

令和 2 年 6 月 15 日現在

機関番号：32620

研究種目：国際共同研究加速基金（国際共同研究強化）

研究期間：2016～2019

課題番号：15KK0319

研究課題名（和文）抗癌剤抵抗性骨肉腫に対する新規治療法の開発（国際共同研究強化）

研究課題名（英文）Novel therapeutic strategy for refractory osteosarcoma(Fostering Joint International Research)

研究代表者

窪田 大介（KUBOTA, DAISUKE）

順天堂大学・医学部・非常勤助教

研究者番号：70638197

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 11,000,000円

渡航期間： 24ヶ月

研究成果の概要（和文）：本研究は抗がん剤抵抗性骨肉腫を対象にその抵抗性のメカニズムを解明し、新規治療法を開発することを目的として、ゲノムレベルでの網羅的な遺伝子発現解析を行った。解析にあたってはチロシンキナーゼや細胞周期関連遺伝子に注目した。骨肉腫は遺伝子背景の不均一性の強い腫瘍であることが知られており、全例に共通する遺伝子変異は見られなかったが、一部の症例ではチロシンキナーゼであるPDGFRAやKDR発現異常が存在し、これらを標的とするチロシンキナーゼ阻害剤は新規治療標的となる可能性が考えられた。またP53・CDKN2A・CDKN2Bをはじめとする複数の細胞周期関連遺伝子が骨肉腫の予後に関連することを明らかとした。

研究成果の学術的意義や社会的意義

骨肉腫は小児の四肢に発生する原発性悪性骨腫瘍の代表的疾患である。骨肉腫の治療成績は、抗癌剤治療や広範切除術の導入により改善されてきた。しかし抗癌剤の効果不十分な症例の予後は依然として不良である。また治療抵抗性の骨肉腫に対する治療法もいまだに確立されていない。本研究では、骨肉腫の一部の症例で、治療標的となり得るチロシンキナーゼの遺伝子異常を同定した。また細胞周期関連遺伝子が骨肉腫の予後に関与することを明らかとした。これらのバイオマーカーや遺伝子背景に基づいた個別化医療の推進により、骨肉腫の予後改善が期待される。

研究成果の概要（英文）：Osteosarcoma is the most common primary malignancy in bone. Patients who respond poorly to chemotherapy are at higher risk of adverse prognosis. The molecular basis for such poor prognosis remains unclear. Thus, we tried to identify novel therapeutic targets for refractory osteosarcomas using gene expression analysis. Although osteosarcoma is generally known as a tumor with strong heterogeneity, tyrosine kinases PDGFRA, KDR and c-kit were aberrantly expressed in some cases. These tyrosine kinases may be candidates for novel therapeutic targets. In addition, aberrantly expression of several cell cycle-related genes, including TP53, CDKN2A, and CDKN2B, were associated with poor prognosis in osteosarcoma patients. Our findings indicate the possible application of predictive biomarkers and novel therapeutic targets.

研究分野：整形外科学

キーワード：骨肉腫 治療抵抗性 バイオマーカー 個別化医療 チロシンキナーゼ

1. 研究開始当初の背景

骨肉腫は小児や若年成人の四肢に発生する原発性悪性骨腫瘍の代表的疾患である。骨肉腫の治療成績は、1970年代に導入された抗癌剤治療や広範切除術の導入により改善されてきた。骨肉腫においては、薬理作用の異なる複数の抗癌剤による治療が標準的に行われているが、抗癌剤の効果不十分な症例の予後は依然として不良である。抗癌剤奏効症例の5年生存率は90%であるのに対して、抗癌剤抵抗性の症例では5年生存率が30-50%以下で予後不良と言われており、抗癌剤の奏効性は骨肉腫において最も重要な予後規定因子である(文献1)。しかし、現段階では抗癌剤の治療効果を事前に予測する有用な手段がないため、全ての患者に対して画一的な治療を行わざるを得ず、また治療抵抗性の骨肉腫に対する治療法はいまだに確立されていない。骨肉腫の予後をさらに改善するためには、治療開始前に予後や治療奏効性を予測するバイオマーカーや、治療抵抗性メカニズムの解明、および遺伝子背景に基づいた個別化医療の確立が必要と考えられる。

