

平成 30 年 6 月 13 日現在

機関番号：32620

研究種目：研究活動スタート支援

研究期間：2016～2017

課題番号：16H07186

研究課題名(和文)「希少がん」胞巣状軟部肉腫の新規治療法開発

研究課題名(英文) Development of novel treatment for rare cancer "Alveolar soft part sarcoma"

研究代表者

向井原 健太 (Mukaihara, Kenta)

順天堂大学・医学部・非常勤助教

研究者番号：50778991

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,100,000円

研究成果の概要(和文)：希少な難治性悪性腫瘍である胞巣状軟部肉腫の新規治療法開発を目的として、腫瘍進展メカニズムに関わるとされる複数のチロシンキナーゼを抽出し、それらを標的とした薬剤であるチロシンキナーゼ阻害剤を用いて胞巣状軟部肉腫に対する抗腫瘍効果を前臨床的に検討した。その結果、CabozantinibとDasatinibが細胞レベル、マウスレベルで共に高い腫瘍抑制効果を持つことが示され、今回同定されたチロシンキナーゼが有望な治療標的であり、これらのチロシンキナーゼ阻害剤が新たな治療オプションとして臨床的に有用である可能性が示唆された。

研究成果の概要(英文)：The aim of this study is developing a novel treatment for alveolar soft part sarcoma, which is a rare malignant tumor. We identified multiple tyrosine kinases, which are related to the mechanism of tumor development. We pre-clinically examined anti-tumor effect against alveolar soft part sarcoma by using tyrosine kinase inhibitor. As a result, Cabozantinib and Dasatinib showed significant anti-tumor activity both in vitro and in vivo. These results indicate that identified tyrosine kinases in this study are promising therapeutic target and these tyrosine kinase inhibitors can be a potent new therapeutic option.

研究分野：整形外科、腫瘍

キーワード：胞巣状軟部肉腫 チロシンキナーゼ チロシンキナーゼ阻害剤 悪性骨軟部腫瘍 希少がん

### 1. 研究開始当初の背景

悪性骨軟部腫瘍の治療成績は、初診時に転移がない III 期の症例においても 5 年生存率が 50% と依然不良である。胞巣状軟部肉腫 (Alveolar Soft part Sarcoma 以下 ASPS) は若年者に発生する悪性軟部腫瘍の一つであり、化学療法や放射線療法に強い抵抗性を示し [1]、手術不可能な症例の予後は非常に悪い [2]。また、臨床的に手術適応のない症例に加え、手術適応症例に関しても腫瘍切除後の脳転移が多いなど治療に難渋する腫瘍である [3]。そのため早期の新規治療法の開発が強く望まれている。近年、チロシンキナーゼは様々な悪性腫瘍においてその発現異常が報告されており、その阻害剤の適応が疾患の予後改善に大きく貢献してきた [4]。Pazopanib は近年 ASPS を含む軟部肉腫に対する治療薬として唯一承認されたチロシンキナーゼ阻害剤であり [5]、その治療効果を示す臨床報告が散見されるが [6, 7]、細胞レベルの作用機序は不明のままである。また ASPS においても疾患特異的な ASPL/TFE 融合遺伝子の発現がチロシンキナーゼの発現異常に關与することがわかってきている [8]。しかしながら新規治療法の開発には至っていない。

申請者は新規治療法の開発にあたり、チロシンキナーゼに注目したが、ASPS では疾患の稀少性故に、他の悪性腫瘍で行われているような大規模研究が困難であり、商業的にも新薬の開発は望めない状況にある。そのため早期の新規治療法開発にあたっては現在までに多数存在する既存のチロシンキナーゼ阻害剤の ASPS への適応拡大を目指すことが ASPS の腫瘍的特徴や社会的背景を踏まえると最良の方法と考える。申請者は本研究において、ASPS の治療標的となり得るチロシンキナーゼを抽出し、それらを標的とする複数のチロシンキナーゼ阻害剤の抗腫瘍効果を *in vitro*、*in vivo* レベルで検証する。

