む複数の抗がん剤が、ARMS の患者由来細胞株に対し増殖抑制効果を示した (図 1A)。一方、患者由来細胞株のみを用いて作製した PDOs の HE 染色像は類上皮細胞様であり元腫瘍を反映しているとは言い難く (図 1B)、従ってそのような細胞株を用いて実施した薬剤感受性試験の結果も臨床腫瘍の性質を反映していない可能性があり、研究を進めるうえで改善が必要であると考

えた。そこで研究代表者は、ARMS の腫瘍微小環境を *in vitro* で再現することを目指し、マウス筋肉を脱細胞化したものと ARMS 患者由来細胞株を共培養し質量分析による評価を実施した [2]。脱細胞化とは組織から細胞を除き細胞外マトリクスのみにすることであり、脱細胞化組織は移植材料として応用されている。研究代表者は横紋筋肉腫が最もよく発生するのは大腿など四肢の横紋筋 (骨格筋) であることに着目した。本研究においては、マウス下肢筋肉を取り出し界面活性剤で処理し、凍結乾燥後にペプシン消化によって可溶化することにより脱細胞化組織を調整した。この脱細胞化組織の質量分析を行った結果、筋肉に特異的な発現を示すタンパク質が含まれていることが確認された (図 2A)。この脱細胞化組織と ARMS 患者由来細胞株を低吸着プレート上で共培養したスフェロイドは、細胞外マトリクスとの結合に関連するタンパク質群を発現しており (図 2A)、断面の HE 染色像は不均一な形態と特徴的なタンパク質発現パターンを示した (図 2B)。これらの結果より、腫瘍が発生する臓器からの脱細胞化組織を用いて樹立された *in vitro* がんモデルは、腫瘍の微小環境を部分的に再現する可能性があると考えられた。なお細胞株と脱細胞化組織の相互作用の分子メカニズム解明には、更なる研究が必要である。

当初の研究計画では、得られた質量分析データとゲノム配列を用いたプロテオゲノミクス解析を実施予定であったが、そのためのソフトウェア (OncoProGx) が未発表段階である。従って、ARMS 患者由来細胞株に対するプロテオゲノミクス解析はソフトウェアの完成を待っての実施および報告とする。なお解析に必要なデータは本研究期間中に全て取得済である。

