

令和 2 年 6 月 18 日現在

機関番号：24303

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2017～2019

課題番号：17K10123

研究課題名(和文)横紋筋肉腫におけるRAS変異に基づいたプレジジョン医療開発のための基礎的検討

研究課題名(英文) Mutations in the RAS Pathway as Potential Precision Medicine Targets in Treatment of Rhabdomyosarcoma

研究代表者

菊地 顕 (Kikuchi, Ken)

京都府立医科大学・医学(系)研究科(研究院)・特任助教

研究者番号：40453104

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,500,000円

研究成果の概要(和文)：プレジジョン医療とは、患者の個人差、遺伝子情報に基づいたその患者に有効と考えられる特異的で副作用の少ない治療法を設定する医療であるが、小児がんではまだ十分に検討が行われていない。

本研究ではRAS変異に基づいた横紋筋肉腫プレジジョン医療開発のための基礎的検討を行なった。横紋筋肉腫細胞株11種類のRAS-RAF経路変異の有無とRAF-MEK阻害剤感受性、その下流の活性を評価し、その増殖抑制効果がp21を介したG1 arrestであることを確認、さらにマウス同所性移植モデルを作成し、In vivoでのRAF-MEK阻害剤効果も確認できたためこの結果を論文で報告した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究により開発された新しい治療方針・手法は、近年、本申請者らが協力して、インフラ整備と体制確立がなされた本邦の当該小児がんグループスタディの臨床試験において、臨床的にその有効性と安全性を検証し、さらにその結果は本邦の当該がん患児の治療の向上に貢献できると考えている。

研究成果の概要(英文)：Precision medicine strategies for treating rhabdomyosarcoma (RMS), a childhood malignancy, have not been developed. We examined the effect of selective dual RAF/MEK inhibitor on RMS cell lines. Among the eleven cell lines studied, one NRAS and two HRAS mutated cell lines were detected. RAF/MEK inhibitor inhibited the proliferation and growth in all of the RAS-mutated RMS cell lines, while it induced G1 cell cycle arrest in two of them. G1 cell cycle arrest was accompanied by p21 up-regulation and RB dephosphorylation. RAF/MEK inhibitor also suppressed the in vivo growth of RAS-mutated RMS tumor, and the mice showed improved survival.

研究分野：小児がん

キーワード：横紋筋肉腫 RAF-MEK阻害剤 RAS変異

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

横紋筋肉腫 (RMS) は、近年の集学的治療の進歩により約 80%の長期生存が望めるようになったが、治療の合併症による性腺機能不全や恒常的な臓器機能欠損が深刻な問題となっており、副作用の少ない特異的な治療の開発が望まれている。

RAS-RAF-MEK pathway は重要な腫瘍ドライバー変異として知られ、近年その特異的阻害剤が悪性黒色腫等を対象に精力的に検討されている。最近我々は横紋筋肉腫においても一定の頻度で RAS-RAF 変異が存在することを報告した (Seki M, Hosoi H et al. Nat Commun. 2015)。また、二大組織亜型の一つである胎児型 (ERMS) は、発生母地、ドライバー変異ともに、腫瘍間での heterogeneity が注目されており、その検討はプレジジョン医療につながると考えられる。実際、筋細胞特異的に RAS 変異をコンディショナルノックインした動物モデルでの胎児型横紋筋肉腫も報告されており (Langenau DM et al. Genes Dev. 2007) その重要性、ドライバー変異としての役割が示唆されている。一方、二大組織亜型の一つである胞巣型 (ARMS) は、悪性度が高いことが知られているが、その発生由来やドライバー変異と考えられる特異的キメラ遺伝子 PAX3-FOXO1 の機能解析が進んでいる (Kikuchi et al. Biochem Biophys Res Commun. 2008; Kikuchi et al. Cancer Cell. 2012; Kikuchi et al. Oncogene. 2013; Kikuchi et al. PLoS Genet. 2014)。しかし、PAX3-FOXO1 のみでは腫瘍発生頻度が極端に少ないことが報告されており、セカンドヒットの重要性が示唆される。RAS-RAF 変異もその候補の一つとして考えられており、実際胞巣型横紋筋肉腫においても RAS-RAF 変異の報告が一定の頻度で存在する。

2. 研究の目的

今回我々は横紋筋肉腫の一部 (約 10-20%) でドライバー変異としての報告がある RAS-RAF 変異に注目し、また、近年、他がん種で使用されている種々の RAS-RAF-MEK 特異的阻害剤を用い、今後の腫瘍ゲノム情報に基づくプレジジョン医療につながる基礎的な検討を行いたいと考えている。

3. 研究の方法

(1) 横紋筋肉腫細胞株における各種 RAF-MEK 阻害剤の効果、分子生物学的検討

横紋筋肉腫細胞株 RAS-RAF 変異パネルの作成

様々な遺伝的バックグラウンドをもつ横紋筋肉腫細胞株用い、RAF-RAS 変異の有無をサンガーシーケンシング法で全長を確認し、RAS-RAF 変異パネルを作成する。

