

令和 4 年 6 月 20 日現在

機関番号：32620

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2017～2021

課題番号：17K08730

研究課題名(和文) 軟部肉腫におけるキナーゼ阻害剤に対する抵抗性の機序の解明

研究課題名(英文) Molecular mechanism of resistance to tyrosine kinase receptor in soft tissue sarcoma

研究代表者

齋藤 剛 (Saito, Tsuyoshi)

順天堂大学・医学部・准教授

研究者番号：80439736

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,700,000円

研究成果の概要(和文)：融合遺伝子の検出にはDNAよりもRNAを用いた解析が望ましいことも報告されているため、RNAを用いてチロシンキナーゼ受容体をコードする遺伝子の不均衡発現を観察することにより、チロシンキナーゼ受容体を含む融合遺伝子形成の有無を探索し、肉腫ではほとんど報告のないROS1融合遺伝子を平滑筋肉腫で、さらにはNTRK3融合遺伝子を有する骨平滑筋肉腫を発見した。分子標的治療薬に対する著効例とその他の抵抗性を示す症例との間での遺伝子・タンパク質発現の変化を比較したところ、pazopanib著効例ではGLI1/CDK4の高発現(遺伝子増幅を伴う)があり、遺伝子増幅がないことを見出した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

骨軟部肉腫ではこれまでに融合遺伝子腫瘍が存在することはわかってきたが、肺腺癌のような直接の分子治療標的となるようなものはなく、それゆえこれまで治療に難渋していたが、今回の研究成果により骨軟部肉腫においても有効な治療標的となりうる新規の融合遺伝子が発見され、今後も探索の方法を工夫することにより、これまで思っていた以上の頻度で肉腫においても同様の遺伝子異常が発見される可能性があるという意味で大きな成果である。また、これらの治療には治療抵抗性・耐性の問題が切り離せないが、それらに影響を与える遺伝子異常を見つげられたことで、臨床的な治療戦略にも貢献すると考えられる。

研究成果の概要(英文)：We found a leiomyosarcoma of soft tissue with ROS1 fusion and a leiomyosarcoma of bone with NTRK3 fusion by the combination of immunohistochemistry and imbalanced gene expression assay using RNA.

Gene expression profiles were compared between sarcoma samples treated by multi-kinase inhibitor, pazopanib. Pazopanib targets including PDGFRA, PDGFRB, vascular endothelial growth factor receptor (VEGFR)1-3, and stem cell factor receptor (KIT). The mRNA expression of GLI1 and CDK4 was significantly higher in patient's sarcoma sample showing complete response (CR) to pazopanib. Furthermore, the amplification of receptor tyrosine kinase genes such as PDGFRA and VEGFRs was not observed in a patient with CR and the presence of amplification of these genes was closely associated with poor response.

研究分野：病理学

キーワード：sarcoma fusion gene molecular target therapy

1. 研究開始当初の背景

軟部肉腫に対しても tyrosine kinase inhibitor (TKI) である pazopanib の治療適応が開始されたが、文献的には散発性に奏功したという報告をみるに留まっている。この理由としては骨軟部肉腫では GIST や肺癌等と異なり receptor tyrosine kinase (RTK) の変異・融合遺伝子の形成がほとんど認められないことであるとも考えられる。しかしながら、散発性の奏功例がある一方、奏功性に関連する因子も依然明らかではない。

2. 研究の目的

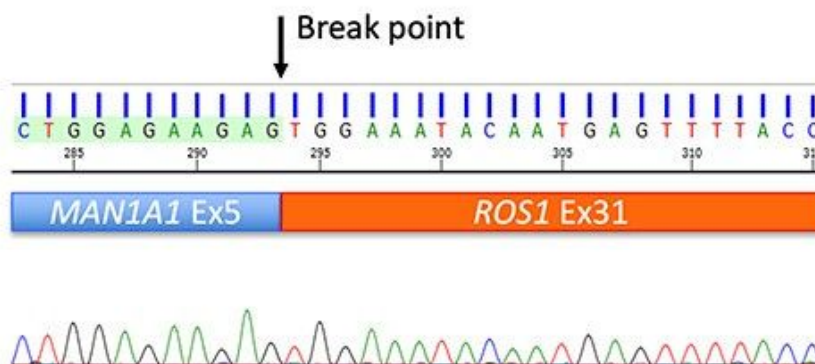
骨軟部肉腫における TKI 奏功例の遺伝子発現の状態・遺伝子変異・増幅の有無を検索することにより、骨軟部肉腫における TKI 奏功性に関与する因子の探索を行う。また、RTK を含む融合遺伝子陽性肉腫がほとんどみられなこともこのような検討を困難にしており、そのような腫瘍を新規に同定することも目指した。

