

令和元年6月18日現在

機関番号：17102

研究種目：若手研究(A)

研究期間：2014～2018

課題番号：26713046

研究課題名(和文) 骨軟部腫瘍における薬剤感受性・耐性機構の解明に基づいた新規個別化薬物治療の開発

研究課題名(英文) Development of novel personalized drug therapy based on elucidation of drug sensitivity and resistance mechanism in bone and soft tissue tumors

研究代表者

遠藤 誠 (Endo, Makoto)

九州大学・大学病院・助教

研究者番号：40713433

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 18,100,000円

研究成果の概要(和文)：骨軟部腫瘍に対して広く用いられているドキシソルビシン、パゾパニブ、エリブリンなどの薬剤に対して、薬剤耐性を示す軟部肉腫細胞株の作成を行った。樹立された薬剤耐性細胞株を用いて、薬剤耐性に関する遺伝子およびタンパクの分析を行った。そのなかで、滑膜肉腫のパゾパニブ耐性株を用いた研究により、その薬剤耐性メカニズムの解明に成功し、英文雑誌に発表した。そのほか、薬剤耐性に関する低酸素誘導因子であるHIF1 α が悪性末梢神経鞘腫瘍で予後不良因子であり、治療標的となり得ることを見出した。平滑筋肉腫において、エリブリンへの薬剤耐性獲得に、Class III β -tubulinの過剰発現が関与することを見出した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究成果を進展させ、臨床的な有用性が示されれば、骨軟部肉腫患者の薬物療法において、より効果を期待できる薬剤選択に有用と考えられる。また、本研究で明らかとなった薬物耐性獲得機序を阻害することに成功すれば、薬物療法の効果を長期に持続させることが可能となり、骨軟部肉腫患者の予後改善につながる可能性がある。

研究成果の概要(英文)：We developed sarcoma cell lines showing resistance to anticancer drugs such as doxorubicin, pazopanib and eribulin, which were widely used for bone and soft tissue sarcomas. The established drug resistant cell lines were used to analyze genes and proteins involved in drug resistance. Among them, the research using the pazopanib-resistant cell line of synovial sarcoma has succeeded in elucidating the mechanism of drug resistance and published in an English journal. In addition, we have found that HIF1 α , a hypoxia-inducible factor involved in drug resistance, is a poor prognostic factor in malignant peripheral nerve sheath tumors and can be a therapeutic target. In leiomyosarcoma, we found that acquisition of drug resistance to eribulin involves overexpression of Class III β -tubulin and published in an English journal.

研究分野：骨軟部腫瘍

キーワード：肉腫

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19、CK - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

1) 骨軟部腫瘍の分類・薬物治療の現状と課題

骨軟部腫瘍には多種多様な組織型が含まれるが、大きく転座関連腫瘍と非転座関連腫瘍に分類可能である。転座関連腫瘍とは、融合遺伝子など特徴的な遺伝子異常を呈する腫瘍群であり、一方、非転座関連腫瘍とは特徴的な遺伝子異常を持たず、複雑核型を示す腫瘍群である。骨軟部腫瘍は大きく遺伝子背景の異なる腫瘍群により構成され、それぞれに対する効果的な薬物治療を開発する必要があると思われるが、一律に同様な治療が行われているのが現状である。理論的には転座関連腫瘍には分子標的治療薬が、非転座関連腫瘍には細胞毒性薬が適すると思われるが、また両者の併用や、薬剤耐性獲得を阻害する薬剤の併用などにより治療効果の改善が見込まれるが、その実現には至っていない。

骨軟部腫瘍の治療法は外科的切除が第一選択である。薬物療法は、術前・術後補助療法として、もしくは進行例に対して延命を目的に行われている。使用される薬剤は細胞毒性薬であるアドリアマイシン、イホスファミド、シスプラチン、メソトレキセート、エトポシドなどであり、ほとんどの症例で長期使用により薬剤耐性を来す。しかし薬剤感受性を決定する因子や、薬剤耐性メカニズムは明らかとなっていない。上記抗がん剤に加えて、最近マルチキナーゼ阻害薬であるパゾパニブが軟部肉腫に対して適応承認され臨床応用されている。パゾパニブは投与初期には抗腫瘍効果を示す症例が多いものの耐性獲得により最終的に腫瘍増大を来たしやすいうことが問題となっており、そのことが PALETTE 試験においてパゾパニブが無増悪生存率で上回ったものの、全生存率ではプラセボと有意差がみられなかったことの原因の一つと考えられている。パゾパニブなどの分子標的治療薬では従来の細胞毒性薬に対する薬剤耐性獲得機序とは異なり、他のシグナル伝達系活性化の関与が示唆される。

