

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 6 月 5 日現在

機関番号：32612

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2012～2014

課題番号：24791564

研究課題名(和文)悪性骨・軟部腫瘍に対する新規分子標的療法の開発

研究課題名(英文)Development of novel molecular therapy for malignant bone and soft tissue tumor

研究代表者

須佐 美知郎(Susa, Michiro)

慶應義塾大学・医学部・助教

研究者番号：90327560

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)：原発性悪性骨・軟部腫瘍の治療は、近年の術前化学療法の導入やMRIなどの画像診断技術の進歩により、著しい治療成績の改善を認めた。しかしながら、化学療法においては大量の抗癌剤を要し、重篤な副作用や薬剤耐性等のあらたな問題が生じ、ここ数十年は大きな予後の改善を認めていない。今回我々は、原発性悪性骨・軟部腫瘍の病態とそれにもとづく分子標的診断・治療開発の為にshRNAスクリーニングを用いて網羅的解析を行った。多様な肉腫を解析するために必要な新たな細胞株の樹立、細胞増殖抑制作用を示すキナーゼの同定、機能分析等を行い、これらの結果から、予後不良な肉腫の治療成績改善に寄与することが期待される。

研究成果の概要(英文)：Prognosis of malignant bone and soft tissue tumors have improved drastically in recent years due to advent of chemotherapy and new imaging modalities. Treatment of sarcomas necessitates large amount of chemotherapy leading to various side effects and drug resistance has lead to plateau in prognosis in the past decades. In this study, shRNA screening was utilized to detect novel kinase in order to elucidate the mechanism and improve the diagnosis and treatment of various sarcomas. In order to accomplish our goal, several novel cell lines were developed for the utilization of our experiment and some mechanism of kinase was analyzed for its anti-proliferative effect against the tumors.

研究分野：整形外科学・骨軟部腫瘍

キーワード：肉腫 治療 分子標的薬

1. 研究開始当初の背景

原発性骨・軟部腫瘍は間葉系由来の悪性腫瘍であり、稀な疾患であること、発生部位が多彩であること、病理組織学的に多彩であることが大きな特徴である。米国では悪性骨腫瘍は10万人対0.8人、悪性軟部腫瘍は10万人対5.0人で、2007年には2370人の悪性骨腫瘍、9220人の悪性軟部腫瘍の患者が発症すると推定されている。悪性骨・軟部腫瘍は稀な疾患であるがゆえ、その危険因子ならびに原因についての解明が進まなかった。米国で報告されたカポジ肉腫の発生頻度の増加以外、日本および諸外国における発生頻度はこの数十年で変化はないと考えられている。これは、環境や生活様式の変化によるものと思われる発症頻度の上昇が日本で報告された消化管や婦人科の悪性腫瘍とは異なる。人種間の罹患率の差に関しては、白人で発生頻度の高いことが知られるEwing肉腫などいくつかの例外はあるものの、悪性骨・軟部腫瘍全体で見ると大きな差はないとされている。

近年の術前化学療法の導入やMRIなどの画像診断技術の進歩は、原発性悪性骨腫瘍の治療において、著しい治療成績の向上をもたらした。しかしながら肉腫に対する化学療法は、大量の抗癌剤を必要とし、骨髄抑制をはじめ、副作用は極めて重篤である。また腫瘍の薬剤耐性の問題等から、ここ数十年は大きな予後の改善を認めていない。現在有効な補助療法がない肉腫も存在し、切除不能例、再発例などは、治療に難渋する。したがって、整形外科領域の悪性骨・軟部腫瘍の治療に際して、より安全で効果的な新規補助療法の開発が強く望まれている。治療の大きな障壁として、抗癌剤耐性の問題があげられる。治療経過中に薬剤が奏効しなくなる悪性腫瘍の薬剤耐性の問題は肉腫だけではなく、癌治療全体の進歩を阻んでおり、克服のために様々な研究がおこなわれているが、残念ながら副作用の問題から実用化にはいたっていない。