### 2. 研究の目的

ASPS に対するチロシンキナーゼ阻害剤による治療法開発を目指し、新規治療標的となりうるチロシンキナーゼを同定し、それらを標的とする阻害剤の有用性を検討・評価することを目的とする。

### 3. 研究の方法

#### (1) 細胞株

ヒト ASPS 患者由来の ASPS-KY 細胞を用いた。ASPL-TFE3 融合遺伝子の発現は検証済みである。細胞は D-MEM 培地に 10% ウシ血清 (FBS) を添加したものを扱い、5% CO<sub>2</sub> 存在下で培養した。

#### (2) チロシンキナーゼ阻害剤

以下の 3 種類のチロシンキナーゼ阻害剤を *in vitro* もしくは *in vivo* 実験に使用した。Pazopanib, Dasatinib (Selleck Chemicals

Houston, TX, USA), Cabozantinib (ChemScene, Monmouth Junction, NJ, USA)

#### (3) 細胞増殖アッセイ

腫瘍細胞を 96 穴プレートにそれぞれ  $3 \times 10^4$  個/穴ずつ播種して生着させた。24 時間後に異なる濃度のチロシンキナーゼ阻害剤を各穴に投与し、その後 0、48 時間、96 時間培養後の細胞に Cell Counting Kit-8 (Dojindo Laboratories, Kumamoto, Japan) を追加投与しマイクロプレートリーダーを用いて 450nm で吸光度を測定し、経時的な細胞増殖能を評価した。

#### (4) 細胞浸潤アッセイ

24 穴のマトリゲル浸潤アッセイ用チャンバプレート (BD Biosciences, Bedford, MA, USA) を用いて、上層インサートに  $2 \times 10^5$  個の細胞を播種し、下層を FBS 入り培地に異なる濃度のチロシンキナーゼ阻害剤を投与したウェルにインサートを設置し 48 時間培養した。インサートのマトリゲル裏面に浸潤した細胞を Diff-Quick reagent (Sysmex International Reagents, Kobe, Japan) を用いて染色し、浸潤細胞数を顕鏡的にカウントした。

#### (5) リン酸化反応ウェスタンブロット

腫瘍細胞を異なる濃度のチロシンキナーゼ阻害剤投与下で 2 時間培養した。さらに Cabozantinib 投与群の細胞は 20 ng/mL HGF (R&D Systems, Minneapolis, MN, USA) でリガンド刺激を加えた。阻害剤投与後の細胞ペレットからタンパク質を抽出した。抽出したタンパク質は SDS-PAGE ゲルを用いて泳動分離し、ニトロセルロース膜に転写した。以下の抗体を用いて一次抗体標識を行った。MET, p-(Tyr1234/1235)-MET, SRC, p-(Tyr416)-SRC, AKT, p-(Ser473)-AKT, ERK1/2, p-(Thr202/Tyr204)-ERK1/2, FAK, p-(Tyr397)-FAK (Cell Signaling Technologies), GAPDH (Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, CA, USA)。

一次抗体反応後 Tris-EDTA バッファーを用いて 3 回洗浄し Horseradish peroxidase を用いて二次抗体反応を行った。化学発光法 (ECL Prime; GE Healthcare Biosciences) によりタンパク質発現シグナルを ImageQuant LAS 4000 (GE Healthcare Biosciences) で検出した。

#### (6) 動物モデル

全ての動物実験は順天堂大学動物実験倫理ガイドラインに基づいて行った。 $5 \times 10^6$  個の腫

瘍細胞をマトリゲルと1:1で混合し、5-6週齢のBALB/cヌードマウス(CREATECH, Shizuoka, Japan)の背部に皮下注射し担がんマウスモデルを作成した。腫瘍径が50-150mm<sup>3</sup>に達した時点でチロシンキナーゼ阻害剤非投与群、15mg/kgチロシンキナーゼ投与群、30mg/kgチロシンキナーゼ投与群の3群に分け、5日/週の計4週間チロシンキナーゼ阻害剤を経口投与した。腫瘍径と体重は1週間毎に計測した。4週投与後に安楽死直後のマウスから腫瘍塊を摘出した。