そこで我々は現在までに骨肉腫の化学療法抵抗性を予測するバイオマーカーの開発を行ってきた。そしてプロテオーム解析やmiRNA発現解析の手法を用いて、化学療法抵抗性を規定する分子を同定した(文献2, 文献3)。本研究では、骨肉腫の治療抵抗性や予後に関わる分子をさらに網羅的に解析をするために、ゲノムレベルでアプローチし、さらに新規治療標的としての可能性を検討した。ゲノムレベルの網羅的解析には次世代シーケンサー(NGS)やnanoString社のnCOUNTER systemを用い、特に薬剤抵抗遺伝子やチロシンキナーゼ(Tyrosine kinase: TK)、細胞周期関連遺伝子の発現異常に注目して解析を行った。

チロシンキナーゼについては、近年、骨軟部腫瘍領域においても pazopanib という TK 阻害剤が臨床で使われるようになり注目されている。しかしその適応は悪性軟部腫瘍に限られ、悪性骨腫瘍である骨肉腫に対する効果はいまだに明らかではない。また、TK は様々な悪性腫瘍において腫瘍悪性化に関わる分子として報告されているが、骨肉腫における TK の発現を網羅的に調査した報告はない。そこで我々は、ヒトで発現が報告される全 90 種類の TK の発現を網羅的に解析し、骨肉腫における pazopanib の有効性およびその他の TK 阻害剤の骨肉腫への適応についての検討をすすめた。また、骨肉腫では P53 遺伝子や Rb 遺伝子の不活性化が知られているため、細胞周期関連遺伝子に関しても予後との関連を中心に解析した。

このように本研究は、ゲノムレベルで骨肉腫の抗がん剤奏効性や予後に関わる分子の同定、抗がん剤奏効性に関わるメカニズムの解明、新規治療標的の開発を目指した。同定したバイオマーカーにより予後や治療奏効性を事前に予測し、遺伝子発現異常などの分子病態を把握した上で、個々に最適化された治療を提供することにより、骨肉腫の予後改善に寄与することが可能となる。

2. 研究の目的

骨肉腫は若年者に好発する悪性骨腫瘍である。化学療法の導入により骨肉腫の予後は改善されてきたが、一方で化学療法抵抗性の骨肉腫患者の予後は依然として不良で臨床的な問題点となっている。現在までに我々は骨肉腫の化学療法抵抗性を規定する分子をタンパク質・マイクロRNA レベルで解析してきた。本研究では、さらに網羅的に骨肉腫の予後や治療抵抗性に関わる分子を同定するために、ゲノムレベルでの解析を行い、さらに細胞株モデルを作成し、骨肉腫の予後や治療奏効性に関わる分子病態の解明を目指すと共に、化学療法抵抗性の骨肉腫に対する新規治療標的としての可能性を検討する。バイオマーカーにより治療抵抗性の骨肉腫を選定し、その分子病態に応じた新たな治療戦略を策定することにより、骨肉腫の治療成績の向上が期待される。

3. 研究の方法

(1)骨肉腫臨床検体を用いた遺伝子発現解析

骨肉腫の遺伝子発現および発現異常を網羅的に解析するために、骨肉腫の臨床検体より DNA・RNA を抽出し、次世代シーケンサーおよび nanoString 社の nCounter system を用いて、解析した。遺伝子発現解析には主に 468 のがん関連遺伝子をターゲットとし、腫瘍プロファイリングを作成、さらにそれらのがん関連遺伝子の変異やコピー数変化、融合遺伝子やプロモーター領域上の変異について解析した。

遺伝子発現解析にあたっては、特にチロシンキナーゼや細胞周期関連遺伝子に注目した。チロシンキナーゼはタンパク質を構成するアミノ酸の一つであるチロシンにリン酸を付加する機能を持つ酵素で、プロテインキナーゼの一種である。細胞の増殖や分化などに関わる信号の伝達に重要な役割を果たし、この遺伝子に発現異常が起こり、チロシンキナーゼが異常に活性化すると、細胞が異常に増殖し、癌化の一因となる。特に受容体型のチロシンキナーゼ (RTK) は細胞表面で働く受容体タンパクの一つで、細胞外の特異的なリガンドへの結合領域と細胞内のチロシンキナーゼ領域が細胞膜を貫通して結合する構造を持つ。RTK を介したシグナル伝達では MAPK 経路や PI3K 経路など様々な腫瘍な細胞内シグナル伝達を活性化するため、その活性を阻害する低分子化合物の開発が進んでいる。先行研究において、骨肉腫で VEGF や PDGF などの RTK の発現異常を認めることを同定しているが、本研究ではさらに検体数を増やして、RTK の発現状況を解析した。また一方で、骨肉腫ではほぼすべての骨肉腫において Rb 遺伝子や p53 遺伝子の不活化が起こっていることが報告される (文献 4)。Rb 遺伝子は細胞周期の調節に関与し、特に G1 期における細胞周期の回転を抑制する。p53 遺伝子は DNA 修復や細胞増殖停止、アポトーシスなどの細胞増殖サイクルの抑制を制御する機能を持つがん抑制遺伝子である。本研究では Rb や p53 を含め、その他の細胞周期遺伝子にも注目し発現解析した。

