

令和 5 年 6 月 30 日現在

機関番号：72602

研究種目：基盤研究(B) (一般)

研究期間：2019～2022

課題番号：19H03525

研究課題名(和文)機能ゲノミクスを用いた肉腫細胞の遺伝子依存性の解明とそれを標的とした治療法の開発

研究課題名(英文)Elucidation of gene dependence of sarcoma cells using functional genomics approach

研究代表者

旦 慎吾 (DAN, Shingo)

公益財団法人がん研究会・がん化学療法センター 分子薬理部・部長

研究者番号：70332202

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 13,200,000円

研究成果の概要(和文)：肉腫は、骨や軟部組織などの非上皮組織から発生する希少がんで、50種類以上の組織型に分類されるうえ、上皮組織由来のがん腫に比べ治療薬の開発が遅れている。本研究では、肉腫治療におけるアンメットニーズの充足を目的として、肉腫細胞株を広く収集・樹立して肉腫パネルを構築し、がん腫で開発が先行している分子標的薬を中心とした抗がん剤の感受性を測定するとともに、それらの遺伝子発現・変異・依存性をゲノムワイドに調べ、肉腫の新たな創薬標的や効果予測バイオマーカーの探索を進めている。一例として、特定の染色体転座を有する肉腫に我々が開発中のPI3K阻害剤が著効を示すことを明らかにした。

研究成果の学術的意義や社会的意義

多様性の高い肉腫の病態を理解し、有効な治療法を開発するために、本研究では、さまざまな組織型由来の肉腫由来細胞からなるパネルを構築し、それらについての薬剤感受性、ゲノム解析結果などを統合したデータベースを構築している。本研究の成果の一部として、PI3K阻害剤を肉腫治療薬として医薬品化を目指す産学共同研究に発展している。今後、本研究がさらに進展することにより、肉腫全般の分子背景の解明や治療標的分子の探索・同定といった未解決な課題を系統的に解決し、科学的なエビデンスに基づいた新たな肉腫治療法の開発に貢献できるものと期待される。

研究成果の概要(英文)：Sarcoma is a rare cancer that develops from non-epithelial tissue such as bone and soft tissue, and the development of therapeutic drugs has been delayed compared to carcinoma derived from epithelial tissue. In this study, to satisfy unmet needs in sarcoma treatment, we have extensively collected and established sarcoma cell lines derived from various histological subtypes to develop a sarcoma panel. Using this panel, we have been investigating susceptibility to anticancer drugs, mainly molecular target drugs, as well as genome-wide gene expression, mutation and dependence to identify new drug targets and predictive biomarkers for sarcoma. As an example, we have shown that the PI3K inhibitor we have been developing exhibited a remarkable efficacy in sarcomas with a specific chromosomal translocation.

研究分野：がん化学療法、抗がん剤スクリーニング

キーワード：肉腫 分子標的薬 アンメットニーズ 患者由来細胞 PI3K アポトーシス 遺伝子依存性 染色体転座

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

悪性骨軟部腫瘍(肉腫)は、骨、軟骨、脂肪、筋肉、血管等といった非上皮性の結合組織・筋組織、神経組織に発生するがんである。日本国内での10万人当たりの年間発生率は軟部肉腫が3.6人、骨肉腫は0.6人となっており、上皮性のがんである胃がん(67人)、肺がん(58人)、大腸がん(42人)、乳がん(40人)、前立腺がん(37人)と比較して断然低く、希少がんの定義である6人以下に当てはまる稀な疾患である。また肉腫は、原発部位や病理組織診断により50種類以上の組織型に細分化され、それぞれの発生頻度はさらに低いことから、上皮性のがんと比較して市場規模が小さく、研究体制や研究資金が整わないなどの理由から治療薬の開発が遅れている。実際、2012年以前に肉腫治療薬として承認済みの抗がん剤は10剤に満たないうえ、2012年以降に承認されたものもパゾパニブ、トラベクテジン、エリプリンの僅か3剤に過ぎず、上皮性のがん、血液がんと比べて圧倒的に少ない状況である。とりわけ分子標的薬の開発が遅れており、新たな肉腫治療薬の開発は急務である。