上記状況により、骨軟部腫瘍患者の予後改善のためには組織型や各症例の腫瘍特性に基づいた個別化薬物治療の開発が望まれる。そのためには薬剤感受性決定因子を明らかにし、薬剤耐性獲得メカニズムとその阻害法を明らかにし、また優れたバイオマーカーを開発する必要がある。

2) 薬剤感受性・耐性決定因子と薬剤投与開始後に生じる獲得耐性

薬剤耐性には腫瘍細胞がもともと持ち合わせている自然耐性と、薬剤投与開始後に抵抗性を獲得していく獲得耐性がある。骨軟部腫瘍は一般的な癌腫や血液系腫瘍と比較し、薬剤抵抗性である頻度が高く、自然耐性を持ち合わせていると思われる。それに加え、薬剤投与開始後に生じる獲得耐性も問題である。獲得耐性は進行例に対して薬物療法を行っている際に問題となることが多く、薬物療法の回数を重ねるごとに奏効性が低下し、最終的には効果がみられなくなる。使用できる薬剤が非常に限られている骨軟部腫瘍では獲得耐性の出現は致命的な問題となる。薬剤耐性は細胞毒性薬・分子標的薬に共通する問題である。

腫瘍細胞の薬剤耐性に関わる分子生物学的機構として、トランスポータータンパクの増加、DNA 修復機能の亢進、アポトーシスの回避、分子標的治療薬における標的以外の別のシグナル伝達系の活性化、がん(肉腫)幹細胞の存在、マイクロ RNA の関与など様々なメカニズムの存在が複数関わっていることが予想される。しかしながら、骨軟部腫瘍における薬剤耐性メカニズムの詳細は明らかとなっていない。

3) 応募者のこれまでの研究成果と着想の経緯

応募者はこれまで、骨軟部腫瘍における高悪性化機序の解明と新規薬物治療の開発を目的とした複数の研究を行ってきた。そのなかで、悪性末梢神経鞘腫瘍や滑膜肉腫などの骨軟部腫瘍では AKT-mTOR 系や MAPK 系などのシグナル伝達系が異常活性化している頻度が高いこと、mTOR 阻害薬が悪性末梢神経鞘腫瘍細胞株に対して抗腫瘍効果を示すことを明らかにした。しかし、分子標的治療薬の単剤投与では他のシグナル伝達系活性化などによる薬剤耐性獲得が高頻度に生じること、また臨床応用されているパゾパニブにおいて薬剤耐性が多く経験されること、そもそも抗がん剤に自然耐性を示す腫瘍の頻度が高いことが、骨軟部腫瘍患者の予後を悪化させている要因として実臨床で問題となっている。そのため、薬剤感受性決定因子を明らかにしてバイオマーカーを開発し組織型や各症例ごとの腫瘍特性に基づいた個別化治療を進めること、薬剤耐性獲得メカニズムを明らかにしてその阻害法を発見し、細胞毒性薬、分子標的薬、薬剤耐性阻害薬を組み合わせた新規薬物治療法を開発することが必要と感じ、本研究を思い立った。

2. 研究の目的

骨軟部腫瘍に代表される間葉系腫瘍には多種多様な組織型が含まれるが、その多くが現行の薬物治療に抵抗性である。骨軟部腫瘍に対する治療としては、外科的切除が第一選択であり、切除可能な病変は治癒可能なことも多いが、一方、進行例で切除不能な病変に対しては有効な全身療法がなく、多くの若年者を含む骨軟部腫瘍患者が命を落とす原因となっている。そのため骨軟部腫瘍に対する有効な薬物治療の開発は急務であり、臨床現場ではその登場が切に望ま

れている。本研究は、骨軟部腫瘍患者の生命予後改善を目的に、薬剤感受性決定因子の同定と耐性獲得メカニズムの解明に基づいた新規個別化薬物治療開発を目指すものである。

3. 研究の方法

1) 臨床検体を用いた薬剤感受性・耐性関連因子のスクリーニング

抗癌剤治療を行った骨軟部腫瘍症例の生検材料(ホルマリン固定パラフィン包埋標本、凍結材料)を用いて、臨床的な薬剤の効果(画像的腫瘍縮小効果、組織学的残存腫瘍割合、無増悪生存期間)と腫瘍の遺伝子発現、マイクロRNA発現の網羅的解析結果を照合し、薬剤感受性・自然耐性関連因子を探索する。