(2)骨肉腫細胞株を用いた機能解析

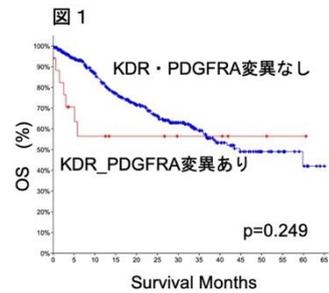
チロシンキナーゼ阻害剤を始めとする小分子化合物が利用可能である遺伝子発現異常に対しては、骨肉腫細胞株を用いた細胞モデルを作成し、新規治療標的としての有用性を検討した。細胞モデル作成に際しては、同定した遺伝子のプラスミドをレンチウィルスベクターに組み込み、骨肉腫細胞株 (HOS, U2OS) に導入し、恒常的に強制発現させた。この細胞モデルを用いて、細胞の増殖能や薬剤奏効性、小分子化合物の抗腫瘍効果についての解析を行った。

4. 研究成果

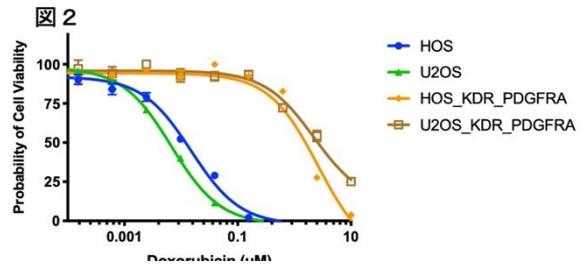
(1)骨肉腫におけるチロシンキナーゼ遺伝子変異

骨肉腫臨床検体を用いた遺伝子発現解析では、骨肉腫の臨床検体 71 検体を用いて遺伝子発現プロファイルを作成した。骨肉腫は遺伝子発現の不均一性 (Heterogeneity) の強い腫瘍であることが一般的に知られている。本解析においても、すべての症例で共通した遺伝子変異はみられなかった。しかし、20%の症例で、KDR、PDGFRA、KIT の発現増幅 (amplification) を認めた。これらの遺伝子は同一の染色体上 (4q12) に局在しており、同一症例においてクラスターを形成して発現が上昇している傾向がみられた。KDR (FLK1 : VEGFR : VEGFR2) はヒト内皮細胞から単離された成長因子受容体チロシンキナーゼで内皮増殖と分化に重要な役割を果たすことが知られている。一般的に KDR 阻害剤は腫瘍退縮を誘導し、転移能の減少を示すとされている。PDGFRA は血小板由来成長因子で主に間葉系細胞の遊走および増殖などの調節に関与する増殖因子である。KIT (c-kit) も受容体型チロシンキナーゼであり、そのリガンドである stem cell factor (SCF) が結合する事により細胞の増殖や分化を引き起こす働きがある。これらの PDGFRA や KIT 遺伝子の変異は消化管間質腫瘍 (GIST) で知られており、これらのチロシンキナーゼの活性を抑制するイマチニブが治療として確立されている。骨肉腫においても一部の症例で、これらの KDR、

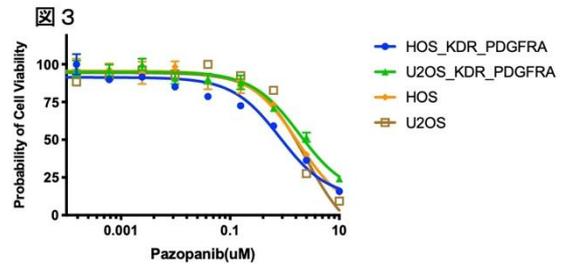
PDGFRA、KITといったチロシンキナーゼの遺伝子変異が見られることは、新規治療標的としての有用である可能性も考えられた。またこれらの遺伝子発現を認める症例では、認めない症例と比較して予後が悪い傾向が見られた(図1)。