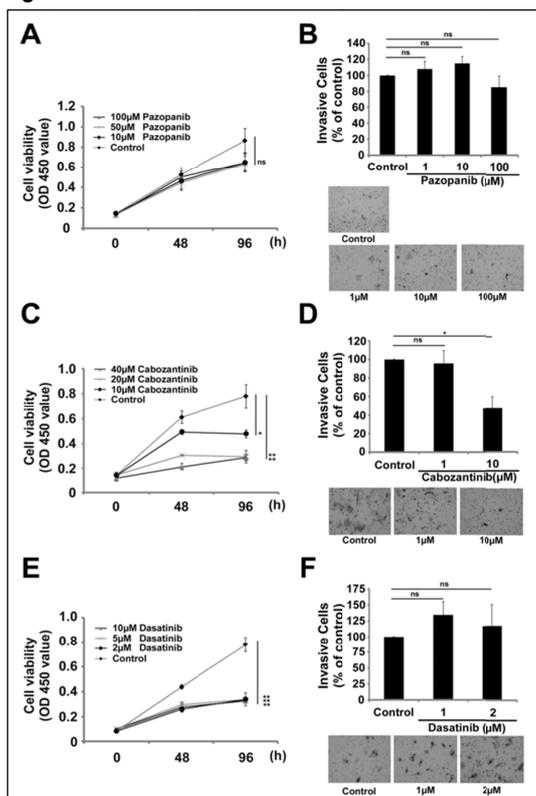
#### 4. 研究成果

(1) ASPS細胞に対するPazopanib, Cabozantinib, Dasatinibの*in vitro*抗腫瘍効果

細胞増殖アッセイではPazopanib, Cabozantinib, Dasatinibの全てにおいて濃度依存性に細胞増殖が抑制された(Figure 1, A, C, E)。特記すべきことに40μM Cabozantinib投与下と、10μM Dasatinib投与下では非投与下に比べ60%以上の細胞増殖抑制効果が認められたが、Pazopanibでは100μM投与下においても非投与下に比べ30%以下の増殖抑制効果しか認めなかった。細胞浸潤アッセイでは10μM Cabozantinib投与下で非投与下に比べ50%以上の浸潤抑制効果を示したが、一方Pazopanib, Dasatinib投与下では有意な浸潤抑制効果を示さなかった(Figure 1, B, D, F)。

