

令和元年6月3日現在

機関番号：17102

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2017～2018

課題番号：17K16696

研究課題名(和文) 悪性骨軟部腫瘍におけるエリ布林メシル酸塩による低酸素環境の改善

研究課題名(英文) Alleviation of intratumor hypoxia by eribulin mesylate in bone and soft tissue sarcomas.

研究代表者

薛 宇孝 (Setsu, Nokitaka)

九州大学・大学病院・助教

研究者番号：40727020

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,200,000円

研究成果の概要(和文)：様々な肉腫細胞株においてHIF-1の発現を調べた結果、悪性末梢神経鞘腫瘍において低酸素環境だけでなく常圧酸素環境においてもHIF-1 が高発現していた。悪性末梢神経鞘腫瘍ではHIF-1 の発現は予後不良と関係し、これを抑えると低酸素、常圧酸素いずれの環境においても悪性末梢神経鞘腫瘍の増殖を抑制することが可能であった。HIF-1 経路はエリ布林メシル酸塩のターゲットとして有望である。また、エリ布林耐性平滑筋肉腫株を作成した。エリ布林がターゲットとしている微小管を形成するタンパクであるTubulinのサブユニットのうちTubulin 3の高発現が耐性化に関与している可能性が示唆された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

エリ布林は腫瘍増殖を抑えるだけでなく腫瘍内の低酸素環境を改善することが知られている。HIFは低酸素で誘導される増殖因子であるが悪性末梢神経鞘腫瘍においてHIF-1 が恒常的に発現かつ予後不良と関係し、これを抑えると悪性末梢神経鞘腫瘍の増殖を抑制することが可能であることを示した。また、エリ布林耐性平滑筋肉腫株を作成しエリ布林の作用点であるTubulinのサブユニットのうちTubulin 3の高発現が耐性化に関与していることを示しエリ布林感受性マーカーとなり得る可能性を見出した。

研究成果の概要(英文)：Primary MPNST cases showed the negative correlation between the nuclear expression of HIF-1 and prognosis. We also clarified that inhibition of HIF-1 signaling suppressed growth and caused apoptosis in MPNST cells. Thus, we believe that the status of HIF-1 nuclear expression will provide useful prognostic information in patients with MPNSTs, and that HIF-1 signaling is a promising molecular target for novel therapeutic agents for MPNSTs. An eribulin-resistant leiomyosarcoma cell line was developed which lead to the finding that TUBB3 overexpression induced chemoresistance to eribulin and knockdown of TUBB3 expression by siRNA led to chemosensitization. TUBB3 has the potential to be a therapeutic target to overcome eribulin resistance and a biomarker for selection of drug treatment.

研究分野：骨軟部腫瘍

キーワード：エリ布林 低酸素 Hypoxia-inducible factor 薬剤耐性 悪性末梢神経鞘腫瘍 平滑筋肉腫 Tubulin

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

1. 研究開始当初の背景

悪性骨軟部腫瘍は、発症率が約 6/10 万人・年と非常に低いいわゆる希少がんであるため研究は他の癌腫と比較し遅れており、有力な治験を行うことが難しく新規治療開発も進みにくい状況である。その中、エリブリンメシル酸塩（以下、エリブリン）が乳がんから悪性軟部腫瘍へ適応拡大された。エリブリンは海洋生物から抽出されたハリコンドリン類の全合成類縁化合物であり、主に微小管伸長を阻害することにより抗悪性腫瘍効果を有するとされている。

近年、エリブリンが乳がんマウスモデルにおいて腫瘍縮小効果とともに、微小血管リモデリング作用により腫瘍組織内の血液循環を改善することが報告された (Funahashi Y, Cancer Sci. 2014)。腫瘍内の血流障害・低酸素環境は様々な悪性腫瘍において薬剤耐性、放射線抵抗性だけでなく転移・浸潤能獲得にも関与しているとされており、エリブリンが低酸素環境を改善することによる抗腫瘍効果も併せ持つ可能性を示唆している (図 1)。悪性骨軟部腫瘍においても低酸素の関与が報告されており、特に低酸素により誘導される転写因子 hypoxia-inducible factor (HIF)-1 経路を中心に報告が増加している。我々はこれまで、HIF-1 の上流にある AKT/mTOR 経路が複数の悪性軟部腫瘍の組織型において増殖に関与していることを見いだし (Setsu N. Cancer 2012, Setsu N. Int J Cancer 2013, Setsu N. Cancer 2013)、いくつかの組織型においては HIF-1 高発現が予後不良と相関していることも発見している (データ未公表)。

実臨床上のエリブリンの特徴として、悪性軟部腫瘍における第 3 相試験において無増悪生存期間 (PFS) の延長は有意でなかったにもかかわらず、全生存期間 (OS) を有意に伸ばしたという事があげられる (Schöffski P, Lancet. 2016)。この現象は PFS のみを有意に延長した悪性軟部腫瘍に対する新規薬剤である Pazopanib や Trabectedin とは異なるものであり、エリブリンの抗腫瘍効果が腫瘍細胞の増殖抑制だけではないことを示唆している。さらにこの現象は乳がんにおいても再現性をもって認められており、悪性軟部腫瘍にも乳がんと同様の作用機序で OS 延長効果を示している可能性がある。特に前述した腫瘍内血流改善効果を考えれば、エリブリンによる低酸素環境改善がその後の治療の感受性を引き上げている、あるいは低酸素により誘導される増殖能や転移・浸潤能に関わる因子を抑制している可能性がある。