横紋筋肉腫細胞株における各種 RAF-MEK 阻害剤による IC50 の検討

横紋筋肉腫細胞株を用い各種 RAF-MEK 特異的阻害剤を投与、その感受性と RAS-RAF 変異の有無の関係を検討する。

横紋筋肉腫細胞株における RAF-MEK 阻害剤による増殖抑制効果の検討

RAS 変異のある横紋筋肉腫細胞株での RAF-MEK 阻害剤増殖抑制効果の機序を解明するため、細胞周期アッセイ、アポトーシスアッセイを行い RAS-RAF 変異の有無との関係を検討する。

横紋筋肉腫細胞株における RAF-MEK 阻害剤による分子生物学的変化の検討

MEK 下流の ERK リン酸化、Rb のリン酸化、CDKI (p15, p21, p27 etc) の発現量の変化等を確認する。

(2) 横紋筋肉腫細胞株 in vivo mouse xenograft model を用いた RAF-MEK 阻害剤の前臨床試験
FFLuc 遺伝子を発現する横紋筋肉腫細胞株を SCID beige マウスに接種し、ルシフェリンをマウス腹腔内投与することによって、マウスを殺戮せずに腫瘍状態を評価できる Xenogen IVIS imaging System を用い、計画 1 a)-d) で効果の確認できた RAF-MEK 阻害剤の前臨床試験を行う。

4. 研究成果

(1) 横紋筋肉腫細胞株における各種 RAF-MEK 阻害剤の効果、分子生物学的検討

横紋筋肉腫細胞株 RAS-RAF 変異パネルの作成

横紋筋肉腫細胞株における各種 RAF-MEK 阻害剤による IC50 の検討

横紋筋肉腫細胞株には RAS 経路の遺伝子変異を認めるものがあつた。また RAS 変異の有無によって RAF-MEK 阻害剤の感受性が異なることを確認した (表 1)。

横紋筋肉腫細胞株における RAF-MEK 阻害剤による増殖抑制効果の検討

RAS 変異のある横紋筋肉腫細胞株での RAF-MEK 阻害剤増殖抑制効果の機序として G1 arrest が観察された。アポトーシスは誘導されなかつた (図 1)。

横紋筋肉腫細胞株における RAF-MEK 阻害剤による分子生物学的変化の検討

G1 arrest の機序として MEK 下流の ERK リン酸化、Rb のリン酸化、CDKI (p15, p21, p27 etc) の発現量の変化等を確認したところ、ERK-p21-pRb 経路の関与が観察された (図 2)。

(2) 横紋筋肉腫細胞株 in vivo mouse xenograft model を用いた RAF-MEK 阻害剤の前臨床試験
横紋筋肉腫細胞株を SCID beige マウスに接種し、RAF-MEK 阻害剤の前臨床試験を行った。図に示すように有意な腫瘍増殖抑制効果を認めた (図 3)。

以上の結果を論文にまとめ報告した。

表 1

RAS/RAF mutation in rhabdomyosarcoma cell lines.

cell lines	NRAS	KRAS	HRAS	BRAF	IC50 of CH5126766 (μ M)
Embryonal histology					
RD	c.A183T:p.Q61H	WT	WT	WT	0.14 (0.06–0.39)
CT-TC	WT	WT	c.C181A:p.Q61K	WT	0.36 (0.25–0.51)
SCMC-RM2	c.T81C(SNP)	WT	WT	WT	N/A
RMS-YM	WT	WT	WT	WT	1.3 (0.78–2.32)
Rh2	WT	WT	WT	WT	N/A
KP-RMS-KH	WT	WT	c.C181A:p.Q61K	WT	0.62 (0.31–1.39)
Alveolar histology					
Rh30	WT	WT	WT	WT	N/A
Rh18	WT	WT	WT	WT	N/A
Rh28	WT	WT	WT	WT	4.2 (3.91–4.43)
Rh3	WT	WT	WT	WT	N/A
Rh41	WT	WT	WT	WT	N/A

