

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 6 月 28 日現在

機関番号：17102

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2014～2016

課題番号：26462708

研究課題名(和文) 難治性小児悪性軟部腫瘍におけるFOXM1および関連蛋白発現と標的分子としての評価

研究課題名(英文) Evaluation of FOXM1 and related protein expression as target molecule in refractory pediatric malignant soft tissue tumor

研究代表者

久田 正昭 (KUDA, MASAOKI)

九州大学・医学研究院・助教

研究者番号：40381230

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,800,000円

研究成果の概要(和文)：小児悪性軟部腫瘍は予後不良で、新たな治療標的が望まれる。Forkhead box M1 (FOXM1) は、現在主要な悪性腫瘍において新たな治療標的として最も注目されている分子の一つである。小児悪性軟部腫瘍のうち、横紋筋肉腫(RMS)92例と滑膜肉腫(SS)106例におけるFOXM1発現を評価し、FOXM1発現が予後不良と関連する事を示した。RMSにおいてFOXM1はVEGF発現や血管新生と関連した。SS症例のcDNAマイクロアレイ分析において、細胞周期関連遺伝子の発現がFOXM1発現と関連することを示した。各腫瘍の細胞株に対する研究においてFOXM1抑制が新たな治療選択肢となる可能性を示した。

研究成果の概要(英文)：Pediatric malignant soft tissue tumor has a poor prognosis, and a new therapeutic target is desired. Currently, Forkhead box M1 (FOXM1) is one of the most notable molecules as a new therapeutic target in major malignant tumors. We evaluated FOXM1 expression in 92 patients with rhabdomyosarcoma (RMS) and 106 synovial sarcoma (SS) among pediatric malignant soft tissue tumors. We showed that FOXM1 expression is associated with poor prognosis. In RMS, FOXM1 correlated with VEGF expression and angiogenesis. In cDNA microarray analysis of SS cases, we showed that cell cycle related gene expression correlates with FOXM1 expression. We showed that FOXM1 inhibition could be a new treatment option in studies of cell lines of each tumor.

研究分野：小児外科、小児悪性腫瘍

キーワード：小児悪性軟部腫瘍 FOXM1 横紋筋肉腫 滑膜肉腫 治療標的分子

(1) 研究開始当初の背景

小児がんの発生数は年間3000人ほど(小児人口1万人に1人)で、非常に稀な病気であるが、3歳以上の子どもの死亡原因の中では事故に次ぐ第2位の座をいまだに占めている。小児がんは医学の進歩によって70~80%の症例で治癒が見込めるようになったが、20~30%は原病死する。これらの難治性の小児腫瘍の中には小児軟部腫瘍が含まれており、小児悪性軟部腫瘍の約半数を占める横紋筋肉腫の中でも、胞巣型横紋筋肉腫では現在でも5年生存率が52%と言われており、難治性の腫瘍と言える。このような稀で症例数の少ない小児悪性軟部腫瘍における治療法を検討することは困難であるが、未来を担う小児を一人でも多く救済できる治療を開発することは重要である。

現在、新たな悪性腫瘍に対する治療法の一つとして分子標的療法が注目されており、腫瘍細胞の増殖や浸潤、転移に関与する分子は代表的な標的となりうる。腫瘍増殖因子に結合する受容体の多くは細胞膜に存在し、細胞シグナル伝達を介して腫瘍の血管新生や各種のプロテアーゼの産生にも関与する。現在、これらの受容体に対する抗体や受容体のキナーゼの活性化、細胞シグナル伝達物質を阻害する薬剤の開発が進んでいる。

このような標的分子の一つとして、細胞周期を制御する転写因子として知られているForkhead box M1 (FOXM1) が注目されている。FOXM1はForkhead box familyに属し、脳腫瘍や乳癌、肝細胞癌など、種々の悪性腫瘍で発現を認めており、細胞増殖や細胞分化、DNA修復、組織の恒常性、血管新生、アポトーシスへの関与を通して、腫瘍の悪性化や薬剤感受性、転移、予後などとの相関が報告(図1)されている。2013年9月までに小児悪性軟部腫瘍におけるFOXM1の研究報告は極めて少なく、また多数の小児悪性軟部腫瘍の臨床検体を用いた研究は報告が無いのが現状であった。

(2) 研究の目的

小児悪性軟部腫瘍(横紋筋肉腫およびEwing肉腫、滑膜肉腫、悪性ラブドイド腫瘍)におけるFOXM1とその関連蛋白の発現について解析し、組織亜型や予後などの臨床病理学的事項との相関について検討する。さらに小児悪性軟部腫瘍の細胞株を用いてsiRNAによるノックダウンや阻害薬の使用により、腫瘍増殖能や遊走能、浸潤能の変化を評価し、小児悪性軟部腫瘍における分子標的療法の可能性を検討する。