悪性軟部腫瘍で臨床使用が可能となったチロシンキナーゼ阻害剤である pazopanib は、血管内皮増殖因子受容体 (VEGFR)、血小板由来増殖因子受容体 (PDGFR)、幹細胞因子受容体(c-kit)の3つに作用し、血管新生を阻害し抗腫瘍効果を発揮する。骨肉腫細胞株を用いた先行研究では、pazopanib の骨肉腫細胞株に対する抗腫瘍効果は確認できなかったが、KDR・PDGFRA・KITを強制発現させて骨肉腫細胞株であれば有効である可能性が考えられた。そこで、本研究では骨肉腫細胞株である HOS、U2OS を用いて、KDR・PDGFRA を強制発現させた細胞モデルを作成した。KDR と PDGFRA を強制発現させた骨肉腫細胞株においては、抗がん剤である doxorubicin に対する抵抗性が確認された(図2)。続いて、pazopanib の有効性についても MTS アッセイを行ったが、明らかな抗腫瘍効果はみられなかった(図3)。これ

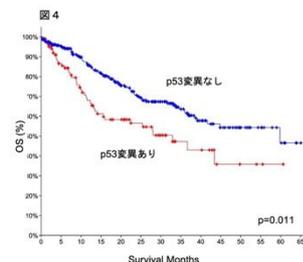


は pazopanib や bevacizumab など VEGF や PDGFR を標的とする血管新生阻害剤ががん細胞に作用するのではなく、がんの微小環境に影響を与えて間接的に抗腫瘍効果を発揮するタイプの薬剤であることが原因として考えられた。そのため、KDR・PDGFRA の遺伝子変異を持つ骨肉腫に対する pazopanib の有効性については、マウスを用いた in vivo での検討が必要である。In vitro の結果では明らかな抗腫瘍効果はみられなかったが、生体内での抗腫瘍効果は期待できる可能性がある。



(2) 骨肉腫における細胞周期関連遺伝子の発現異常

また細胞周期関連タンパク質の遺伝子変異に注目して解析をおこなってみると、p53 や CDKN2A(Cyclin-dependent kinase inhibitor 2A)、CDKN2B(Cyclin-dependent kinase inhibitor 2B)の遺伝子変異が有意に骨肉腫の予後に関与していた。p53 遺伝子は細胞内で DNA 修復や細胞増殖停止、アポトーシスなどの細胞増殖サイクルの抑制を制御し、特にがん化した細胞にアポトーシスを惹起させる。骨肉腫においては、この p53 遺伝子に Deep Deletion 変異や missense 変異が起きている症例は予後不良であった(図4)。また骨肉腫において、この p53 遺伝子を抑制的に調節する MDM2 遺伝子の amplification 変異を認める症例を約 20%の症例で認めていた。



CDKN2A は p16 とも言い、細胞周期の調整に重要な役割を果たすががん抑制遺伝子である。細胞周期の G1 期において、CDK4 と p53 を調整する。骨肉腫においてはこの CDKN2A に Deep Deletion 変異を認める症例は予後不良であった(図5)。CDKN2B は p15^{INK4b} とも言い、CDK4 または CDK6 と複合体を形成し、cyclin D による CDK キナーゼの活性化を阻害し細胞周期 G1 期の進行を阻害する。CDKN2A と同じく、骨肉腫においてはこの遺伝子の Deep Deletion 変異の症例は予後不良であった(図6)。

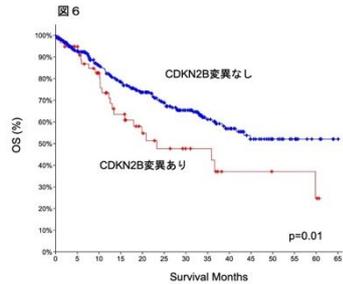
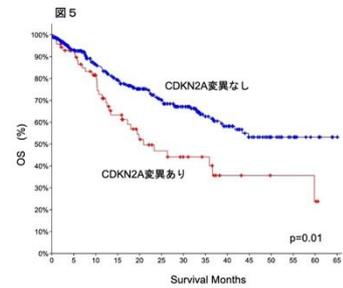
近年、このような細胞周期を治療標的とした治療法の開発が進んでいる。特に細胞分裂の制御を不能にしているサイクリン依存性キナーゼ (CDK) を阻害する CDK4/6 阻害剤などが注目されている。パルボシクリブは CDK4 と CDK6 に対して高い選択性を有する世界初の CDK4/6 阻害剤で、乳癌に対して内分泌療法との併用で臨床使用されるようになってきている。骨肉腫を始めとする骨軟部腫瘍においては、脱分化型脂肪肉腫という高悪性度軟部腫瘍において CDK4 と MDM2 の増幅を認めており、CDK4/6 阻害剤や MDM2 阻害剤の有用性が報告される(文献 5)。骨肉腫においても、一部の症例でこれらの細胞周期関連遺伝子を標的とした治療が有用な可能性がある。先行研究で同定した化学療法奏効性に関わる miR-125b や miR-100 においても、miR-125b は BAK1, MDM2, P53 に抑制的に、miR-100 は Rb に抑制的に働いており、細胞周期関連遺伝子は骨肉腫の予後や治療奏効性に密接に関連している。このように細胞周期関連遺伝子に変異を認める骨肉腫症例に対して、サイクリン依存性キナーゼ阻害剤が有効である可能性が示唆された。

