

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 6 月 9 日現在

機関番号：17102

研究種目：基盤研究(B) (一般)

研究期間：2013～2016

課題番号：25293088

研究課題名(和文) 転座関連および非転座関連悪性軟部腫瘍における分子標的の網羅的探索

研究課題名(英文) Global search for molecular target in translocation associated and non-translocation associated soft tissue sarcoma

研究代表者

小田 義直 (ODA, YOSHINAO)

九州大学・医学研究院・教授

研究者番号：70291515

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 12,700,000円

研究成果の概要(和文)：転座関連腫瘍である孤立性線維性腫瘍では複数のチロシンキナーゼ型受容体及びシグナル伝達系の活性化が腫瘍の進展、増殖に関与することが推察された。新たに同定された転座関連腫瘍である軟部血管線維腫、C1C-DUX4/BCOR-CCNB3陽性肉腫の臨床病理学的特徴を明らかにした。転写因子FOXM1の発現は様々な軟部肉腫で悪性度、予後、抗がん剤耐性との関与が認められ治療ターゲットとなる可能性が示唆された。転座関連肉腫である滑膜肉腫と粘液型脂肪肉腫において癌精巢抗原NY-ESO-1, PRAMEの高発現を認め、さらに悪性度との相関も認め、免疫療法の標的として有用ある可能性が示唆された。

研究成果の概要(英文)：In solitary fibrous tumor, activation of several tyrosin kinase receptors and signal pathways were suggested to be correlated with tumor progression and proliferation. In recently identified translocation associated soft tissue tumors, such as angiofibroma of soft tissue and C1C-DUX4/BCOR-CCNB3 positive sarcoma, detailed clinicopathological and immunohistochemical features were elucidated. The expression of transcription factor, FOXM1, had correlation with histological grade, poor prognosis and anti-tumor drug resistance in several kinds of soft tissue sarcomas including synovial sarcoma, rhabdomyosarcoma, leiomyoma and angiosarcoma. FOXM1 may be potential molecular target in these sarcomas. In synovial sarcoma and myxoid liposarcoma, cancer-testis antigen, NY-ESO-1 and PRAME were frequently expressed. This results is suggestive that NY-ESO-1 and PRAME may be effective immunotherapy target in synovial sarcoma and myxoid liposarcoma.

研究分野：医歯薬学

キーワード：軟部肉腫 染色体転座 キメラ遺伝子 分子標的 シグナル伝達 癌精巢抗原 FOXM1

1. 研究開始当初の背景

悪性軟部腫瘍は分子遺伝学的特徴から大きく特異的染色体転座を伴う群と複雑核型を有し、染色体転座を伴わない群の二群に分けられる。**転座関連悪性軟部腫瘍**では、各々に特異的な遺伝子転座がその腫瘍発生に大きく寄与しているのに対し、**非転座関連悪性軟部腫瘍**では、多様な遺伝子変異の蓄積により腫瘍が発生していると考えられている。近年、軟部悪性腫瘍以外の悪性腫瘍においては特定の signal pathway を阻害する薬剤による分子標的治療が発達してきており、特にチロシンキナーゼ型受容体 (RTK) 阻害剤、PI3K-Akt/mTOR pathway 阻害剤、MAPK pathway 阻害剤などの有効性が報告されている。細胞周期関連蛋白に関しては CDK 阻害剤 及び MDM2 阻害剤による癌腫及び血液腫瘍に対する臨床試験が多数行われており、既存の化学療法との組み合わせで一定の効果を得ている。上記分子標的治療の候補となり得る (1) 受容体型チロシンキナーゼ (RTK)、(2) PI3K-Akt/mTOR および MAPK pathway、(3) 細胞周期関連蛋白などを、悪性軟部腫瘍全体で体系的、網羅的に解析した報告はない。

2. 研究の目的

転座関連および非転座関連悪性軟部腫瘍の臨床検体において、分子標的の可能性がありかつ悪性化と密接に関係しているとされる上記 pathway もしくは分子について、その活性化や異常を体系的、網羅的に検索する。その中で転座関連あるいは非関連腫瘍に有意に多く認められるものを同定するとともに、組織亜型別腫瘍特異的に認めるものも明らかにし、さらに予後を含めた様々な臨床病理学的因子に相関を認める分子を同定する。また cell line を用いて特定の分子の過剰発現およびノックダウン・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。転座

