

令和 4 年 6 月 7 日現在

機関番号：17401
研究種目：基盤研究(B) (一般)
研究期間：2018～2021
課題番号：18H02591
研究課題名(和文) 癌の生命予後規定因子CYLDの分子診断を突破口とした従来にない分子標的治療の確立

研究課題名(英文) Establishing novel molecular-targeted cancer therapies based on molecular diagnostics focusing on prognostic factor CYLD

研究代表者
城野 博史 (Jono, Hirofumi)
熊本大学・病院・准教授

研究者番号：40515483
交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 13,300,000円

研究成果の概要(和文)：本研究では、予後不良・治療不応と診断されたがん患者に対する新たな治療選択提供を目的として、生命予後規定因子CYLDの発現消失に着目した分子病態解析・分子診断の有用性を検証し、分子標的薬治療における効果予測マーカーとしての有用性を検証した。研究成果として、CYLD発現消失と生命予後不良・薬剤感受性との相関性、EGFR過剰活性化を介したEGFR分子標的薬の治療効果向上メカニズム、CYLD発現消失が異なる多様な分子標的治療の効果予測マーカーとなりうる可能性、などが示され、CYLD分子診断を基盤とした新たな分子標的治療確立の可能性が示された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

近年開発されているがん分子標的薬は、標的となる分子の診断(遺伝子変異など)により治療有効症例の判定が可能であり、がん患者の生命予後は改善されている。しかし、検査により「治療不応」と診断された患者は、対症療法・緩和ケアで余命を過ごすしか選択肢はない。本研究では、このような「治療不応」と診断された予後不良患者に新たな治療選択を提供することを目的に、生命予後規定因子として知られているCYLDという分子に着目した診断により、特定のがん分子標的が「治療不応」患者にも有効である可能性を示した。CYLDの分子診断に着目した本研究は、がん患者に多くの選択肢を提供し、がんの克服に貢献することが期待される。

研究成果の概要(英文)：For establishing novel molecular-targeted therapies for cancer patients with poor prognosis, we performed molecular pathological analysis focusing on the loss of prognostic factor CYLD expression, and investigated the usefulness of molecular diagnosis in molecular-targeted drug treatment. As a result, we revealed as follows: 1. Correlation between loss of CYLD expression and poor prognosis/drug sensitivity, 2. Mechanism of enhanced sensitivity to EGFR-targeted molecular medicine through EGFR over-activation, 3. loss of CYLD expression may serve as a biomarker for predicting various type of molecular-targeted medicine.

研究分野：医療薬学

キーワード：CYLD 個別化医療 分子標的治療薬 薬剤感受性

1. 研究開始当初の背景

がん分子標的薬は、細胞障害性抗がん剤とは異なり、がん特有の分子を標的として治療効果を発揮することから、標的分子の診断(遺伝子変異、増幅・欠失など)により、治療有効症例の判別が可能である。近年では、非小細胞肺癌の上皮成長因子受容体(EGFR)遺伝子検査が、分子標的薬ゲフィチニブ(EGFR-TKI)治療に必須となったように、抗がん剤治療には分子診断による治療有効症例の判別が不可欠な時代となりつつある。その一方で、検査により「治療不応」と診断された患者は、対症療法・緩和ケアで余命を過ごす選択肢しかないのが実情である。このような予後不良・治療不応と診断された患者に新たな治療選択を提供するための取り組みにおいて、申請者は、腫瘍抑制遺伝子CYLDの分子診断が本課題解決の突破口となりうる知見を得た。

CYLDは、家族性円柱腫症の原因遺伝子として同定され、その機能喪失が腫瘍形成の要因となる。CYLDは、タンパク質のコピキチン化を制御する脱コピキチン化酵素として、NF- κ B等の様々な細胞シグナルを制御し、近年、CYLDは、悪性腫瘍に代表される細胞シグナル異常により発症する疾患において、その機能喪失と病態形成の関連が注目されている。申請者は、口腔扁平上皮癌におけるCYLD機能喪失の臨床的意義解明を企図した病態解析の成果として、本研究の鍵となる以下の知見を得た。