(3) 骨肉腫に対する個別化医療

骨肉腫は一般的に遺伝子背景が不均一な腫瘍であることが言われていたが、本研究により、一部の症例ではチロシンキナーゼや細胞周期関連遺伝子の変異を認めることが明らかとなった。現在、骨肉腫に対しては、メソトレキセート、ドキソルビシン、シスプラチンを併用する MAP 療法が標準的治療として用いられている。しかし化学療法による毒性や合併症がしばしば問題となる。また MAP 療法の奏効しない症例はいまだに予後不良である。本研究で同定した治療奏効性や予後に関わるバイオマーカーで MAP 療法の効果を予測して、奏効性の期待できない症例に対してはチロシンキナーゼや細胞周期関連遺伝子の変異など、遺伝子背景を解析した上で、個別化・最適化された治療を提供することが重要と考えられた。

文献リスト)

- 1 . Meyers PA, Heller G, Healey JH, Huvos A, Applewhite A, Sun M, LaQuaglia M. Osteogenic sarcoma with clinically detectable metastasis at initial presentation. *J Clin Oncol*. 1993 Mar;11(3):449-53.
- 2 . Kubota D, Mukaiharu K, Yoshida A, Tsuda H, Kawai A, Kondo T. Proteomics study of open biopsy samples identifies peroxiredoxin 2 as a predictive biomarker of response to induction chemotherapy in osteosarcoma. *J Proteomics*. 2013 Oct 8;91:393-404.
- 3 . Kubota D, Kosaka N, Fujiwara T, Yoshida A, Arai Y, Qiao Z, Takeshita F, Ochiya T, Kawai A, Kondo T. miR-125b and miR-100 Are Predictive Biomarkers of Response to Induction Chemotherapy in Osteosarcoma. *Sarcoma*. 2016;2016:1390571.
- 4 .Ladanyi M, Gorlick R, Molecular pathology and molecular pharmacology of osteosarcoma, *Pediatric Pathology & Molecular Medicine*, Volume 19, 2000 - Issue 5
- 5 . Asano N, Yoshida A, Mitani S, Kobayashi E, Shiotani B, Komiyama M, Fujimoto H, Chuman H, Morioka H, Matsumoto M, Nakamura M, Kubo T, Kato M, Kohno T, Kawai A, Kondo T, Ichikawa H. Frequent amplification of receptor tyrosine kinase genes in well-differentiated/ dedifferentiated liposarcoma. *Oncotarget*. 2017 Feb 21;8(8):12941-12952



5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計3件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 窪田大介, 田邊 雄, 向井原健太, 末原義 之, 小林英介, 金子和夫
2. 発表標題 腫瘍低酸素環境を標的とした骨肉腫の新規治療法開発
3. 学会等名 第31回 日本整形外科学会基礎学術集会
4. 発表年 2016年

1. 発表者名 窪田大介
2. 発表標題 網羅的発現解析に基づく骨軟 部腫瘍のバイオマーカーの開発と新規治療法 への応用
3. 学会等名 第49回日本整形外科学会骨・軟 腫瘍学術集会
4. 発表年 2016年

1. 発表者名 窪田大介, 田邊 雄, 向井原健太, 末原義 之, 小林英介, 金子和夫
2. 発表標題 腫瘍低酸素環境を標的とした骨肉腫の新規治療法開発
3. 学会等名 第89回 日本整形外科学会学術総会
4. 発表年 2016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
主たる渡航先の主たる海外共同研究者	ラダーニ マーク (Ladanyi Marc)	メモリアルスローンケタリングがんセンター・ Pathology・Chief	