関連腫瘍では新たなキメラ遺伝子の発見により新たな疾患概念が確立されつつあるものもあり、それらの腫瘍についても病態を明らかにする。

3. 研究の方法

転座関連腫瘍と非転座関連腫瘍の臨床検体を対象として、(1) 主な signal pathway 上の分子標的治療候補蛋白発現の検討、(2) その mRNA 発現の検討、(3) 欠失や増幅、点突然変異などの遺伝子異常の探索、を体系的・網羅的に行った。その結果を踏まえ各腫瘍において特定の臨床病理学的因子と相関する分子を同定した。細胞株が有用な腫瘍では、siRNA によるノックダウンや阻害薬の使用による腫瘍増殖能、遊走能、浸潤能、及び抗がん剤感受性の変化を観察し、分子標的としての有用性の確認を行った。

4. 研究成果

1) 孤立性線維性腫瘍における受容体型チロシンキナーゼの発現・活性化

孤立性線維性腫瘍で NAB2-STAT6 融合遺伝子陽性例 76 例を抽出し、MAPK 経路、STAT3 の活性化について評価した。受容体型チロシンキナーゼとして、過去の文献から陽性の報告のある FGFR1、insulin receptor (INSR)、DDR1、Her2 を取り上げ、発現およびリン酸化の有無について免疫組織化学的に評価した。免疫染色より、p-Raf-1 は 83%が核に陽性、p-Mek1/2 は 92%が核に陽性、44%が細胞質に陽性、p-ERK1/2 は 78%が核に陽性、p-STAT3 は 84%が核に陽性、p-FGFR1 は 64%が核に陽性、52%が細胞質に陽性、Her2 は 61%が細胞質に陽性、p-Her2 は 50%が細胞質に陽性、DDR1 は 60%が細胞質に陽性、p-DDR1 は 9%が核に陽性、18%が細胞質に陽性、p-INSR は 68%が核に陽性という結果を得た。孤立

性線維性腫瘍においては複数のチロシンキナーゼ型受容体活性化及びシグナル伝達系の活性化が腫瘍の進展、増殖に関与することが推察された。

2) 新たに同定された転座関連腫瘍の臨床病理学的解析

悪性度が異なるものの細胞形態や組織構築が類似している孤立性線維性腫瘍と軟部血管線維腫はそれぞれ NAB2-STAT6、AHRR-NCOA2 という特徴的なキメラ遺伝子を有しており遺伝子診断によって鑑別が可能である。

Ewing 肉腫を含む極めて悪性度の高い小円形細胞肉腫と呼ばれる腫瘍群の中に CIC-DUX4 や BCOR-CCNB3 などの新たなキメラ遺伝子を有する腫瘍が存在することも明らかになってきている。当教室に集積された膨大な良性・悪性軟部腫瘍症例についてこれら新たに同定されたキメラ遺伝子に注目し症例の再検討を行い、軟部血管線維腫、CIC-DUX4/BCOR-CCNB3 陽性肉腫における臨床的、組織学的、免疫組織化学的なマーカー発現の特徴を明らかにした。軟部血管線維腫は多結節性増殖、多形性腫瘍細胞、顕著な線維化を示すものなど新たな組織学的特徴を有する例が見いだされた。免疫染色では CD163 とエストロゲンレセプターが有用な補助的マーカーと考えられた。分子診断では RT-PCR 法および FISH 法による NCOA2 遺伝子転座の証明が診断上有用であることが示された。

CIC-DUX4 陽性肉腫は高齢者にも発生し非定型的な成分として上皮様細胞成分を認めた。BCOR-CCNB3 陽性肉腫は軟部組織以外に骨にも発生し、異型の軽度な短紡錘形細胞成分を非定型的な成分として認めた。両者とも免疫染色で CD56, CD99, TLE1, WT1 が補助的に有用なマーカーと思われた。

3) 非転座関連肉腫における分子病理学的再分類

類似した細胞形態を呈する小児の悪性腫瘍である軟部悪性ラブドイド腫瘍と類上皮肉腫は SMARCB1 というタンパク質発現が両者とも欠失しており、鑑別が困難なことがある。両者において SMARCB1 遺伝子異常の頻度が異なり、その蛋白発現はマイクロ RNA アレイ解析により miR193-5b というマイクロ RNA によって制御されている可能性を見出した(図1)。さらにマイクロ RNA の発現パターン解析により、従来他の腫瘍と診断されていた腫瘍の中に軟部悪性ラブドイド腫瘍に含まれる一群が存在することを明らかにした。