(3) 研究の方法

小児悪性軟部腫瘍である横紋筋肉腫およびEwing肉腫、滑膜肉腫、悪性ラブドイド

腫瘍の臨床検体を対象として、FOXM1蛋白および関連蛋白(VEGFとMVD、CXCR4その他)の免疫組織化学的評価、上記各蛋白のWestern blotting法による検出、上記各蛋白のRealtime RT-PCRを用いた定量的評価を行い、臨床的因子との関連性の検討を行う。

次に、細胞株を用いてsiRNAによるノックダウンや阻害薬の使用、遺伝子強制発現により、腫瘍増殖能や遊走能、浸潤能の変化を評価する。これらの結果から各腫瘍におけるFOXM1およびその関連蛋白の標的分子としての評価を行う。

(4) 研究成果

横紋筋肉腫におけるFOXM1発現:新たな予後因子および治療標的

横紋筋肉腫(rhabdomyosarcoma; RMS)臨床症例92例における免疫組織化学染色では、FOXM1および血管内皮増殖因子(vascular endothelial growth factor; VEGF)の蛋白発現、新生血管の数を評価検討し、臨床病理学的因子と合わせて解析を行った。胎児型RMS(ERMS)と比べて予後不良である胞巣型RMS(ARMS)では、FOXM1高発現の割合が有意に高かった($P=0.0310$)。

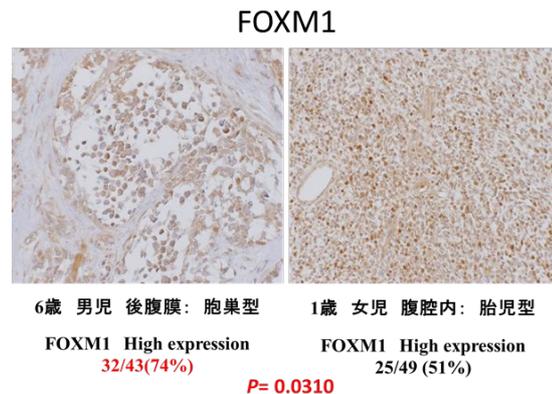


図1: FOXM1は難治性である胞巣型において有意に高発現していた

ERMS症例では、FOXM1高発現群($n=24$)は低発現群($n=25$)に比べ有意に予後不良であった($p=0.0310$)。

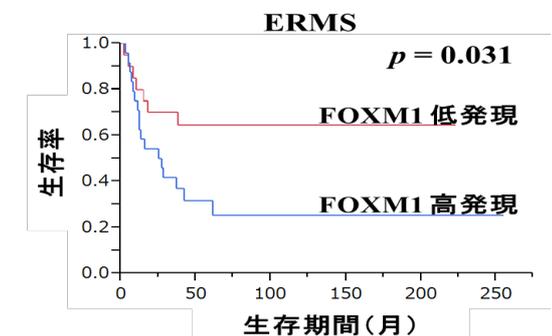


図2: 胎児型においてFOXM1高発現例は有意に予後不良であった

FOXM1 発現と VEGF 発現との統計学的相関関係は、ERMS 症例における蛋白レベルと、全 RMS 凍結標本における mRNA レベルとで認められた。

各組織型における
組織病理学的要素の相関

	胎児型			胞巣型			
	FOXMI	Low	High	p	Low	High	p
VEGF							
Low		14	6	0.0163*	3	9	1.0000
High		8	18		7	24	
MVD							
Low		10	7	0.3539	7	19	0.4447
High		11	16		2	13	
MIB-1 LI							
Low		9	12	0.5467	7	20	0.7190
High		12	10		3	13	
VEGF	胎児型			胞巣型			
	Low	High	p	Low	High	p	
MVD							
Low		14	14	0.0406*	12	5	0.4222
High		3	17		14	10	

* p < 0.05

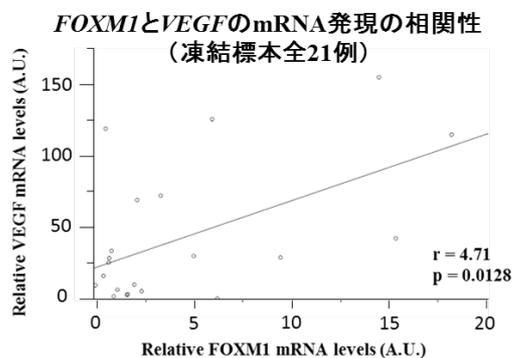


図 3: FOXM1 発現は 各種の癌腫と相関する VEGF 発現と有意に相関した

また、ERMS および ARMS 細胞株に対し small interference RNA (siRNA) を導入することで FOXM1 をノックダウンし、VEGF 発現への影響や増殖能や遊走能、浸潤能への影響を調べた。