2) 細胞株を用いた *in vitro* および *in vivo* での薬剤感受性・耐性関連因子のスクリーニング
骨軟部腫瘍および癌由来の細胞株を用い、*in vitro* での薬剤感受性と関連のある遺伝子・マイクロRNA発現を解析する。また同様の解析をヌードマウスを用いた xenograft モデルを用いて行い、*in vivo* でも同様の関連性が認められるかどうかを解析する。

3) 骨軟部腫瘍における薬剤自然耐性の分子生物学的メカニズムの解析

上記1)および2)で同定された因子について、その薬剤耐性に働く分子生物学的メカニズムを明らかにする。

4. 研究成果

骨軟部腫瘍の治療で広く用いられているドキソルビシンおよび新薬であるパゾパニブやエリブリンを用いて、薬剤耐性を示す細胞株の作成を行った。おもな骨軟部腫瘍由来の細胞株である滑膜肉腫細胞株、脂肪肉腫細胞株、悪性末梢神経鞘腫瘍細胞株などを用い、細胞株への薬剤の反復投与を行い、複数の薬剤耐性骨軟部腫瘍由来細胞株の樹立に成功した。樹立された薬剤耐性骨軟部腫瘍由来細胞株を用いて、同一の細胞株で薬剤耐性獲得前の細胞株と薬剤耐性獲得後の細胞株において、それぞれにおける遺伝子およびタンパクの網羅的発現解析を行い、薬剤耐性に関与する遺伝子およびタンパクの分析を行った。同解析にて複数の候補分子が同定され、その中から新規性のある分子、過去に薬物耐性への関与が報告されている分子など注目すべき分子を選択し、複数の候補分子について、より詳細な解析を行った。そのなかで、滑膜肉腫のパゾパニブ耐性株を用いた研究により、その薬剤耐性メカニズムの解明に成功し、英文雑誌に発表した。その研究では、薬剤耐性獲得にはDUSP6のdownregulationを介したERK1/2の活性化が関与しており、MEK-ERK inhibitorによるパゾパニブ耐性克服の可能性が示唆された。また、薬剤耐性に関与する低酸素誘導因子であるHIF1 α が高悪性度軟部肉腫の一つである悪性末梢神経鞘腫瘍で予後不良因子であり、治療標的となり得ることを英文雑誌に発表した。代表的な軟部肉腫の一つである平滑筋肉腫において、エリブリンへの薬剤耐性獲得に、従来から知られていたMDR1などに加えて、Class III β -tubulinの過剰発現が関与することを見出した。そして興味深いことに、Class III β -tubulinを阻害すると、エリブリンに対する感受性が回復することを確認し、将来的な臨床応用の可能性を示唆する結果を得た。

5. 主な発表論文等

[雑誌論文](計 4 件)

Yahiro K, Matsumoto Y, Fukushi JI, Kawaguchi K, Endo M, Setsu N, Iida K, Fukushima S, Nakagawa M, Kimura A, Oda Y, Nakashima Y.

Class III β -tubulin overexpression induces chemoresistance to eribulin in a leiomyosarcoma cell line.

Analytical Cellular Pathology, vol. 2018, Article ID 8987568, 2018.

Fukushima S, Endo M, Matsumoto Y, Fukushi JI, Matsunobu T, Kawaguchi K, Setsu N, Iida K, Yokoyama N, Nakagawa M, Yahiro K, Oda Y, Iwamoto Y, Nakashima Y.

Hypoxia-inducible Factor 1 alpha is a Poor Prognostic Factor and Potential Therapeutic Target in Malignant Peripheral Nerve Sheath Tumor.

Plos One. 12(5):e0178064, 2017.

Yokoyama N, Matsunobu T, Matsumoto Y, Fukushi JI, Endo M, Hatano M, Nabeshima A, Fukushima S, Okada S, Iwamoto Y.

Activation of ERK1/2 Causes Pazopanib Resistance via Downregulation of DUSP6 in Synovial Sarcoma Cells.

Sci Rep. 7:45332, 2017.

Nabeshima A, Matsumoto Y, Fukushi J, Iura K, Matsunobu T, Endo M, Fujiwara T, Iida K, Fujiwara Y, Hatano M, Yokoyama N, Fukushima S, Oda Y, Iwamoto Y.