後腹膜や腹腔内に発生することの多い脱分化型脂肪肉腫は MDM2 遺伝子増幅が特徴的であり、MDM2 阻害剤の臨床応用が検討されている。過去に後腹膜発生平滑筋肉腫と診断されていた腫瘍の中にも MDM2 遺伝子増幅を示すものが 20%存在し、このような腫瘍は脂肪成分を全く有していないものの、治療の観点からも脱分化型脂肪肉腫として取り扱うのが妥当であると思われた。

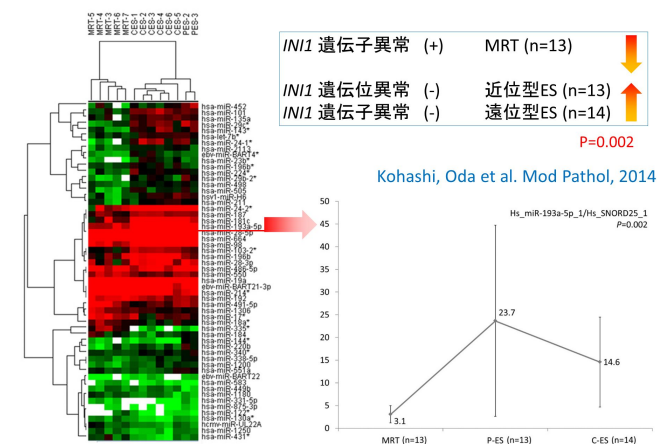


図 1: SMARCB1/INI1 タンパク質発現は miR-193a-5p によって制御を受けている可能性あり

4) 非転座関連肉腫における Akt-mTOR 経路の活性化

非転座関連肉腫である未分化多形肉腫にお

いて Akt にとって重要なクライアント蛋白の一つである HSP90 と Akt/ mTOR 経路の発現を検討した。臨床検体では HSP90 と Akt/ mTOR 経路の発現に相関を認め、HSP90 の発現と Akt/ mTOR 経路の活性化は予後不良因子であった。次に、細胞株を用いた解析で HSP90 阻害薬の抗腫瘍効果を検証したところ、HSP90 阻害薬は細胞増殖と浸潤能の抑制効果を示し、細胞の Akt/ mTOR 経路を不活性化した。以上から、HSP90 は未分化多形性肉腫における新たな治療標的となる可能性が示唆された。

非転座関連肉腫の脱分化型脂肪肉腫においては免疫染色では高分化型脂肪肉腫成分と比較して脱分化成分においてリン酸 mTOR と MEK の有意な高発現を認めた。細胞株を用いた研究では mTOR 阻害剤投与により ERK の活性化が生じ、mTOR 阻害剤および MEK 阻害剤の併用が単剤投与に比較して高い抗腫瘍効果を認めた(図2)。以上から脱分化型脂肪肉腫に対して MEK 阻害薬、mTOR 阻害薬の併用が効果的である可能性が示唆された。