これまで原発性悪性骨・軟部腫瘍においてMet, ERBB family, PDGFR, AKT, Notch, Src等約30のキナーゼの関与が報告されてきたが臨床への応用にはいたっていない。キナーゼはリン酸結合を有するリン酸を基質あるいはターゲット分子に移行させる酵素であり、その阻害によっていくつかの癌腫においては治療効果の改善を認めている。特にgastrointestinal stromal tumorに対するimatinib mesylateの著明な予後改善効果は分子標的治療による可能性を示唆させる。しかしながら単一の阻害剤では変異や耐性、また各種シグナル伝達系に存在するcrosstalk等により、十分な治療効果をあげられないこともしばしば存在する。したがって複数のキナーゼ阻害剤の投与、段階的投与などによる治療成績の向上は可能であるものと考えられる。したがって、今回われわれが考案するような手法をもちいることにより、より多く

の原発性悪性骨・軟部腫瘍に關与するキナーゼを同定することにより、治療成績の飛躍的な改善が期待される。

2. 研究の目的

本研究の目的は原発性悪性骨・軟部腫瘍の病態解明とそれにもとづく分子標的診断・治療開発のための基礎的情報をえることである。shRNAスクリーニングを用いた約700種のキナーゼの網羅的解析を行うことによりそれぞれの肉腫の病態をより明確にし、新しい診断・治療法の開発や現在の治療の大きな障壁となっている抗がん剤薬剤耐性の克服等、それぞれの肉腫に対する最適な治療法を確立することを最終目的とする。すなわち本研究では病態の依然明確でない原発性悪性骨・軟部腫瘍に対して、従来の遺伝子機能解析研究では得られなかった新しい、かつ臨床的にきわめて有用性の高い知見が生み出され、予後不良である原発性悪性骨・軟部腫瘍の克服が一気に進むことが強く期待される。

3. 研究の方法

(1) 骨肉腫、軟骨肉腫、Ewing肉腫等の原発性悪性骨腫瘍細胞株をまた滑膜肉腫、悪性線維性組織球腫、横紋筋肉腫、平滑筋肉腫、脂肪肉腫等の原発性悪性軟部肉腫の細胞株を準備する。また適宜入手可能なものに関しては対応する薬剤耐性細胞株を入手。不可能なものに対しては薬剤耐性株の樹立を同時に行う。

(2) Lentiviral human kinase shRNA libraryを用いて各種細胞株に対して673種類のキナーゼの検証を行う。各種キナーゼshRNAにおいて5種のsequenceを用い、5種類中2種以上において細胞増殖作用を示すものについて随時追加実験を行っていく。

(3) 細胞増殖抑制作用を示すキナーゼを用い、各種肉腫細胞株に対して順次validationを行っていく。すなわちそれぞれの細胞株に対し、その各々のキナーゼが対照正常組織と比べて高発現していることをまず確認する。また手術的切除によりえられた組織においても同様に対象キナーゼの発現の有無を確認する。

(4) それぞれのキナーゼの抑制にはsiRNAを用いておこなう。siRNA導入による抑制効果はウエスタンブロッティング法および蛍光免疫染色法を用いて確認する。siRNA、各種抗体が市販されていないものに関しては、受託でおこなう。免疫組織化学検査には細胞株、切除した腫瘍から切片を作成し、ウエスタンブロッティング法には細胞株をRIPA Lysis Bufferを用いて溶解し、また凍結保存した腫瘍組織を破砕し、尿素緩衝液で溶解させたも

のを用いる。

(5) キナーゼ抑制による細胞抑制効果の解析には、各2種類のsiRNAを用いて、各種細胞株へのキナーゼ抑制効果に伴う細胞増殖能への影響をMTS試験により検討する。また細胞増殖抑制によるものなのか、apoptosisによるものなのかの判別の為、Tunel法を用いて検証する。

(6) それぞれの肉腫においてキナーゼの発現と予後における関連を可能な限り検証していく。Tissue microarrayをそれぞれの肉腫について手術時切除組織より作成し、免疫組織染色により、染色強度と予後との相関を検討する。また年齢、性別、発症部位、化学療法の施行の有無、腫瘍の大きさ等、各種パラメーターとの関連も可能なものにおいては検討する。