3. 研究の方法

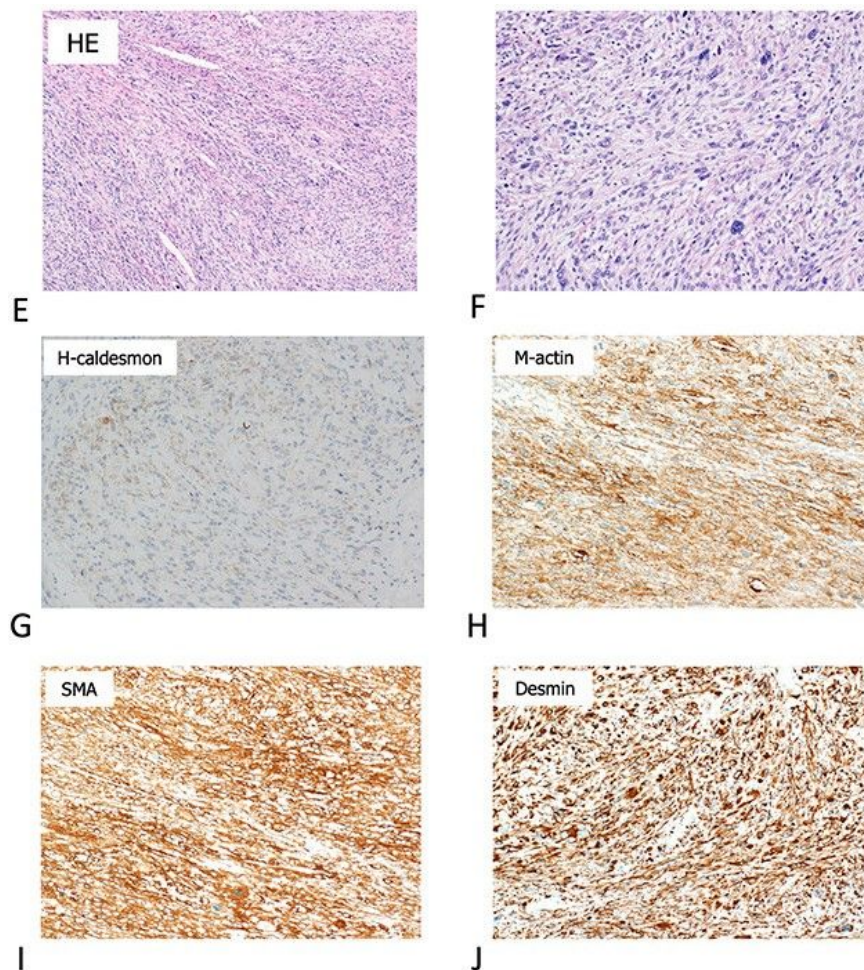
TKI である pazopanib に奏功を示した軟部肉腫を経験したことから、この腫瘍の遺伝子発現・変異・増幅の状態を、治療効果を示さない症例のものとは比べた。また、骨軟部肉腫の FFPE 検体より抽出した RNA を用いて、チロシンキナーゼ受容体をコードする遺伝子を多数含んだパネルを用いて、遺伝子不均衡発現の有無を検索し、それらを含む融合遺伝子の形成の有無を検索した。スクリーニング陽性となった症例には、RNA シークエンスを行い、融合遺伝子の有無を調べ、それらを RT-PCR にて確認した。また、チロシンキナーゼ受容体を含む各種免疫染色を行った。

4. 研究成果

融合遺伝子の検出には DNA よりも RNA を用いた解析が望ましいことも報告されているため、RNA を用いてチロシンキナーゼ受容体をコードする遺伝子の不均衡発現を観察することにより、チロシンキナーゼ受容体を含む融合遺伝子形成の有無を探索し、肉腫ではほとんど報告のない *ROS1* 融合遺伝子 (*MAN1A1-ROS1*: Suehara Y, Saito T et al. Clin Orthop Relat Res 2021) を平滑筋肉腫で同定した (下図)。さらには *NTRK3* 融合遺伝子を有する骨平滑筋肉腫を発見した (Manuscript in preparation)。