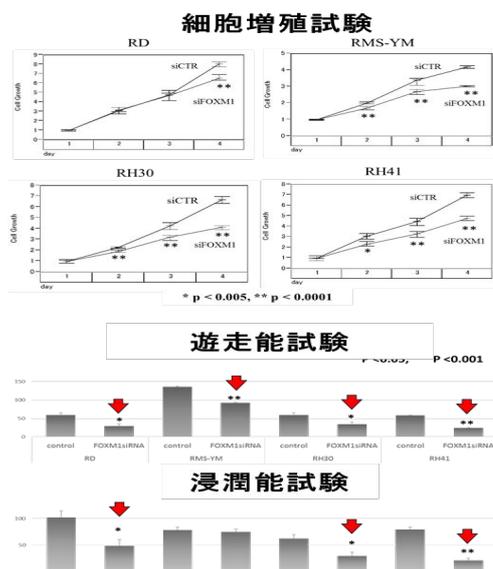


図 4: 横紋筋肉腫細胞株の FOXM1 ノックダウンにより細胞増殖能、浸潤能、遊走能は有意に減少した

FOXM1 のノックダウンにより RMS 細胞株の VEGF mRNA 発現レベルが低下した。FOXM1 のノックダウンは、使用した 4 つの RMS 細胞株の全てにおいて増殖能と遊走能を、また、4 つ中 3 つの細胞株で浸潤能を有意に低下させた。

以上の研究結果より、FOXM1 発現は横紋筋肉腫の予後因子となり、FOXM1 が横紋筋肉腫に対する有望な治療標的となり得る可能性が示唆された。

滑膜肉腫における FOXM1 発現の予後的意義と FOXM1 抑制の抗腫瘍効果の検討

滑膜肉腫(Synovial sarcoma; SS)臨床症例 106 例の免疫組織化学染色による FOXM1 発現を評価し臨床病理学的因子と関連性について検討し、単変量および多変量解析は、FOXM1 発現が SS における不良予後と関連していることを明らかとなった。また、FOXM1 発現は有糸分裂活性や MIB-1 index と相関していた。臨床検体 11 例を用いた cDNA マイクロアレイ分析は、細胞周期関連遺伝子の発現が FOXM1 発現と相関した。

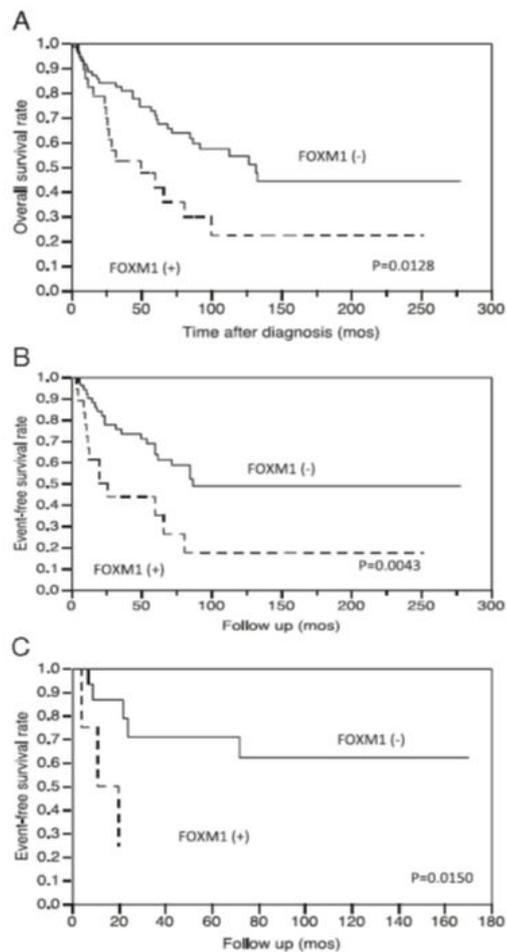


図 5: 滑膜肉腫症例において、FOXM1 発現は予後不良因子であった。(A; OS, B; EFS, C; EFS for the 19 patients treated with chemotherapy)