Tumour-associated macrophages correlate with poor prognosis in myxoid liposarcoma and promote cell motility and invasion via the HB-EGF-EGFR-PI3K/Akt pathways.

Br J Cancer. 112(3):547-55, 2015.

[学会発表](計 8 件)

Endo M, Yokoyama N, Setsu N, Fujiwara T, Yahiro K, Kimura A, Shimada, E, Tsuchihashi K, Kusaba H, Oda Y, Nakashima Y, Matsumoto Y. Clinical outcome of eribulin in patients with advanced soft tissue sarcoma: a cohort study including non-L-sarcomas. 2018 Annual Meeting of Connective Tissue Oncology Society (Nov.14-17, 2018, Rome, Italy)

Matsumoto Y, Yokoyama N, Matsunobu T, Endo M, Setsu N, Iida K, Fukushima S, Iwamoto Y. Mechanism of pazopanib resistance in synovial sarcoma. The 21th Annual Meeting of Connective Tissue Oncology Society (Nov.9-12, 2016, Lisbon, Portugal)

Makoto Endo, Nokitaka Setsu, Kenichi Kohashi, Hidetaka Yamamoto, Michiyuki Hakozaiki, Tomoya Matsunobu, Yoshihiro Matsumoto, Katsumi Harimaya, Yukihide Iwamoto, Yoshinao Oda. Clinicopathologic, Prognostic And In Vitro Evaluation To Assess The Rationale For Mtor Inhibition In Malignant Peripheral Nerve Sheath Tumors. The Orthopaedic Research Society 2015 Annual Meeting (Mar.28-31, 2015, Las Vegas, USA)

八尋 健一郎, 松本 嘉寛, 遠藤 誠, 薛 宇孝, 木村 敦, 小田 義直, 中島 康晴
平滑筋肉腫患者における class 3 チュープリンの発現は予後と相関する

第 51 回日本整形外科学会 骨軟部腫瘍学術集会(2018.7.12~13 静岡)

八尋健一郎, 松本嘉寛, 中川亮, 福島俊, 横山信彦, 飯田圭一郎, 薛宇孝, 遠藤誠, 中島康晴

平滑筋肉腫細胞株における eribulin 耐性化機序の検討

第 50 回日本整形外科学会 骨軟部腫瘍学術集会(2017.7.13~14 東京)

福島俊, 松本嘉寛, 鍋島央, 遠藤誠, 薛宇孝, 飯田圭一郎, 横山信彦, 中川亮, 八尋健一郎, 中島康晴

悪性末梢神経鞘腫瘍の薬剤耐性機序の検討

第 133 回西日本整形・災害外科学会 (2017/6/17~18 久留米)

福島俊, 松本嘉寛, 八尋健一郎, 中川亮, 横山信彦, 飯田圭一郎, 薛宇孝, 遠藤誠, 福士純一, 小田義直, 中島康晴

悪性末梢神経鞘腫瘍において低酸素誘導因子 HIF-1 の発現は予後不良と相関する

第 90 回日本整形外科学会 学術総会(2017.5.18~21 仙台)

横山信彦, 松延知哉, 福島俊, 鍋島央, 畑野美穂子, 遠藤誠, 松本嘉寛, 福士純一, 播谷勝三, 岩本幸英

滑膜肉腫細胞株におけるアドリアマイシン耐性株およびパゾパニブ耐性株の樹立と耐性メカニズムの検討

第 48 回日本整形外科学会 骨軟部腫瘍学術集会(2015.7.9~10 香川)

〔図書〕(計 3 件)

遠藤誠, 川井章

【新薬展望 2017】(第 II 部)注目の新薬 抗悪性腫瘍剤 一般名:トラベクテジン ヨンデリス点滴静注用 0.25mg,同 1mg. 医薬ジャーナル 53 巻増刊:263-272, 2017

遠藤誠, 川井章

悪性軟部腫瘍に対するトラベクテジン. 腫瘍内科 18(2):176-182, 2016

遠藤誠, 川井章

【がん標的分子と治療開発-現状と将来】各臓器別の新薬開発の現状と将来 骨・軟部腫瘍医学のあゆみ 258(5):591-597, 2016

〔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

<http://hyoka.ofc.kyushu-u.ac.jp/search/details/K004977/index.html>

6. 研究組織

(1)研究分担者

研究分担者氏名:なし

(2)研究協力者

研究協力者氏名:なし

ローマ字氏名:

科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属されます。