(7) キナーゼ阻害に伴うシグナル伝達系への影響をウエスタンブロッティング法を用いて検索する。すなわち対象キナーゼの上・下流に位置する各種蛋白質の発現を検討する。

(8) 肉腫モデルに関して、入手した骨肉腫、軟骨肉腫、Ewing肉腫細胞株はヌードマウスの大腿骨内へ、滑膜肉腫、悪性線維性組織球腫、横紋筋肉腫、平滑筋肉腫、脂肪肉腫等の原発性悪性軟部肉腫の細胞株はマウス背部皮下へ接種予定である。同定されたキナーゼは肉腫マウスモデルの尾静脈より投与し、腫瘍増殖・腫瘍転移能に対する影響を評価する。投与後は各臓器の組織切片を作成し、腫瘍組織及び各臓器への影響を解析し、また肉腫モデルの血液検査と連動させることにより、副作用の有無等を検討する。

4. 研究成果

これまで原発性骨・軟部腫瘍において様々な分子の関与が示唆され、既に血管新生を阻害するマルチキナーゼ阻害薬のパゾパニブが臨床現場で使用可能となった。また50種以上にも細分化されている肉腫の治療において発現分子による治療法のカスタム化が他の癌腫に遅れて報告されるようになってきている。MET, ERBB family, PDGFR, AKT, Notch, Src, IGF等約30のキナーゼの関与が報告され、臨床試験が開始されたものも少なくないが、現在のところ、未だ既存の治療と比較して、有意に勝るものの報告はない。これは未知の分子や分子同士のcrosstalkの存在が、十分な治療効果をあげられない一因としてあげられる。したがって複数のキナーゼ阻害薬の投与、段階的投与等による治療成績の向上は可能であると考えられ、今後も新たな分子の発現が待たれる状況である。本研究を遂行するには各肉腫が希少な疾患である

ことから、細胞株の樹立・入手が不可欠であり、これまで undifferentiated pleomorphic sarcoma(UPS88)と myxoid chondrosarcoma(#142)の樹立に成功し各種学会にて発表した。また骨肉腫、ユーイング肉腫の細胞株を入手し、骨肉腫細胞株のシスプラチン耐性モデルを作成、現在も多剤の薬剤耐性モデルを作成中である。いずれの腫瘍細胞もヌードマウスへの移植が可能であり、数週間で肉眼的にも確認できる腫瘍塊を形成することが観察された。Lentiviral 人キナーゼ shRNA libraryを用いて、数種類の細胞株のスクリーニングを行った結果、PDL1, STAT3等、有望な分子が同定されたため、切除検体にて作成した tissue microarrayを用いてキナーゼの発現の度合いを解析した。生存率等の臨床データと蛋白の発現率を検討したところ、発現率との相関がSTAT3においては確認された。今後は、肉腫モデルにおいて、各種キナーゼ阻害による腫瘍増殖・腫瘍転移能に対する影響を評価する。また腫瘍組織及び各臓器への影響を解析し、副作用の有無等を検討していく予定である。

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 0 件)

[学会発表](計 2 件)

(1) Keisuke Horiuchi, Robert Nakayama, Michiro Susa, Itsuo Watanabe, Yoshiaki Toyama, Hideo Morioka, Establishment and characterization of novel undifferentiated round cell sarcoma cell line. Connective Tissue Oncology Society, 2013年10月30日-11月2日、New York, USA

(2) 堀内圭輔、中山口バート、須佐美知郎、渡部逸央、戸山芳昭、森岡秀夫、新規 undifferentiated pleomorphic sarcoma 細胞株の樹立、日本整形外科学会 骨・軟部腫瘍 学術集会、2013年7月11日、東京都文京区、東京ドームホテル

[図書](計 0 件)

[産業財産権]

出願状況(計 0 件)

取得状況(計 0 件)

[その他]

なし

6 . 研究組織

(1)研究代表者

須佐 美知郎 (Susa Michiro)

慶應義塾大学・医学部・助教

研究者番号： 90327560