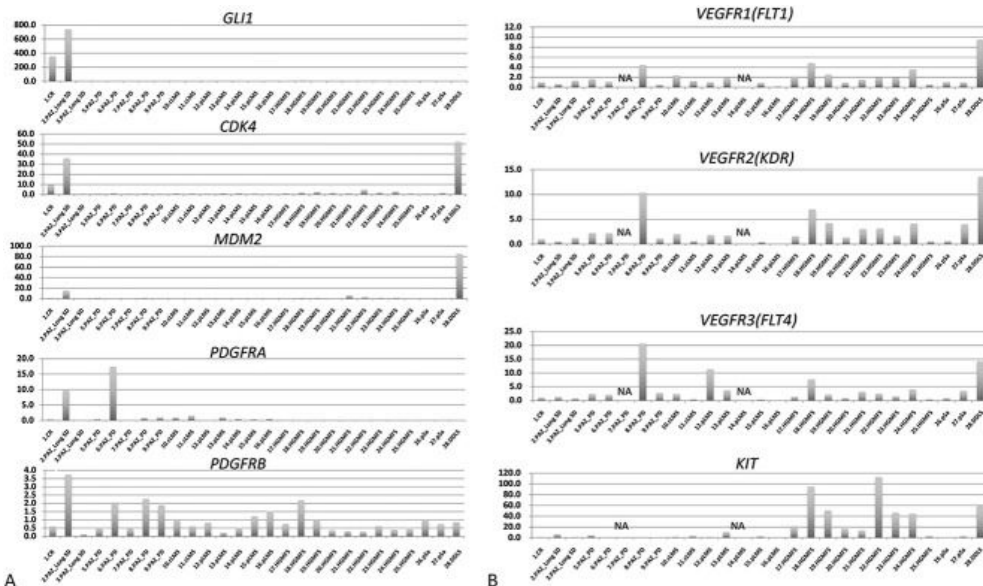
上図：RT-PCR により、*MAN1A1-ROS1* 融合遺伝子が検出された。



上図：ROS1 融合遺伝子陽性肉腫の病理組織像。異型の強い紡錘形腫瘍細胞の束状増殖を認める。腫瘍細胞は免疫染色で、筋原性マーカーに強陽性を示した。

また、*LMNA-NTRK1* 融合遺伝子陽性の小児軟部肉腫の再発例を経験した (Kohsaka S, Saito T et al. Human Pathol, 2017) が、この腫瘍は NTRK 腫瘍の選択的阻害剤である Larotrectinib により腫瘍が完全に消失した。この腫瘍は *LMNA-NTRK1* 融合遺伝子以外に遺伝子変異がほとんどみられなかった。

一方、分子標的治療薬に対する著効例とその他の抵抗性を示す症例との間での遺伝子・タンパク質発現の変化を比較したところ、pazopanib 著効例では *GLI/CDK4* の高発現（遺伝子増幅を伴う）があり、かつ receptor tyrosine kinase (RTK) の遺伝子増幅がないことを見出した (Suehara Y, Saito T. Clin Ortho Relat Res 2020)。



図：(A) Pazopanib 奏功(CR)例(1番左)および長期維持症例(左から2番目)では、GLI1およびCDK4の高発現を認める。一方、pazopanibが標的とするtyrosine kinase受容体の発現もこの2例では総じて低いことがわかる。

将来の研究への展望：

骨軟部肉腫ではこれまでに融合遺伝子腫瘍が存在することはわかっていたが、肺腺癌のような直接の分子治療標的となるようなRTKを含むものはほとんどなく、それゆえこれまで治療に難渋していたが、今回の研究により骨軟部肉腫においても有効な治療標的となりうるRTKを含む新規の融合遺伝子が発見された。今後も探索の方法を工夫することにより、これまで思っていた以上の頻度で肉腫においても同様の遺伝子異常が発見される可能性があるという意味で大きな成果である。これらのRTKを含む融合遺伝子陽性肉腫に対するTKIの治療効果を知るにはまだまだ症例の蓄積が必要であるが、この方法論の拡大によってさらなる症例の同定が見込まれる。また、これらの治療には治療抵抗性・耐性の問題が切り離せないが、それらに影響を与える遺伝子異常を見つけられたことで、臨床的な治療戦略にも貢献すると考えらえる。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計12件（うち査読付論文 12件／うち国際共著 1件／うちオープンアクセス 7件）