当研究室ではこれまでに、市販もしくは公的細胞バンクから入手可能なさまざまな組織型の肉腫細胞株14種を収集した肉腫パネルを構築し、がん腫や血液がん承認された、もしくは開発中の代表的な抗がん剤20剤の感受性を調べた。その結果、当研究室で開発中のPI3K阻害剤ZSTK474は、肉腫に概して良好な薬効を示し、とりわけ特定の染色体転座を持つ肉腫細胞株(EWSR1-FLI1/ユーイング肉腫、PAX3-FOXO1/胞葉型横紋筋肉腫、SS18-SSX/滑膜肉腫)に選択的に顕著なアポトーシスを起こすことがわかった(Namatame N et al., Oncotarget 2018)。ZSTK474は共同研究先の製薬会社により2011年より日米で進行固形がんを対象にした第1相臨床試験が実施されており、臨床試験にエントリーした複数の肉腫患者に長期の病勢安定が得られたことから、*in vitro*で本剤が肉腫細胞株に高い抗がん効果を示すことは期待通りの結果であったのだが、なぜZSTK474が特定の染色体転座を有する肉腫細胞に特異的にアポトーシスを誘導するのか、その分子機構は不明であった。また、PI3K阻害剤以外の分子標的抗がん剤のうち、IGF1R阻害剤がユーイング肉腫に著効を示すこと、MEK阻害剤がNRAS変異を持つ肉腫に著効を示すことなど、各薬剤がそれぞれ特徴的な抗がんスペクトルを示すことも併せて判明した。これらの分子標的抗がん剤がどうして特徴的な抗がんプロフィールを示すのかは完全に理解されていないが、肉腫への適応拡大の可能性も考えられることから、さらなる検討が必要な状況であった。

2. 研究の目的

本研究の目的は、肉腫治療におけるアンメットニーズを充足するために、肉腫全般の分子背景の解明や治療標的分子の探索・同定といった未解決な課題を系統的に解決し、科学的なエビデンスに基づいた新たな肉腫治療法の実現に貢献することである。目的を達成するための具体的な戦略は以下の通りである。

(1)肉腫パネルの拡張

バラエティーに富んだ肉腫組織型由来の細胞株を広く収集・樹立して肉腫パネルの充実化を図る。

(2)抗がん剤感受性試験

肉腫パネルを利用して、分子標的薬を中心とした抗がん剤の感受性を広く測定する。

(3)PI3K阻害剤ZSTK474が奏効する肉腫組織型の同定と抗がんメカニズム解析

充実化した肉腫パネルについて、研究代表者が開発を進めるPI3K阻害剤ZSTK474が奏効する肉腫組織型を明らかにし、その抗がんメカニズムを明らかにする。

(4)ゲノム解析

全エクソシーケンス(WES)解析、RNAシーケンス(RNA-seq)解析、ゲノムワイドshRNAライブラリースクリーンなどを利用して、それぞれの細胞株について、遺伝子発現や遺伝子変異、遺伝子依存性を明らかにする。

上記の肉腫パネルについての薬剤感受性、ゲノム解析結果などを統合してデータベース化し、さまざまな肉腫組織型のがん化のメカニズム、増殖・生存に必須な遺伝子について系統的に理解する。その理解に基づき、希少がんである肉腫の新たな創薬標的としてふさわしい分子、または既存薬の効果予測バイオマーカーを選定し、これらの分子を利用して、治療選択肢の少ない肉腫の治療成績を大幅に改善する画期的な治療スキームを開発・導入することを究極的な目標とする。

3. 研究の方法

(1)肉腫パネルの拡張

本研究開始以前に収集した肉腫由来細胞株14株に加え、染色体転座陽性の肉腫組織型由来の

細胞株を中心に、公的細胞バンクや研究者コミュニティより入手する。また国立がん研究センター中央病院の手術検体より肉腫患者由来細胞（PDC）を独自に樹立する。

(2)抗がん剤感受性試験

がん腫や血液がんの治療薬として日米で承認された分子標的薬を中心とした抗がん剤を収集し、肉腫パネルへの感受性を測定する。測定法としては、従来法(スルフォロダミンBアッセイ)に加え、本研究実施中に新たに利用可能となった HCA による薬効プロファイリング法を利用する。

(3)PI3K 阻害剤 ZSTK474 の薬効測定と抗がんメカニズム解析

肉腫パネルを利用して、当研究室で研究代表者らが開発を進めている PI3K 阻害剤 ZSTK474 が有効な肉腫組織型を明らかにし、その抗がんメカニズムを解明する。方法としては、スルフォロダミン B による細胞染色、ハイコンテンツイメージング解析 (HCA)、ミトコンドリア膜電位測定試薬 JC-1 を用いたフローサイトメーター (FCM) 解析、アポトーシスマーカー (Cleaved PARP)、PI3K 阻害剤の薬力学 (PD) マーカーとなる Akt・S6 の脱リン酸化の検討のためのウェスタンロット解析などを利用する。また、抗がんメカニズム解析の一助として、次世代シーケンサー (NGS) を用いた遺伝子発現解析 (RNA-seq) を実施するとともに、抗がんメカニズムに関与が予測された遺伝子については合成 siRNA を用いた遺伝子発現ノックダウンを行って薬効への関与を検討する。