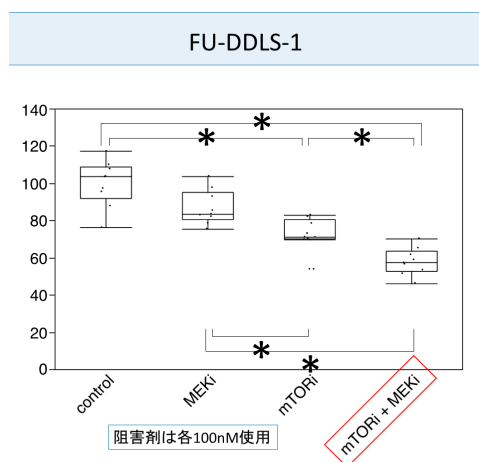


図2: 脱分化型脂肪肉腫細胞株 FU-DDLS-1 において mTOR および MEK 阻害薬の併用は単剤投与に比較して有意に細胞増殖を抑制

5) 軟部肉腫における転写因子 FOXM1 の発現とその分子標的としての可能性

平滑筋肉腫、横紋筋肉腫、血管肉腫、滑膜肉腫において検討した。免疫組織学的検討では

平滑筋肉腫、滑膜肉腫においては単変量、多変量解析において FOXM1 の発現は予後不良因子となっていた。他の肉腫においても FOXM1 の発現と臨床病理学的事項との相関を認めた。細胞株におけるその阻害の効果を検討したところ阻害薬や siRNA を用いた FOXM1 の阻害により、それぞれの細胞株で腫瘍増殖、化学療法抵抗性そして浸潤能などの低下を認めた。滑膜肉腫においては cDNA マイクロアレイによるクラスタリング分析にて FOXM1 の発現は細胞周期関連の遺伝子発現との相関が確認され、悪性化への関与が疑われた(図3)。以上から FOXM1 は様々な軟部肉腫での治療ターゲットとなる可能性が示唆された。

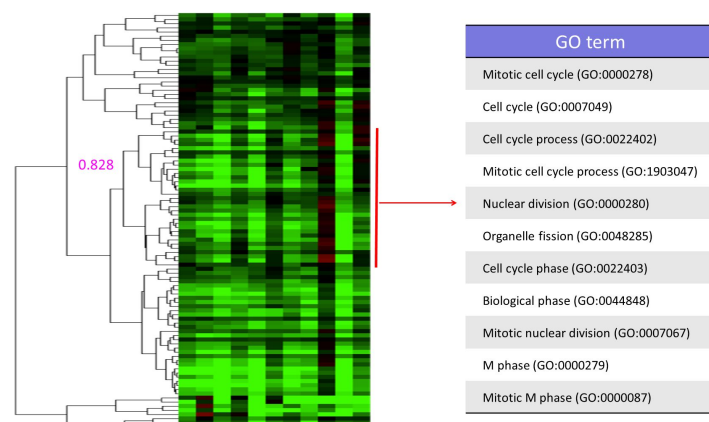


図3: 滑膜肉腫臨床検体における cDNA マイクロアレイによる FOXM1 と関連する遺伝子検索の結果、機能解析で細胞周期や細胞分裂に関する遺伝子が有意に多く含まれていた

6) 転座関連肉腫における癌精巢抗原発現

近年悪性腫瘍の新たな治療法として免疫療法が注目されており、免疫療法のターゲットとなる癌精巢抗原に着目した。転座関連肉腫である粘液型脂肪肉腫および滑膜肉腫において cDNA microarray 解析により癌精巢抗原 PRAME、NY-ESO-1、および MAGEA4 という癌精巢抗原がこれらの腫瘍で高発現しており補助的な予後予測因子となることも判明し(図4)、これらの分子が免疫療法の標的となりうることを明らかにした。非転座関連肉腫であ

る子宮原発と軟部組織原発の平滑筋肉腫における癌精巢抗原の発現も比較した。子宮原発腫瘍は軟部組織原発腫瘍に比較して MAGEA1, MAGEA3, MAGEA4, GAGE7 の発現が免疫染色にて高頻度に認められたことより、これらの癌精巢抗原が子宮原発平滑筋肉腫の免疫療法の標的として有用である可能性が示唆された。

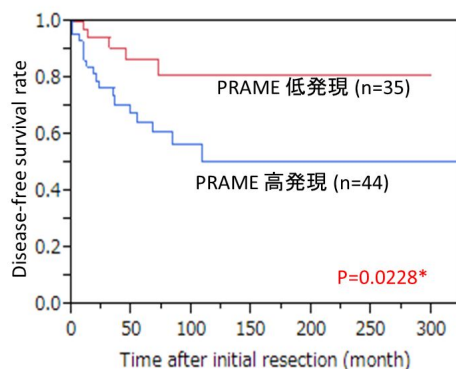


図 4: 粘液型脂肪肉腫において癌精巢抗原 PRAME の高発現は無病生存率において有意に予後不良因子となった

7) 悪性末梢神経鞘腫瘍 (MPNST) における網羅的遺伝子解析による予後因子の解析

当教室に登録された MPNST 症例から凍結標本のある神経線維腫症 1 型 (NF1) と関連のない MPNST (non-vRH MPNST) 11 症例、NF1 関連 MPNST (nVH-MPNST) 10 症例を抽出し、それに加えて、NF1 患者の neurofibroma 3 例を加えた 24 サンプルの腫瘍の遺伝子変異を次世代シーケンサーで解析した。vRH-MPNST の 6 サンプルで MN1 遺伝子変異が確認された。MN1 遺伝子変異は副腎皮質癌や悪性黒色腫などで確認されており、変異のタイプは異なるが類似した領域で変異が集中しており、MN1 遺伝子が NF1 患者からの MPNST の発生と関連していることが示唆された。また、non-vRH の MPNST と vRH の MPNST での予後の差異と遺伝子変異の関連について検討した。過去の報告