成果1) 腫瘍組織におけるCYLD消失は予後悪化の要因となる：CYLD発現消失は、口腔癌の細胞シグナル(TGF、EGFなど)の過剰活性化を介して浸潤転移・薬剤耐性化を著明に亢進し、生命予後を著しく悪化させる。 **予後予測マーカーとしての有用性**

成果2) CYLD消失癌細胞には各種EGFR分子標的薬が著効を示す：CYLD消失は、標準治療薬(シスプラチン等)に耐性を示す一方、ゲフィチニブ(EGFR-TKI)の効果を劇的に向上させる。また、CYLD消失による転移能亢進は、抗EGFR抗体薬セツキシマブにより完全に抑制される。 **抗がん剤適正使用・予後不良患者への治療選択提供の可能性**

成果3) ゲフィチニブ耐性癌細胞はCYLD消失により治療効果を獲得する：ゲフィチニブはEGFR変異陽性症例(Exon 19欠失変異等)に効果を示し、陰性症例(野生型)には治療抵抗性を示すが、陰性症例(野生型)の細胞も、CYLD消失によりゲフェチニブの治療効果を新たに獲得している。 **治療不応と診断された患者でも治療効果を示す可能性**

以上の研究成果は、CYLDが上記分子標的薬に対する治療有効性を示す効果予測マーカーとなり、従来の診断により予後不良・治療不応と診断されたがん患者に対して、CYLDの分子診断(陽性・陰性)の結果を基に、新たな治療選択を提供できる可能性を強く示している。

2. 研究の目的

本研究では、3つの研究項目【1】CYLD消失の臨床分子病態解析・治療効果予測マーカーとしての有用性検証、【2】CYLD消失によるEGFR分子標的薬の治療効果向上メカニズムの解明、【3】CYLD消失癌細胞における各種抗がん剤の感受性プロファイリング、に組み込み、CYLDの分子診断を活用した分子標的薬治療の最適化・適応拡大により、予後不良・治療不応と診断されたがん患者に対する、新たな治療選択提供の道を切り開くことを目的とした。

3. 研究の方法

CYLD分子診断の有用性検証のため、腫瘍組織の詳細な分子病態解析と臨床所見の基礎研究による検証を軸とし、次世代シーケンサー・質量分析装置を駆使した網羅的病態解析アプローチ、CYLD関連ツール(CYLD消失細胞など)による分子生物学的アプローチにより【1】~【3】の研究項目を遂行し、CYLD分子診断の有用性検証に必要なエビデンスを収集した。

【1】CYLD消失の臨床分子病態解析・治療効果予測マーカーとしての有用性検証

各種がん患者の腫瘍組織を対象として、免疫染色によりCYLD陽性群・CYLD陰性群に症例を分類し、腫瘍組織におけるCYLD発現消失の分子病態・臨床的意義の解明を行った。さらに、各種薬剤応答性(シスプラチン、セツキシマブ、ゲフィチニブ等)を示す臨床所見とCYLD消失との関連性から、効果予測マーカーとしての有用性を検証した。

【2】CYLD消失によるEGFR分子標的薬の治療効果向上メカニズムの解明

EGFR分子標的薬(ゲフィチニブなど)は、予後不良の要因となるCYLD消失誘導性の薬剤耐性・浸潤転移に対して著明な治療効果を示すが、その分子メカニズムは不明である。そこで、CYLD消失各種癌細胞を対象に、EGFRシグナルを中心とした細胞シグナルの活性化状態を確認し、各種EGFR分子標的薬処理による活性化変化から治療効果向上メカニズムを解明した。

【3】CYLD消失癌細胞における各種抗がん剤の感受性プロファイリング

難治癌を対象に、各癌種で適応となっている各種抗がん剤に対する薬剤感受性プロファイリングを行い、様々な癌種におけるCYLDの分子診断の有用性・EGFR-TKIをはじめとした分子標的薬治療の適応拡大の可能性を検証した。