| | |
|--|-------------------------|
| 1. 著者名 Hasegawa N, Takeda Nakamura I, Ueno T, Kojima S, Kawazu M, Akaike K, Okubo T, Takagi T, Suehara Y, Hayashi T, Saito T, Kaneko K, Mano H, Kohsaka S. | 4. 巻 9 |
| 2. 論文標題 Detection of circulating sarcoma tumor cells using a microfluidic chip-type cell sorter. | 5. 発行年 2019年 |
| 3. 雑誌名 Sci Rep. | 6. 最初と最後の頁 20047 |
| 掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1038/s41598-019-56377-z | 査読の有無 有 |
| オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難 | 国際共著 - |
| 1. 著者名 Kato S, Fujimura J, Nozaki Y, Yamaguchi S, Takagi T, Hayashi T, Saito T, Henry D, Ku N, Suehara Y. | 4. 巻 46 |
| 2. 論文標題 A Case of Pediatric Soft Tissue Sarcoma with LMNA-NTRK1 Gene Fusion Treated with Larotrectinib under Single Patient Expanded Access System | 5. 発行年 2019年 |
| 3. 雑誌名 Gan To Kagaku Ryoho | 6. 最初と最後の頁 1595-1597 |
| 掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） なし | 査読の有無 有 |
| オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難 | 国際共著 - |
| 1. 著者名 Suehara Y, Okubo T, Kurihara T, Hayashi T, Kohsaka S, Kazuno S, Sano K, Hasegawa N, Miura Y, Akaike K, Kim Y, Takamochi K, Takahashi F, Ueno T, Kaneko K, Saito T. | 4. 巻 13 |
| 2. 論文標題 Protein Expression Profiles Corresponding to Histological Changes with Denosumab Treatment in Giant Cell Tumors of Bone. | 5. 発行年 2019年 |
| 3. 雑誌名 Proteomics Clin Appl | 6. 最初と最後の頁 e1800147 |
| 掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1002/prca.201800147 | 査読の有無 有 |
| オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難 | 国際共著 - |
| 1. 著者名 Kohsaka S, Tatsuno K, Ueno T, Nagano M, Shinozaki-Ushiku A, Ushiku T, Takai D, Ikegami M, Kobayashi H, Kage H, Ando M, Hata K, Ueda H, Yamamoto S, Kojima S, Oseto K, Akaike K, Suehara Y, Hayashi T, Saito T, et.al | 4. 巻 110 |
| 2. 論文標題 Comprehensive assay for the molecular profiling of cancer by target enrichment from formalin-fixed paraffin-embedded specimens. | 5. 発行年 2019年 |
| 3. 雑誌名 Cancer Sci. | 6. 最初と最後の頁 1464-1479 |
| 掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1111/cas.13968 | 査読の有無 有 |
| オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難 | 国際共著 - |

| | |
|---|---------------------------|
| 1. 著者名 Ishii M, Suehara Y, Sano K, Kohsaka S, Hayashi T, Kazuno S, Akaike K, Mukaihara K, Kim Y, Okubo T, Takamochi K, Takahashi F, Kaneko K, Saito T. | 4. 巻 9(101) |
| 2. 論文標題 Proteomic signatures corresponding to the SS18/SSX fusion gene in synovial sarcoma. | 5. 発行年 2018年 |
| 3. 雑誌名 Oncotarget | 6. 最初と最後の頁 37509-37519 |
| 掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.18632/oncotarget.26493. | 査読の有無 有 |
| オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である) | 国際共著 - |

| | |
|--|---------------------------|
| 1. 著者名 Suehara Y, Akaike K, Mukaihara K, Kurisaki-Arakawa A, Kubota D, Okubo T, Mitomi H, Mitani K, Takahashi M, Toda-Ishii M, Kim Y, Tanabe Y, Takagi T, Hayashi T, Mogushi K, Kaneko K, Yao T, Saito T. | 4. 巻 9(43) |
| 2. 論文標題 KCTD12 is negatively regulated by Kit in gastrointestinal stromal tumors. | 5. 発行年 2018年 |
| 3. 雑誌名 Oncotarget | 6. 最初と最後の頁 27016-27026 |
| 掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.18632/oncotarget.25469 | 査読の有無 有 |
| オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である) | 国際共著 - |