と同様に vRH の MPNST の予後が悪く、MN1 遺伝子と BCL2 遺伝子の関与が示唆された。しかし、MN1 遺伝子は vRH の MPNST と関連しており、独立した予後因子ではないと考えられた。BCL2 遺伝子変異は 3 症例で認められ、独立した予後因子である可能性がある。

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 46 件)

Ishii T, Kohashi K, Mr. Iura K, Maekawa A, Bekki H, Yamada Y, Yamamoto H, Nabeshima K, Kawashima H, Iwamoto Y, Oda Y:

Activation of the Akt-mTOR and MAPK pathways in dedifferentiated liposarcomas.

Tumour Biol. 2016 Apr;37(4):4767-76.

DOI: 10.1007/s13277-015-4232-2 査読有

Maekawa A, Kohashi K, Setsu N, Kuda M, Iura K, Ishii T, Matsunobu T, Nakatsura T, Iwamoto Y, Oda Y:

Expression of Fork Headbox M1 in soft tissue leiomyosarcoma;

Clinicopathological and in vitro study using newly established cell line.

Cancer Sci. 2016 Jan;107(1):95-102.

DOI: 10.1111/cas.12846 査読有

Iura K, Kohashi K, Ishii T, Maekawa A, Yamada Y, Hotokebuchi Y, Yamamoto H, Iwamoto Y, Oda Y:

Cancer-testis antigen PRAME and NY-ESO-1 correlates with tumor grade and poor prognosis in myxoid/round cell liposarcoma.

J Pathol, Clin Pract 1: 144-159, 2015

DOI: 10.1002/cjp2.16 査読有

Yamada Y, Kohashi K, Takahashi Y, Setsu

N, Makoto E, Yamamoto H, Iwamoto Y, Oda Y:
Activation of Akt-mTOR pathway and
receptor tyrosin kinase in solitary
fibrous tumors.

Cancer Mar 15 120(6): 864-76, 2014

DOI: 10.1002/cncr.28506 査読有

〔学会発表〕(計 73 件)

小田義直

宿題報告：軟部肉腫の病理病態－形態から分子生物学的アプローチへ
第 105 回日本病理学会総会、2016.5.12、仙台

Oda Y: (Invited lecture)

Recent advances in molecular pathology of
bone and soft tissue sarcomas.

1st International Symposium Foundation
for Promotion of Cancer Research

Recent Global Advances in Cancer Research
-Rare Cancers: Seeking for Ideal Medical
Care-

Feb 12, 2015, Tokyo

Oda Y:

Activation of Akt-mTOR pathway and its
therapeutic implication in spindle cell
soft tissue sarcomas. (Invited lecture)

Joint Japanese German Symposium

The 98th Annual Meeting of the German
Society of Pathology,

June 13, 2014, Berlin, Germany

Oda Y

Recent advances in molecular pathology of
soft tissue sarcomas: Keynote lecture
(Invited lecture)

2014 Annual Meeting of Taiwan Society of
Pathology and IAP Taiwan Division,

May 25, 2014, Taipei, Taiwan

〔図書〕(計 2 件)

① 小田義直:

骨・軟部腫瘍：がん診療方針のための病理診
断プラクティス

小田義直 総編集 中山書店 2013年10月

(執筆:軟部腫瘍・骨腫瘍の病理診断 p2-17、
未分化多形肉腫 p342-355)

小田義直:

軟部組織

深山正久 編：病理組織マップ&ガイド

文光堂 2014年4月 pp261-272

〔その他〕

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

(九州大学大学院 医学研究院 形態機能病理
学ホームページ)

6. 研究組織

(1) 研究代表者

小田 義直 (ODA, Yoshinao)

九州大学・医学研究院・教授

研究者番号：70291515

(2) 研究分担者

山元 英崇 (YAMAMOTO, Hidetaka)

九州大学・大学病院・准教授

研究者番号：30404073

孝橋 賢一 (KOHASHI, Kenichi)

九州大学・医学研究院・講師

研究者番号：10529879