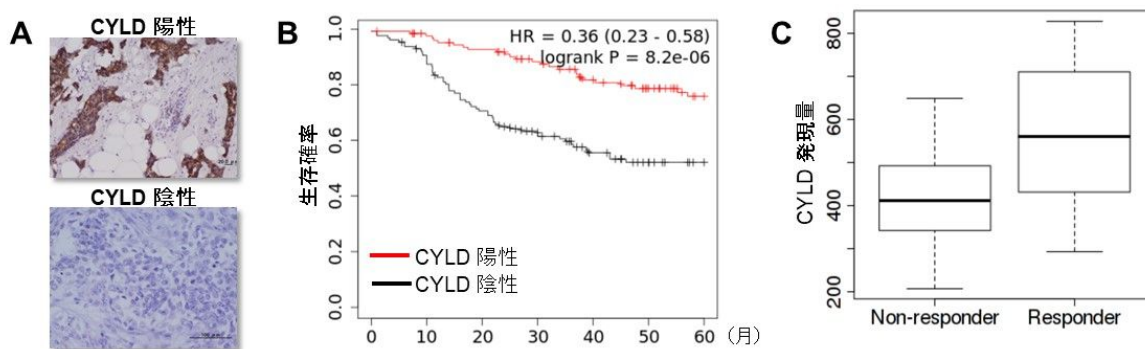
4. 研究成果

本研究期間内に、研究項目ごとに以下の研究成果を得た。

【1】CYLD 消失の臨床分子病態解析・治療効果予測マーカーとしての有用性検証

これまでの研究で腫瘍組織の CYLD 発現消失と予後不良との相関が確認されていた癌腫（口腔扁平上皮癌、乳癌、肝細胞癌、神経膠腫、骨肉腫など）を対象に、CYLD 消失の臨床的意義・分子病態解析を実施したところ、特に悪性度の高い癌腫の浸潤部において高頻度に CYLD 発現消失が認められ、薬剤耐性化と患者の生命予後不良に関連性が認められる可能性が示された。また、新たな癌腫として、卵巣癌、真珠腫、非小細胞肺癌などを対象に、CYLD の臨床的意義および CYLD 消失時の薬剤感受性の変化を検証したところ、CYLD 発現消失と生命予後不良の相関性が確認され、いずれの癌腫においても CYLD 発現消失による薬剤感受性変化と患者の生命予後不良に関連性がある可能性が示された。

さらに、当院で CYLD 発現消失と生命予後不良の相関性が確認された多様な癌腫を対象に、当院の臨床データおよび The Cancer Genome Atlas (TCGA) データベースを用いた双方の解析結果から、多様な癌腫（口腔癌、非小細胞肺癌、乳癌、卵巣癌、膵癌、肝細胞癌、神経膠芽腫、肝内胆管癌、大腸癌、腎癌、真珠種など）において、CYLD 発現消失と生命予後不良との相関性が示され、一部癌腫においては治療効果予測マーカーとしての可能性が示された（図）。



（図）乳癌における CYLD 発現消失と生命予後不良・薬剤感受性との相関

- A. 臨床検体における CYLD 免疫組織化学染色（陽性・陰性）
- B. トリプルネガティブ型乳癌患者の CYLD 陽性・陰性患者における無再発生存期間
- C. トリプルネガティブ型乳癌患者の CYLD 陽性・陰性患者における化学療法感受性

【2】CYLD 消失による EGFR 分子標的薬の治療効果向上メカニズムの解明

RNAi 効果 (siRNA) を利用して CYLD 発現を低下させたがん細胞株を用いた検討の結果、CYLD 発現低下に伴って EGFR シグナルの過剰活性化が認められ、この現象は各種 EGFR 分子標的薬の処理により著しく変化することが明らかとなった。また、多様な細胞内シグナル (EGFR、Akt、MAPK、TGF シグナルなど) の過剰活性化も同様に認められ、細胞シグナル活性の表現型変化を介して各種分子標的薬の感受性が変化している可能性が示された。さらに、EGFR シグナル過剰活性化のメカニズムとして、CYLD 発現低下に伴う EGFR のエンドサイトーシス誘導により EGFR の過剰活性化 (リン酸化) が惹起され、結果として EGFR 分子標的薬の感受性が向上することが明らかとなった。さらに、EGFR の過剰活性化メカニズムとして、CYLD 発現低下時の EGFR のエンドサイトーシス向上が一部関与している可能性が示された。