現在、悪性軟部腫瘍進行例に対しては従来の殺細胞性抗がん剤に加えてエリブリン、Pazopanib、Trabectedin が使用可能な状況である。エリブリンは第 3 相試験の対象がアントラサイクリン系抗がん剤を含む 2 レジメン以上の前治療歴を有する患者であったことから、実際の臨床で使用する薬剤の順序としてはエリブリンの位置付けは 3rd line 以降となることが多い (図 2)。今後悪性骨軟部腫瘍におけるエリブリンによる低酸素環境の改善効果、それによる抗がん剤・放射線感受性の増強効果が明らかになれば、エリブリンを先行して使用することによる他の抗がん剤、あるいは放射線治療との相乗効果が期待できる。

2. 研究の目的

臨床検体を用いた低酸素マーカーと予後の解析と同時に、細胞株や xenograft マウスによる実験系により、悪性骨軟部腫瘍の中でも特に低酸素環境が腫瘍の進展・薬剤耐性に深く関わっている組織型を同定するとともに、エリブリンの血流改善機序を明らかにする。

3. 研究の方法

臨床検体における低酸素マーカー発現と予後情報、血管構築の解析
当施設では長年にわたって継続的に骨軟部腫瘍の診療および研究を行い、臨床検体とともに予後情報を含むデータベースを築き上げてきた。臨床検体のホルマリン固定標本において組織型ごとに HIF-1 の免疫染色を行い、組織学的悪性度や予後情報との相関を解析する。

細胞株にて低酸素環境が悪性骨軟部腫瘍の増殖・血管新生・薬剤耐性に与える影響の検討

上記の検証のため細胞株を用いた実験を行う。当施設では悪性骨軟部腫瘍の細胞株として、滑膜肉腫、Ewing 肉腫、脂肪肉腫、未分化多形肉腫、骨肉腫、軟骨肉腫、悪性末梢神経鞘腫瘍 (MPNST)、平滑筋肉腫を保有しており、そのうちいくつかについてはドキシソルピシン耐性株を樹立している (Iida K, Cancer Cell Int. 2013)。

・悪性形質および薬剤耐性を低酸素環境に依存する組織型の同定

デフェロキサミンおよび低酸素チャンパーを用いた実験系により、低酸素環境における増殖能、遊走能などを観察するとともに HIF-1 やその下流の CA9、VEGF、PDGF などの mRNA 量の上昇を解析する。同時に低酸素環境によって薬剤耐性が細胞レベルで誘導されるかを検討する。

・HIF-1 阻害による増殖抑制効果、薬剤感受性の変化の検討

HIF-1 の阻害薬であるケトミンや siRNA により HIF-1 の作用をブロックし、増殖や薬剤耐性が HIF-1 経路に依存しているか否かを検討する。

エリブリン耐性株作成によるエリブリン耐性獲得のメカニズムの解析

・耐性株の作成

ヒト肉腫細胞株を用い、培地中のエリブリン濃度を 1 ~ 100nM まで漸増させ、多段階にセレクションを施行し耐性株を樹立することを試みる。

・耐性メカニズムの解析

樹立された耐性株を用いて他の微小管作用薬で報告されている P-glycoprotein および Tubulin アイソタイプの発現を検討する。

4. 研究成果

悪性骨軟部腫瘍における低酸素環境の影響を調査するため様々な肉腫細胞株において HIF-1 の発現を調べた。その結果、悪性末梢神経鞘腫瘍の複数の細胞株において、低酸素環境だけでなく常圧酸素環境においても HIF-1 が高発現していることがわかった。悪性末梢神経鞘腫瘍の臨床サンプルを用いた検討では、HIF-1 の発現は予後不良と関係していた(図1)。さらに、HIF-1 の発現を siRNA で抑える、あるいは HIF-1 阻害剤であるケトミンを用いることにより、低酸素、常圧酸素いずれの環境においても悪性末梢神経鞘腫瘍の増殖を抑制することが可能であり、これは腫瘍細胞のアポトーシスを誘導することによるものであることを示した(図2)。(PLoS One. 2017, Fukushima S) 以上の結果から HIF-1 経路はエリブリンメシル酸塩のターゲットとして非常に有望であるといえ、エリブリンが HIF-1 を介して腫瘍増殖に与える影響を現在解析中である。