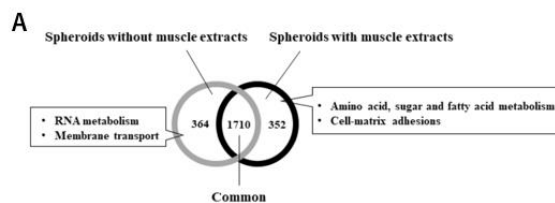


図2. ARMSの患者由来細胞株 (NCC-aRMS1-C1) と脱細胞化筋組織の共培養結果。

(A)質量分析によって同定されたタンパク質のベン図。

(B)HE染色像。I:脱細胞化筋組織を含まないスフェロイド。II:脱細胞化筋組織を含むスフェロイド。

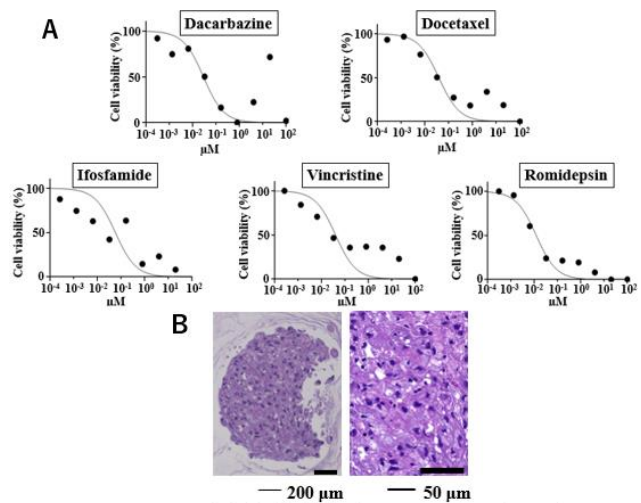


図1. ARMSの患者由来細胞株 (NCC-aRMS1-C1) の評価。
(A)210の薬剤を用いた感受性試験結果。(B)PDOsのHE染色像。

(2) 臨床腫瘍のがん関連タンパク質発現プロファイルを維持したスフェロイドの開発

PAX7-FOXO1 融合遺伝子産物の複合体の解析を実施するために、FOXO1 タンパク質の C 末端側を認識する抗体を用いて免疫沈降を実施したが、電気泳動の結果、融合タンパク質を示すバンドを確認することが出来なかった。原因として、樹立した ARMS 患者由来細胞株は PAX7-FOXO1 融合遺伝子は有するものの、融合タンパク質としては検出可能な量が細胞内に存在していない可能性が考えられた。また樹立した ARMS 患者由来細胞株は、生体内の不均一な状態を模倣させることを目的にクローニングはせずヘテロな細胞集団として維持されていたことより、継代を経るうちに PAX7-FOXO1 融合遺伝子を有する細胞集団が希釈された可能性も挙げられた。しかし本研究で用いた ARMS 患者由来細胞株は希釈に弱く限界希釈によるクローニングが不可能であった。

患者由来がんモデルから得られるデータの有用性をより向上させるためには臨床腫瘍が有する情報を *in vitro* でも維持させる必要がある。前述の脱細胞化組織を用いた研究を通して、細胞

培養液の組成を変えることにより細胞株のタンパク質発現プロファイルは大きく変化することが分かった。ただし脱細胞化組織の作製は煩雑なうえ、培養細胞におけるタンパク質発現へ与える影響を制御し難いという難点があった。そこで研究代表者は、抗がん剤開発を目的とした際に重要な情報である、がん関連パスウェイで機能するタンパク質の発現プロファイルを *in vitro*

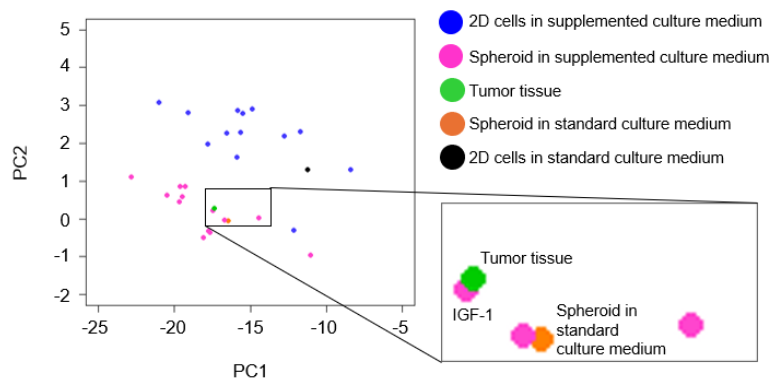


図3. 13種類の培養液で培養した2次元培養細胞とスフェロイド、および臨床腫瘍の94種類のタンパク質発現の主成分分析。

でも簡便に維持可能な培地開発を行うことにした。方法として、オルガノイド作製に使用するもの等から 13 種類の添加剤を選定し培地に添加し 2D および 3D 培養を行った患者由来細胞株について、がん関連パスウェイで機能する 94 種類のタンパク質発現について逆相タンパク質アレイ (RPPA) を用いて網羅的に評価した。その結果、IGF-1 を添加した 3D 培養細胞が、臨床腫瘍と近似したタンパク質発現プロファイルを示すことが分かった (図 3)。なおこの研究には比較的多くの臨床腫瘍が必要であり、ARMS のものでは不足したことから、悪性抹消神経鞘腫 (MPNST) 患者の臨床腫瘍および患者由来細胞株を資した。この患者由来細胞株も研究代表者自身が樹立したものである [3]。

異なる MPNST 患者由来の、合計 6 種の臨床腫瘍および患者由来細胞株について RPPA 解析を実施したところ、幹細胞の多能性保持に関わるタンパク質一群やアポトーシスに関わるタンパク質の発現量が比較的高いデータセット (MPNST3) が検出された (図 4)。更に 2D 培養細胞を用いて実施した 160 種類の抗がん剤のスクリーニング結果では、NCC-MPNST3-C1 細胞株が比較的薬剤抵抗性を示すことが分かった。このように RPPA により検出されるがん関連タンパク質の発現プロファイルは薬剤スクリーニング結果と結びつき得るものがあり、そのようながん関連タンパク質の発現プロファイルを臨床腫瘍のものに近似可能な本手法は、肉腫に有効な抗がん剤開発に有用であることが期待される。

細胞種によって最適な添加剤は異なる可能性があるため、がん種を拡大した引き続き検討が必要ではあるが、患者由来がんモデルを用いた研究について、よりよい方法論の確立に向けた改善案を見出せたといえる。