【3】CYLD 消失癌細胞における各種抗がん剤の感受性プロファイリング

siRNA により CYLD 発現を消失させると、従来の細胞障害性抗がん剤に対しては耐性傾向を示し、一方で各種分子標的薬に対しては、EGFR 分子標的薬など感受性が向上するもの、感受性に変化が見られないものが存在していることが明らかとなり、癌腫によって層別化されることが明らかとなった。CYLD 発現低下が認められた癌腫（口腔扁平上皮癌、乳癌、神経膠腫、卵巣癌、真珠腫、非小細胞肺癌など）を対象に、薬剤感受性プロファイリングを実施した結果、各がん種において著効を示す分子標的薬が同定された。その種類としては EGFR-TKI をはじめ NF- κ B 阻害剤、MEK 阻害剤、PARP 阻害剤 等が挙げられ、CYLD 発現低下を指標とした分子診断が、EGFR-TKI のみならず、異なる多様な分子標的治療の効果予測マーカーとなりうる可能性が示された。

以上の結果より、CYLD 発現消失と生命予後不良・薬剤感受性との相関性が示され、分子標的薬の治療効果向上メカニズムとして、CYLD 発現低下に伴う多様な細胞内シグナル (EGFR、Akt、MAPK、TGF シグナルなど) の過剰活性化が関与すること、さらに、CYLD の分子診断が異なる多様な分子標的治療の効果予測マーカーとなりうる可能性が示された。

今後は、今回得られた知見を基盤に、CYLD 分子診断・効果予測マーカーとしての有用性を更に検証し、分子標的薬治療の最適化・適応拡大により、予後不良・治療不応と診断されたがん患者に対する新たな治療選択提供を目指した研究を継続していく予定である。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計9件（うち査読付論文 8件／うち国際共著 1件／うちオープンアクセス 6件）