以上の実験に加え、エリブリンがターゲットとしている微小管を形成するタンパクである Tubulin のサブユニットの発現の差異によって、エリブリンの感受性や腫瘍の増殖活性が規定される可能性についても探索した。平滑筋肉腫細胞株においてエリブリン耐性株の作成に成功し、耐性株での Tubulin のサブユニット解析を行い、Tubulin 3 の高発現が耐性化に關与している可能性が示唆された。また、腫瘍組織において Class III β -Tubulin が高発現しているものは有意に増殖活性を示唆する MIB-1 指標率が高く、また高発現の患者の方が低発現の患者群より統計学的有意に予後が不良であることを見出した。これらの結果をふまえて Class III β -Tubulin の高発現がエリブリン耐性および腫瘍細胞の増殖に關与していると考えられた。(Anal Cell Pathol 2018, Yahiro et al. 図3) この論文において示されたように、エリブリンの適応となる患者から得られた腫瘍組織の Class III β -Tubulin の発現を調べることによりエリブリンの効果を予測できバイオマーカーとしての Class III β -Tubulin がオーダーメイド化された化学療法レジメンの計画に役立つ可能性があることを示唆した。

-Tubulin がオーダーメイド化された化学療法レジメンの計画に役立つ可能性があることを示唆した。

さらに実際の臨床上の経験に基づいた解析も行っており、悪性骨軟部腫瘍におけるエリブリンの投与状況とその効果を解析し、研究会にて発表した。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計 2 件)

Fukushima Suguru, Endo Makoto, Matsumoto Yoshihiro, Fukushi Jun-ichi, Matsunobu Tomoya, Kawaguchi Ken-ichi, Setsu Nokitaka, Iida Keiichiro, Yokoyama Nobuhiko, Nakagawa Makoto, Yahiro Kenichiro, Oda Yoshinao, Iwamoto Yukihide, Nakashima Yasuharu, Hypoxia-inducible factor 1 alpha is a poor prognostic factor and potential therapeutic target in malignant peripheral nerve sheath tumor PLoS One. 2017 May 30;12(5):e0178064. doi: 10.1371/journal.pone.0178064. eCollection 2017.

Yahiro Kenichiro, Matsumoto Yoshihiro, Fukushi Jun-ichi, Kawaguchi Ken-ichi, Endo Makoto, Setsu Nokitaka, Iida Keiichiro, Fukushima Suguru, Nakagawa Makoto, Kimura Atsushi, Oda Yoshinao, Nakashima Yasuharu, Class III β -Tubulin Overexpression Induces Chemoresistance to Eribulin in a Leiomyosarcoma Cell Line, Anal Cell Pathol (Amst). 2018 Jun 21;2018:8987568. doi: 10.1155/2018/8987568. eCollection 2018.

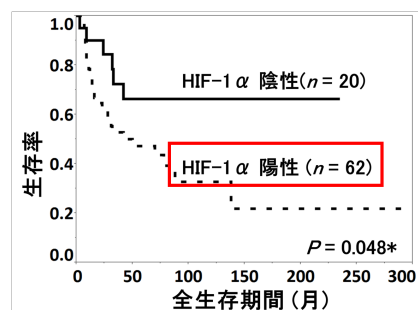
〔学会発表〕(計 4 件)

第 51 回日本整形外科学会骨・軟部腫瘍学術集会 平滑筋肉腫患者における class 3 チューブリンの発現は予後と相関する 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

第 133 回西日本整形災害外科学会 進行または再発悪性軟部腫瘍に対するエリブリンの使用

図 1.

HIF-1 α の発現は予後不良と相関



カプランマイヤー法、log-rank test

図 2.

Chetomin添加時の細胞周期解析

1% 酸素, chetomin添加48時間後でアポトーシスを認めた

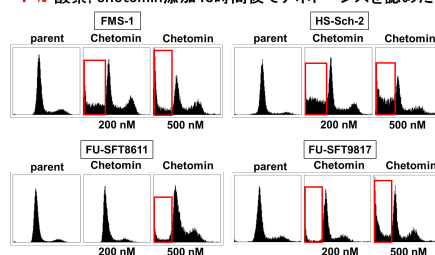
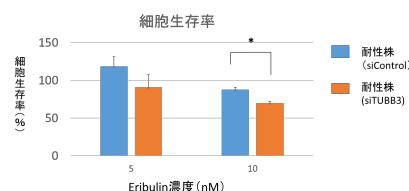


図 3.

siTUBB3によるEribulin感受性変化



TUBB3の発現を抑えることで、耐性の改善を認めた

経験 横山 信彦, 松本 嘉寛, 飯田 圭一郎, 薛 宇孝, 遠藤 誠, 中島 康晴
第 50 回日本整形外科学会骨軟部腫瘍学術集会 進行または再発悪性軟部腫瘍に対するエリ
ブリンの使用経験 横山 信彦, 松本 嘉寛, 飯田 圭一郎, 薛 宇孝, 遠藤 誠, 中島 康晴
第 81 回がん化学療法研究会 進行又は再発悪性軟部腫瘍に対する治療 薛 宇孝

〔図書〕(計 0 件)

〔産業財産権〕
出願状況(計 0 件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
出願年：
国内外の別：

取得状況(計 0 件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
取得年：
国内外の別：

〔その他〕
ホームページ等

6. 研究組織

(1)研究分担者 なし

研究分担者氏名：

ローマ字氏名：

所属研究機関名：

部局名：

職名：

研究者番号(8桁)：

(2)研究協力者 なし

研究協力者氏名：

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。