SS細胞株に対するFOXM1抑制剤やsiRNAによるノックダウンの効果について研究では、チオストレプトンによるFOXM1阻害は、インビトロでSS細胞株に対して有意な抗腫瘍活性を示した。siRNAによるFOXM1抑制は、両方のSS細胞株におけるドキソルビシン(DOX)に対する化学感受性を増加させた。

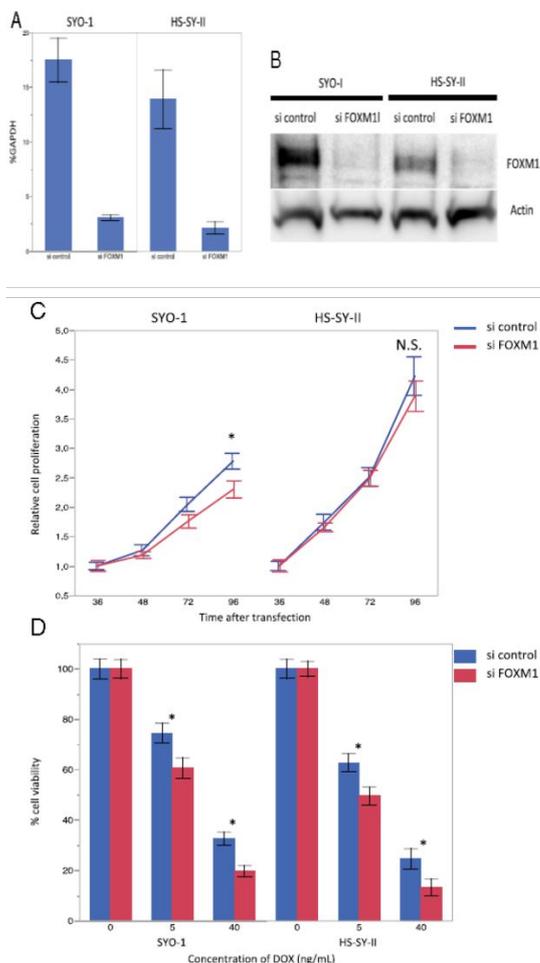


図6: 滑膜肉腫細胞株に対するsiRNA導入によるFOXM1抑制により、増殖能低下とドキソルビシンの感受性増加が示された。

以上により、FOXM1発現は新規のバイオマーカーであり、その阻害はSSの潜在的な治療選択肢であることが示唆された。

(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 11 件)

Maekawa A, Kohashi K, Kuda M, Iura K, Ishii T, Endo M, Nakatsura T, Iwamoto Y, Oda Y.

Prognostic significance of FOXM1 expression and antitumor effect of FOXM1 inhibition in synovial sarcomas. BMC Cancer. 査読有 2016 Jul 20;16:511. doi: 10.1186/s12885-016-2542-4.

Kuda M, Kohashi K, Yamada Y, Maekawa A, Kinoshita Y, Nakatsura T, Iwamoto Y, Taguchi T, Oda Y.

FOXM1 expression in rhabdomyosarcoma: a novel prognostic factor and therapeutic target. Tumour Biol. 査読有 Apr;37(4): 5213-23. 2016

doi: 10.1007/s13277-015-4351-9. Epub 2015 Nov 9.

〔学会発表〕(計 5 件)

第36回 日本小児病理研究会学術集会
シンポジウム 平成28(2016)年8月27日
福岡、シンポジスト

次世代の横紋筋肉腫治療～分子標的治療からワクチン療法まで

久田正昭、木下義晶、中面哲也、小田義直、田口智章

第104回日本病理学会総会、平成27(2015)年4月30日～5月2日、名古屋
横紋筋肉腫におけるFOXM1発現の検討

Forkhead box M1 expression in rhabdomyosarcoma

久田正昭、孝橋賢一、中面哲也、三好きな、山田裕一、山元英崇、田口智章、岩本幸英、小田義直

〔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〕
ホームページ等 なし

(6) 研究組織

研究代表者

久田 正昭 (KUDA MASA AKI)

九州大学 医学研究院・助教

研究者番号: 40381230

研究分担者

田口 智章 (TAGUCHI TOMOAKI)

九州大学 医学研究院・教授

研究者番号: 20197247

木下 義晶 (KINOSHITA YOSHI AKI)

九州大学 大学病院・准教授

研究者番号: 80345529

宗崎 良太 (SOUZAKI RYOTA)

九州大学 大学病院・助教

研究者番号: 10403990

孝橋 賢一 (KOHASHI KENICHI)
九州大学 医学研究院・講師
研究者番号： 10529879

三好 きな (MIYOSHI KINA)
九州大学 医学研究院・助教
研究者番号： 20621709

(3)連携研究者
なし

(4)研究協力者
なし