〔学会発表〕 計30件（うち招待講演 5件／うち国際学会 5件）

1. 発表者名 Hirofumi Jono
2. 発表標題 Personalized cancer therapy based on clinical molecular pathogenesis. - Clinical significance of tumor suppressor CYLD in malignant tumors -
3. 学会等名 Asian Association of Schools of Pharmacy (AASP) Young Scientist Conference 2020 (招待講演) (国際学会)
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 西村 優佳, 高野 佳奈子, 末永 尚輝, 三宅 俊介, 金丸 歩美, 齋藤 秀之, 城野 博史
2. 発表標題 非小細胞肺癌における腫瘍抑制遺伝子CYLD発現の予後・効果予測因子としての可能性の検証
3. 学会等名 第73回薬理学会西南部会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 桑野明香里, 平井ちか, 末永尚輝, 金丸歩美, 新垣ひとみ, 林光博, 西郷智香, 齋藤秀之, 城野博史
2. 発表標題 Biological significance of CYLD downregulation in Triple negative breast cancer.
3. 学会等名 第94回日本薬理学会年会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 伊藤由貴, 山岡道子, 白川裕貴, 秀拓一郎, 齋藤秀之, 城野博史
2. 発表標題 Biological significance of CYLD expression in malignant characteristics of glioblastoma multiforme
3. 学会等名 第94回日本薬理学会年会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 城野博史
2. 発表標題 新規効果予測マーカー CYLD の分子診断を基軸とした新たながん分子標的治療の確立
3. 学会等名 第59回日本臨床化学会年次学術集会（招待講演）
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 桑野明香里、平井ちか、末永尚輝、金丸歩美、三宅俊介、林光博、齋藤秀之、城野博史
2. 発表標題 トリプルネガティブ型乳癌の悪性化形質獲得における腫瘍抑制遺伝子CYLD発現低下の臨床的意義
3. 学会等名 第59回日本臨床化学会年次学術集会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 山岡道子、白川裕貴、伊藤由貴、秀拓一郎、齋藤秀之、城野博史
2. 発表標題 膠芽腫の薬物治療抵抗性におけるがん抑制遺伝子CYLD発現の意義
3. 学会等名 医療薬学フォーラム2019 第27回クリニカルファーマシーシンポジウム
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 小関利弥、末永尚輝、金丸歩美、高野佳奈子、西村優佳、齋藤秀之、城野博史
2. 発表標題 口腔扁平上皮癌におけるがん抑制遺伝子CYLDの治療効果予測マーカーとしての有用性の検証
3. 学会等名 医療薬学フォーラム2019 第27回クリニカルファーマシーシンポジウム
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 末永尚輝、金丸歩美、小関利弥、齋藤秀之、城野博史
2. 発表標題 口腔癌におけるCYLD発現低下誘導性のシスプラチン耐性化機序の解明
3. 学会等名 医療薬学フォーラム2019 第27回クリニカルファーマシーシンポジウム
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Suenaga N, Kanemaru A, Ozeki K, Saito H, Jono H
2. 発表標題 Loss of tumor suppressor CYLD expression induces cisplatin resistance in oral squamous cell carcinoma
3. 学会等名 第29回日本医療薬学会年会 (International symposium) (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Kuwano A, Hirai C, Suenaga N, Kanemaru A, Hayashi M, Saito H, Jono H
2. 発表標題 Clinical significance of CYLD down-regulation in invasiveness of triple negative breast cancer
3. 学会等名 第29回日本医療薬学会年会 (International symposium) (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 小関利弥、末永尚輝、金丸歩美、高野佳奈子、西村優佳、齋藤秀之、城野博史
2. 発表標題 口腔腔扁平上皮癌細胞の抗がん剤感受性に対するがん抑制遺伝子CYLD発現低下の影響
3. 学会等名 第36回日本薬学会九州支部大会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Jono H, Shinriki S, Suenaga N, Kanemaru A, Miyake S, Takano K, Yoshida S, Saito H
2. 発表標題 Loss of CYLD expression correlates with deep tumor invasion & poor prognosis in patients with invasive oral squamous cell carcinoma
3. 学会等名 18th World Congress of Basic and Clinical Pharmacology (WCP2018) (国際学会)
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 城野博史、平井ちか、西郷智香、林光博、神力悟、安東由喜雄、齋藤秀之、岩瀬弘敬
2. 発表標題 乳癌薬物療法に対する耐性獲得における生命予後規定因子 CYLD 発現低下の臨床的意義の解明
3. 学会等名 医療薬学フォーラム2018 第26回クリニカルファーマシーシンポジウム
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 三宅俊介、金丸歩美、高野佳奈子、西郷智香、本岡大社、本原剛志、齋藤秀之、城野博史
2. 発表標題 進行卵巣癌における CYLD 発現変動の臨床的意義の解明および分子診断・個別化治療への応用可能性の検討
3. 学会等名 日本臨床化学会第58回年次学術集会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 城野博史、平井ちか、西郷智香、林光博、神力悟、安東由喜雄、岩瀬弘敬、齋藤秀之
2. 発表標題 乳癌薬物療法における腫瘍抑制遺伝子 CYLD 発現低下の臨床的意義の解明
3. 学会等名 日本臨床化学会第58回年次学術集会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 Hirofumi Jono