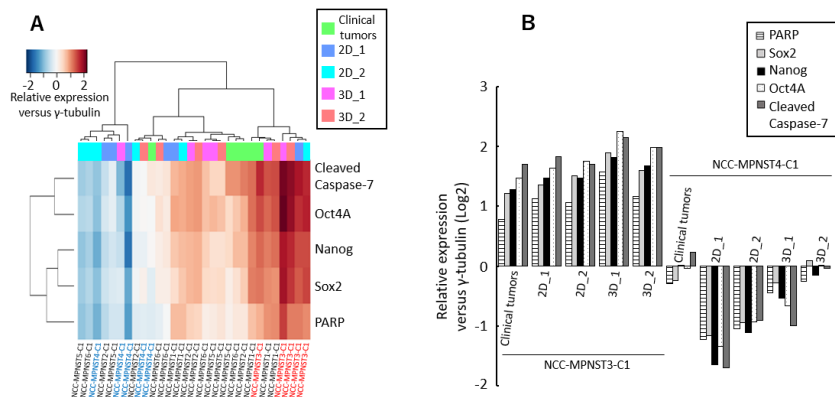


図4. MPNST患者の臨床腫瘍および患者由来細胞株を用いたRPPA解析結果。
(A) 幹細胞の多能性保持やアポトーシスに関わるタンパク質の発現プロファイル。
(B) NCC-MPNST3-C1細胞株とNCC-MPNST4-C1細胞株のタンパク質発現量比較。

<引用文献>

- ① [Yooksil Sin](#), Yuki Yoshimatsu, Rei Noguchi, Ryuto Tsuchiya, Akane Sei, Takuya Ono, Shunichi Toki, Eisuke Kobayashi, Ayumu Arakawa, Masanaka Sugiyama, Akihiko Yoshida, Akira Kawai, Tadashi Kondo, Establishment and characterization of a novel alveolar rhabdomyosarcoma cell line, NCC-aRMS1-C1, Hum Cell. 2020 Oct;33(4):1311-1320.
- ② [Yooksil Sin](#), Takuya Ono, Ryuto Tsuchiya, Rei Noguchi, Yuki Yoshimatsu, Hidetaka Kosako, Tadashi Kondo, Proteomic analysis of spheroids of rhabdomyosarcoma cells cultured with decellularized muscle extracts, Journal of Electrophoresis. 2022 June;66(1):1-4.
- ③ [Yooksil Sin](#), Yuki Yoshimatsu, Rei Noguchi, Ryuto Tsuchiya, Takuya Ono, Taro Akiyama, Fumihiko Nakatani, Jun Sugaya, Akihiko Yoshida, Akira Kawai, Tadashi Kondo, Establishment and characterization of NCC-MPNST6-C1: a novel patient-derived cell line of malignant peripheral nerve sheath tumors, Hum Cell. 2022 Jan;35(1):400-407.

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計2件（うち査読付論文 2件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 2件）

1. 著者名 Yooksil Sin, Takuya Ono, Ryuto Tsuchiya, Rei Noguchi, Yuki Yoshimatsu, Hidetaka Kosako, Tadashi Kondo	4. 巻 66
2. 論文標題 Proteomic analysis of spheroids of rhabdomyosarcoma cells cultured with decellularized muscle extracts	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Journal of Electrophoresis	6. 最初と最後の頁 1-4
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.2198/jelectroph.66.1	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 -

1. 著者名 Sin Y, Yoshimatsu Y, Noguchi R, Tsuchiya R, Ono T, Akiyama T, Nakatani F, Sugaya J, Yoshida A, Kawai A, Kondo T.	4. 巻 35
2. 論文標題 Establishment and characterization of NCC-MPNST6-C1: a novel patient-derived cell line of malignant peripheral nerve sheath tumors	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Hum Cell	6. 最初と最後の頁 400-407
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1007/s13577-021-00643-8	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 -

〔学会発表〕 計2件（うち招待講演 0件/うち国際学会 0件）

1. 発表者名 申育實
2. 発表標題 臨床腫瘍のがん関連タンパク質発現プロファイルを維持したスフェロイドの開発
3. 学会等名 患者由来がんモデル研究会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 申育實
2. 発表標題 希少がんに対する抗がん剤探索におけるpatient-derived cellおよびpatient-derived xenograftの有用性
3. 学会等名 2021年度文部科学省新学術領域研究 先端モデル動物支援プラットフォーム 若手支援技術講習会
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
---------	---------