これらの結果に基づいて、CabozantinibとDasatinibがPazopanibに比べてより高いASPS細胞機能抑制効果を有することがわかった。

Figure 1

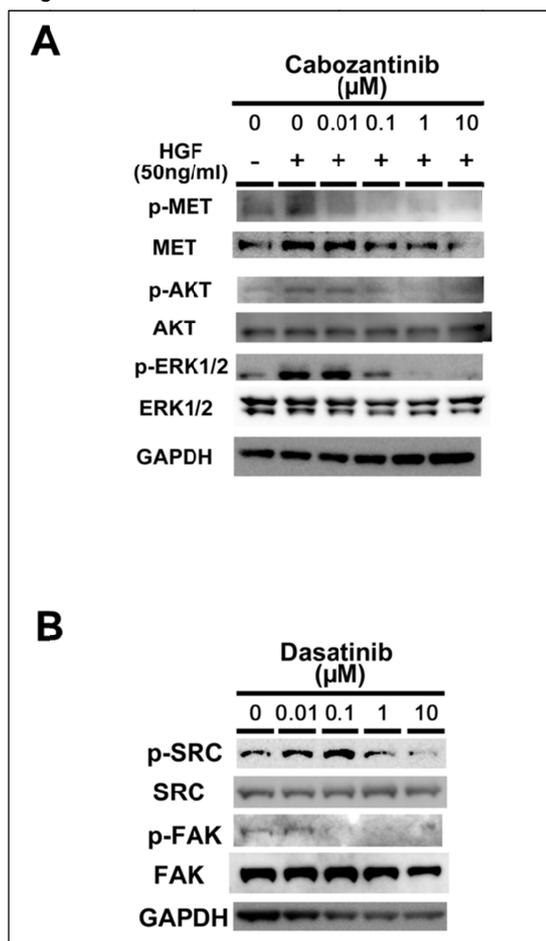


(2) Cabozantinibによるc-Met活性化とDasatinibによるSRC活性化

ASPSにおいて新規治療標的となりうるチロシンキナーゼを同定するため、Cabozantinibの主要標的チロシンキナーゼの一つであるc-Metに着目し、Cabozantinib投与がc-Metリン酸化に影響を与えるかどうかをウェスタンブロットで調べた。0.01-10μMのCabozantinib投与下ではHGF刺激によって発現したc-Metのリン酸化が濃度依存的に抑制された。またc-Metの下流因子であるAKT, ERKのリン酸化も濃度依存的に抑制された(Figure 2, A)。このことからCabozantinibの抗腫瘍効果の一つの機序としてc-Metのリン酸化を介して始まる一連の経路を抑制することで発揮されることがわかった。

次にDasatinibの主要標的チロシンキナーゼの一つであるSRCに着目し、Cabozantinibと同様のウェスタンブロット法でSRCのリン酸化発現を調べた。Dasatinib投与下ではSRCのリン酸化が抑制される傾向にあることがわかった。またSRCの下流因子であるFAKのリン酸化も抑制された(Figure 2, B)。これらのことからDasatinibの抗腫瘍効果が部分的にSRCのリン酸化経路抑制を介することがわかった。

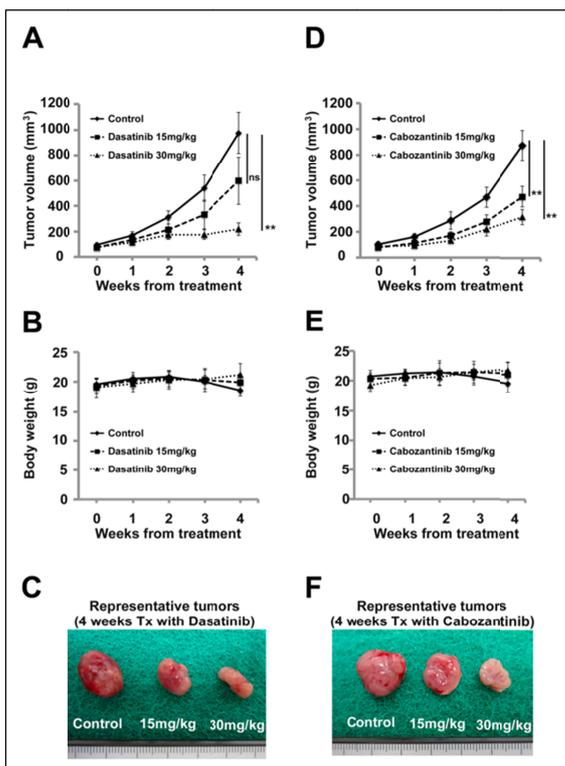
Figure 2



(3) CabozantinibとDasatinibの*in vivo*抗腫瘍効果

生体内での Cabozantinib と Dasatinib の抗腫瘍効果を調べるために ASPS マウスモデルを用いて投与群と非投与群の腫瘍径を比較計測した。Cabozantinib 投与4週後の比較では非投与群に比べ 15mg/kg、30mg/kg 投与群では有意な腫瘍増大抑制効果が認められた (Figure 3 D, F) Dasatinib 投与4週後の比較では非投与群に比べ 30mg/kg 投与群では有意な腫瘍増大抑制効果が認められたが、15mg/kg 投与群では有意な腫瘍増大抑制効果が認められなかった (Figure 3 A, C)。