2. 発表標題 Establishing individualized cancer therapy based on clinical molecular pathogenesis - Clinical significance of tumor suppressor CYLD down-regulation in malignant tumors
3. 学会等名 第28回日本医療薬学会年会（招待講演）
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 西郷智香、平井ちか、桑野明香里、林光博、岩瀬弘敬、齋藤秀之、城野博史
2. 発表標題 乳癌薬物療法における腫瘍抑制遺伝子 CYLD 発現低下の臨床的意義の解明
3. 学会等名 第28回日本医療薬学会年会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 高野佳奈子、西村優佳、末永尚輝、金丸歩美、三宅俊介、小関利弥、齋藤秀之、城野博史
2. 発表標題 腫瘍悪性化形質における腫瘍抑制遺伝子 CYLD 発現低下の生物学的意義の解明
3. 学会等名 第35回日本薬学会九州支部大会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 Jono H, Saito H
2. 発表標題 Establishing individualized medicine for intractable cancer based on clinical molecular pathogenesis - A novel predictive marker CYLD for molecular targeted therapies -
3. 学会等名 第92回日本薬理学会年会（招待講演）
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 三宅俊介、金丸歩美、高野佳奈子、西郷智香、本岡大社、本原剛志、齋藤秀之、城野博史
2. 発表標題 卵巣癌における腫瘍抑制遺伝子CYLDの発現消失はAktシグナルを介した悪性化形質獲得の要因となる
3. 学会等名 日本薬学会第139年会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 城野博史、高野佳奈子、西村優佳、末永尚輝、金丸歩美、三宅俊介、小関利弥、齋藤秀之
2. 発表標題 口腔癌における腫瘍抑制遺伝子 CYLD 発現の効果予測マーカーとしての有用性
3. 学会等名 日本臨床腫瘍薬学会学術大会2019
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Hirofumi Jono, Yuki Ito, Michiko Yamaoka, Yuki Shirakawa, Takuichiro Hide, Hideyuki Saito
2. 発表標題 Novel roles of tumor suppressor CYLD in malignant characteristics of glioblastoma multiforme
3. 学会等名 The 23rd Korea-Japan Joint Seminar on Pharmacology (国際学会)
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 松山果穂、三宅俊介、下村祐美、金丸歩美、西郷智香、成田勇樹、本岡大社、岩越裕、本原剛志、片淵秀隆、齋藤秀之、城野博史
2. 発表標題 進行卵巣癌における腫瘍抑制遺伝子CYLD 発現低下の臨床的意義の解明
3. 学会等名 第61回日本臨床化学会年次学術集会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 新垣ひとみ、桑野明香里、平井ちか、未永尚輝、金丸歩美、三宅俊介、林光博、成田勇樹、齋藤秀之、城野博史
2. 発表標題 CYLD 発現低下による予後不良トリプルネガティブ型乳癌に対するNF- κ B シグナル標的治療の有効性
3. 学会等名 第61回日本臨床化学会年次学術集会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 三宅俊介、三輪徹、米田剛、金丸歩美、齋藤陽元、蓑田涼生、折田頼尚、齋藤秀之、城野博史
2. 発表標題 真珠腫組織におけるCYLD 発現に着目した臨床病理学的解析
3. 学会等名 第61回日本臨床化学会年次学術集会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 三宅俊介、松山果穂、下村祐美、金丸歩美、西郷智香、本岡大社、岩越裕、本原剛志、片淵秀隆、齋藤秀之
2. 発表標題 卵巣癌における腫瘍抑制遺伝子 CYLD 発現低下の臨床的・生物学的意義の解明
3. 学会等名 第38回日本薬学会九州山口支部大会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 伊藤由貴、山岡道子、白川裕貴、増田豪、秀拓一郎、成田勇樹、齋藤秀之、城野博史
2. 発表標題 リン酸化プロテオミクスを活用したCYLD発現低下・予後不良膠芽腫に対する新規治療標的の探索
3. 学会等名 第74回薬理学会西南部会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 三宅俊介、齋藤秀之、城野博史
2. 発表標題 卵巣癌における腫瘍抑制遺伝子CYLD発現消失の臨床薬理学的意義の解明
3. 学会等名 第42回日本臨床薬理学会学術総会（招待講演）
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 Hirofumi Jono, Yuki Shirakawa, Yuki Ito, Shunsuke Miyake, Ayumi Kanemaru, Takuichiro Hide, Akitake Mukasa, Kunimasa Ohta, Hideyuki Saito
2. 発表標題 Novel roles of ribosomal protein S6 promotes development and maintenance of glioblastoma multiforme stem cells
3. 学会等名 第95回日本薬理学会年会
4. 発表年 2022年

〔図書〕 計1件

1. 著者名 城野博史、三宅俊介	4. 発行年 2020年
2. 出版社 南山堂	5. 総ページ数 677
3. 書名 図解 腫瘍薬学	

〔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	齋藤 秀之 (Saito Hideyuki) (40225727)	熊本大学・病院・教授 (17401)	

6. 研究組織（つづき）

	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	大槻 純男 (Ohtsuki Sumio) (60323036)	熊本大学・大学院生命科学研究部（薬）・教授 (17401)	
研究分担者	松井 啓隆 (Matsui Hirotaka) (60379849)	熊本大学・大学院生命科学研究部（医）・教授 (17401)	
研究分担者	林 光博 (Hayashi Mitsuhiro) (50735628)	国立研究開発法人国立がん研究センター・先端医療開発センター・研究員 (82606)	

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