図 1

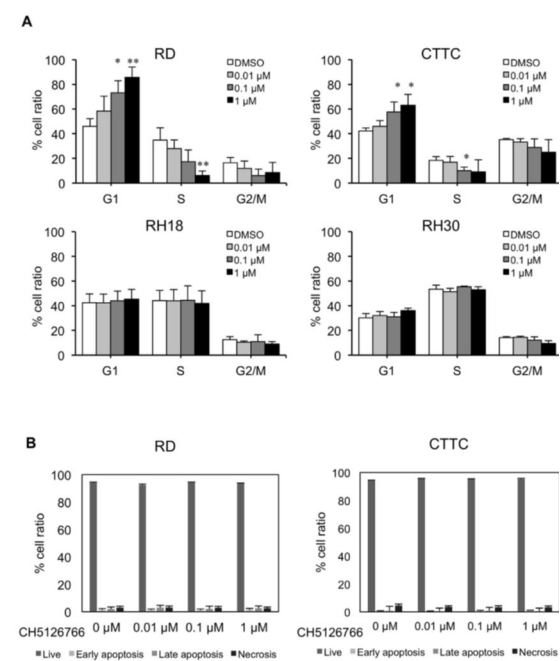


図 2

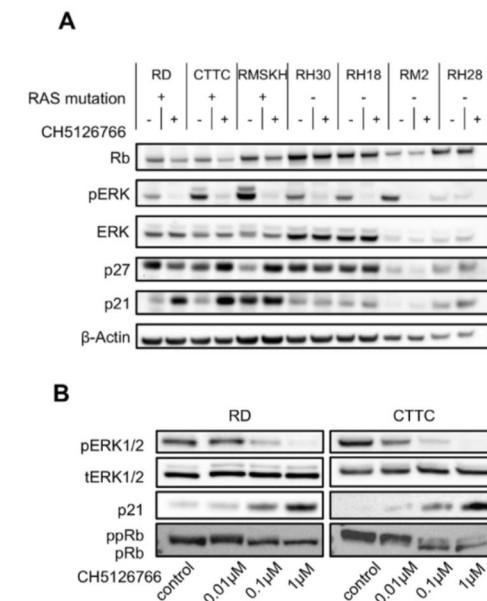
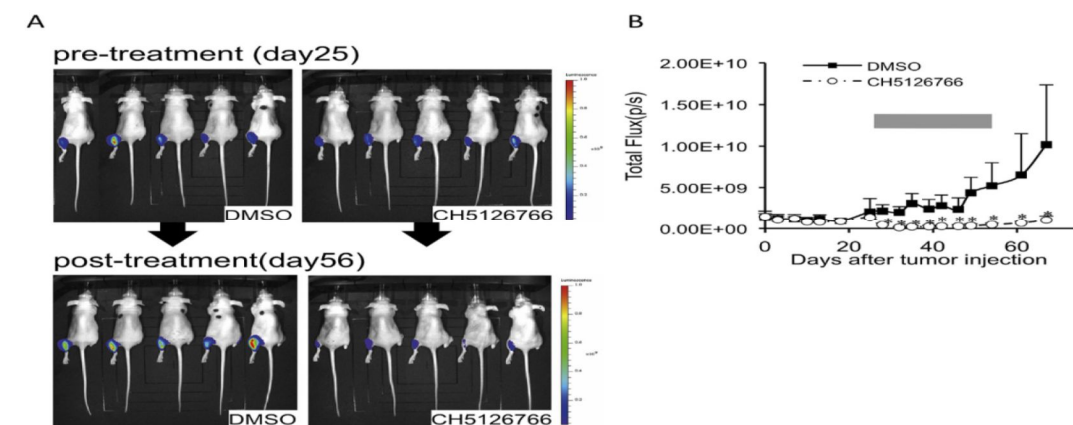


図 3



5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計1件（うち査読付論文 1件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 0件）

1. 著者名 Nakagawa N, Kikuchi K, Yagyu S, Miyachi M, Iehara T, Tajiri T, Sakai T, Hosoi H.	4. 巻 512
2. 論文標題 Mutations in the RAS pathway as potential precision medicine targets in treatment of rhabdomyosarcoma.	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Biochem Biophys Res Commun	6. 最初と最後の頁 524-530
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.bbrc.2019.03.038	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 -

〔学会発表〕 計2件（うち招待講演 0件/うち国際学会 1件）

1. 発表者名 Nakagawa N, Kikuchi K, Yagyu S, Iehara T, Sakai T, Hosoi H.
2. 発表標題 Novel allosteric RAF/MEK inhibitor in the treatment of rhabdomyosarcoma.
3. 学会等名 第60回日本小児血液・がん学会学術集会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 N. nakagawa, K. Kikuchi, K. Nakamura, T. Tanaka, S. Yagyu, T. Iehara, T. Tajiri, T. Sakai, H. Hosoi
2. 発表標題 Mutation of Ras Pathway Should be a Target of Precision Medicine for Rhabdomyosarcoma
3. 学会等名 49th CONGRESS OF THE INTERNATIONAL SOCIETY OF PAEDIATRIC ONCOLOGY (SIOP) (国際学会)
4. 発表年 2017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
研究分担者	柳生 茂希 (Yagyu Shigeki) (10572547)	京都府立医科大学・医学(系)研究科(研究院)・助教 (24303)	

6. 研究組織（つづき）

	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	細井 創 (Hosoi Hajime) (20238744)	京都府立医科大学・医学(系)研究科(研究院)・教授 (24303)	
研究分担者	家原 知子 (Iehara Tomoko) (20285266)	京都府立医科大学・医学(系)研究科(研究院)・准教授 (24303)	
研究分担者	宮地 充 (Miyachi Mitsuru) (40584983)	京都府立医科大学・医学(系)研究科(研究院)・助教 (24303)	