| | |
|--|---------------------------|
| 1. 著者名 Akaike K, Suehara Y, Kohsaka S, Hayashi T, Tanabe Y, Kazuno S, Mukaihara K, Toda-Ishii M, Kurihara T, Kim Y, Okubo T, Hayashi Y, Takamochi K, Takahashi F, Kaneko K, Ladanyi M, Saito T. | 4. 巻 9(38) |
| 2. 論文標題 PPP2R1A regulated by PAX3/FOXO1 fusion contributes to the acquisition of aggressive behavior in PAX3/FOXO1-positive alveolar rhabdomyosarcoma. | 5. 発行年 2018年 |
| 3. 雑誌名 Oncotarget | 6. 最初と最後の頁 25206-25215 |
| 掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.18632/oncotarget.25392 | 査読の有無 有 |
| オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である) | 国際共著 該当する |

| | |
|---|---------------------------|
| 1. 著者名 Tanabe Y, Suehara Y, Kohsaka S, Hayashi T, Akaike K, Mukaihara K, Kurihara T, Kim Y, Okubo T, Ishii M, Kazuno S, Kaneko K, Saito T. | 4. 巻 9(18) |
| 2. 論文標題 IRE1 -XBP1 inhibitors exerted anti-tumor activities in Ewing's sarcoma. | 5. 発行年 2018年 |
| 3. 雑誌名 Oncotarget | 6. 最初と最後の頁 14428-14443 |
| 掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.18632/oncotarget.24467. | 査読の有無 有 |
| オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である) | 国際共著 - |

| | |
|---|-----------------------|
| 1. 著者名 Kato S, Hayashi T, Suehara Y, Hamanoue H, Yamanaka S, Ichikawa Y, Higurashi T, Ohashi K, Yamaguchi S, Nozaki Y, Terao Y, Saito T. | 4. 巻 49(2) |
| 2. 論文標題 Multicenter experience with large panel next-generation sequencing in patients with advanced solid cancers in Japan. | 5. 発行年 2019年 |
| 3. 雑誌名 Jpn J Clin Oncol | 6. 最初と最後の頁 174-182 |
| 掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1093/jjco/hyy173. | 査読の有無 有 |
| オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である) | 国際共著 - |

| | |
|---|------------------------|
| 1. 著者名 Kohsaka S, Saito T, Akaike K, Suehara Y, Hayashi T, Takagi T, Kaneko K, Ueno T, Kojima S, Kohashi KI, Mano H, Oda Y, Yao T. | 4. 巻 72 |
| 2. 論文標題 Pediatric soft tissue tumor of the upper arm with LMNA-NTRK1 fusion. | 5. 発行年 2018年 |
| 3. 雑誌名 Human Pathology | 6. 最初と最後の頁 167-173. |
| 掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.humpath.2017.08.017. | 査読の有無 有 |
| オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難 | 国際共著 - |

| | |
|---|---------------------------|
| 1. 著者名 Tanabe Y, Suehara Y, Kohsaka S, Hayashi T, Akaike K, Mukaihara K, Kurihara T, Kim Y, Okubo T, Ishii M, Kazuno S, Kaneko K, Saito T. | 4. 巻 9 |
| 2. 論文標題 IRE1 -XBP1 inhibitors exerted anti-tumor activities in Ewing's sarcoma. | 5. 発行年 2018年 |
| 3. 雑誌名 Oncotarget | 6. 最初と最後の頁 14428-14443 |
| 掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.18632/oncotarget.24467 | 査読の有無 有 |
| オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である) | 国際共著 - |

| | |
|--|------------------------|
| 1. 著者名 Mukaihara K, 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. | 4. 巻 12 |
| 2. 論文標題 Cabozantinib and dastinib exert anti-tumor activity in alveolar soft part sarcoma. | 5. 発行年 2017年 |
| 3. 雑誌名 PLoS One. | 6. 最初と最後の頁 e0185321 |
| 掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1371/journal.pone.0185321 | 査読の有無 有 |
| オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である) | 国際共著 - |

〔学会発表〕 計0件

〔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 |
|-------------------|--|-----------------------------------|----|
| 研究 分 担 者 | 末原 義之 (Yoshiyuki Suehara) (70509405) | 順天堂大学・医学部・客員教授 (32620) | |

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

| 共同研究相手国 | 相手方研究機関 |
|---------|---------|
|---------|---------|