Figure 3



本研究では Cabozantinib と Dasatinib が ASPS 細胞の増殖能もしくは浸潤能を阻害することによって抗腫瘍効果を示すこと、またそれらの効果は部分的に c-Met, SRC のリン酸化阻害を介することがわかった。この研究結果によって c-Met, SRC が ASPS における有望な新規治療標的であることが示唆された。また臨床的には ASPS 患者、特に pazopanib 治療抵抗性の患者に対して Cabozantinib, Dasatinib が新たな治療オプションとして有用である可能性が示唆された。

#### 参考文献

[1] Pennacchioli E, Fiore M, Collini P, Radaelli S, Dileo P, Stacchiotti S, et al. Alveolar soft part sarcoma: clinical presentation, treatment, and outcome in a series of 33 patients at a single institution. *Ann Surg Oncol*. 2010; 17(12):3229-33.  
 [2] Lieberman PH, Brennan MF, Kimmel M, Erlandson RA, Garin-Chesa P, Flehinger BY.

Alveolar soft-part sarcoma. A clinico-pathologic study of half a century. *Cancer*. 1989; 63(1):1-13.

[3] Portera CA Jr., Ho V, Patel SR, Hunt KK, Feig BW, Respondek PM, et al. Alveolar soft part sarcoma: clinical course and patterns of metastasis in 70 patients treated at a single institution. *Cancer*. 2001; 91 (3):585-91.

[4] Laird AD, Cherrington JM. Small molecule tyrosine kinase inhibitors: clinical development of anticancer agents. *Expert Opin Investig Drugs*. 2003; 12(1):51-64.

[5] Ranieri G, Mammi M, Donato Di Paola E, Russo E, Gallelli L, Citraro R, et al. Pazopanib a tyrosine kinase inhibitor with strong anti-angiogenetic activity: a new treatment for metastatic soft tissue sarcoma. *Crit Rev Oncol Hematol*. 2014; 89(2):322-9.

[6] Funakoshi Y, Okada M, Kawata S, Ito N, Abe K, Moriuchi H. The Significant Effects of Pazopanib on Multiple Pulmonary Metastatic Lesions of Alveolar Soft Part Sarcoma: A Case Report. *Journal of pediatric hematology/oncology*. 2017.

[7] Read WL, Williams F. Metastatic Alveolar Soft Part Sarcoma Responsive to Pazopanib after Progression through Sunitinib and Bevacizumab: Two Cases. *Case reports in oncology*. 2016; 9(3):639-43.

[8] Tsuda M, Davis IJ, Argani P, Shukla N, McGill GG, Nagai M, et al. TFE3 fusions activate MET signaling by transcriptional up-regulation, defining another class of tumors as candidates for therapeutic MET inhibition. *Cancer Res*. 2007; 67(3):919-29.

#### 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1件)

Mukaihara, Tanabe Y, Kubota D, Akaike K, Hayashi T, Mogushi K, Hosoya M, Sato S, Kobayashi E, Okubo T, Kim Y, Kohsaka S, Saito T, Kaneko K, Suehara Y.

Cabozantinib and dasatinib exert anti-tumor activity in alveolar soft part sarcoma. 査読有り

PLoS One. 2017 Sep 25;12(9)

doi: 10.1371/journal.pone.0185321.

〔学会発表〕(計2件)

(1) 第47回日本整形外科学会 骨・軟部腫瘍学術集会、大阪、2014年7月  
 胞巣状軟部肉腫細胞株に対するチロシンキナーゼ阻害剤の抗腫瘍効果の検討

向井原 健太、窪田 大介、小林 英介、末  
原 義之、金子 和夫  
(2) 第 29 回日本整形外科学会基礎学術集  
会、鹿児島、2014 年 10 月  
胞巣状軟部肉腫細胞株に対するチロシンキ  
ナーゼ阻害剤の抗腫瘍効果の検討  
向井原 健太、窪田 大介、小林 英介、末  
原 義之、金子 和夫

〔図書〕(計 0 件)

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

向井原 健太 (MUKAIHARA, Kenta)  
順天堂大学・医学部・非常勤助教  
研究者番号：50778991