(4)ゲノム解析

次世代シーケンサー (NGS) を用いて、WES 解析、RNA-seq 解析を行う。また遺伝子依存性解析は、Cellecra 社が提供するプール型 shRNA レンチウイルスライブラリーを利用し、感染直後と 14 日培養後の細胞プールに含まれる個別の shRNA に対応するバーコード配列を NGS 解析により測定する。

4. 研究成果

(1)肉腫パネルの拡張

本研究の開始前には 14 種類の肉腫細胞株を入手していたが、本研究期間に順次拡張を進め、染色体転座陽性の組織型の肉腫細胞株 13 種を公的細胞バンクや研究者コミュニティより入手した。さらに、国立がん研究センターで樹立した肉腫 PDC 46 種を新たに追加し、本研究終了時点で全 73 種の肉腫細胞からなる肉腫パネルとなった。

(2)抗がん剤感受性試験

従来法の SRB アッセイ法を用い、50 種類の抗がん剤 (分子標的薬、開発中の薬剤を含む) の、肉腫細胞株 17 種に対する細胞増殖阻害活性を指標とした感受性プロファイリングを実施した (図 1)。これらの化合物については、当研究室で保有しているヒトがん細胞パネル JFCR39 (おもにがん腫由来株で構成) でも実施済みであるが、その結果と同じように、作用メカニズムが共通なものが肉腫パネルに対する抗がんスペクトルが類似する傾向が認められた。研究代表者が開発を進める

ZSTK474 は他の PI3K 阻害剤と同じクラスターに属し、細胞増殖を半減させる薬剤濃度 (Log G150) の偏差は MEK 阻害剤や IGF1R 阻害剤などの他の分子標的薬と比べて小さいが、広く肉腫細胞株にサブマイクロモルで増殖抑制活性を示すことが確かめられた。

(3)PI3K 阻害剤 ZSTK474 の薬効測定と抗がんメカニズム解析

以前の研究で、ZSTK474 はユーイング肉腫や滑膜肉腫、胞巣型横紋筋肉腫などの染色体転座陽性肉腫 (TRS) に対しては、増殖抑制にとどまらずアポトーシスを誘導することで強い抗がん効果を発揮することが示唆されていた。そこで、本剤がアポトーシスを誘導する肉腫組織型を明らかにする目的で、上記肉腫パネルに含まれる細胞株・PDC を、順次 ZSTK474 に暴露し、アポトーシス誘導効果について検討した。その結果、ユーイング肉腫、滑膜肉腫については PDC を含め複数の細胞株でアポトーシス誘導が確かめられたほか、新たに粘液型脂肪肉腫 (FUS-DDIT3)、明細胞肉腫 (EWS-ATF1) 由来の細胞株でも ZSTK474 暴露によるアポトーシス誘導が認められた。一

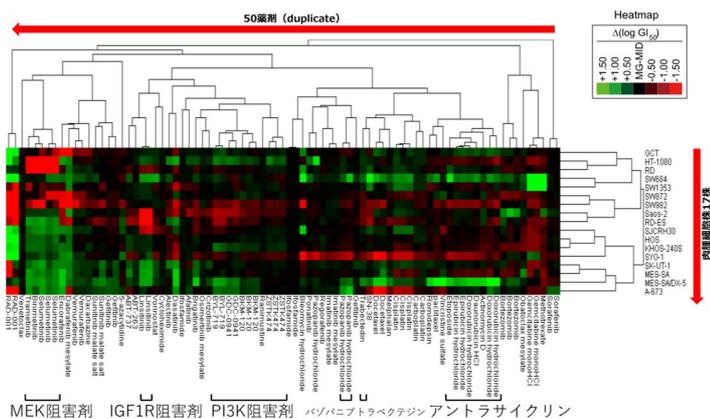


図 1 肉腫パネルに対する各種抗がん剤の増殖抑制活性プロファイル

方、CIC 遺伝子再構成肉腫 (CIC-DUX4)、隆起性皮膚線維肉腫 (COL1A1-PFGFB)、胞巣状軟部肉腫 (ASPL-TFE3) では、染色体転座陰性の肉腫と同様、アポトーシスは認められなかった (図 2)。

つぎに、ZSTK474 によりアポトーシスが認められた TRS のうち、ユーイング肉腫、滑膜肉腫、胞巣型横紋筋肉腫について PI3K への依存性をさらに検討した。クラス 1A PI3K は PI3K、の 3 つのアイソフォームからなることから、それぞれのアイソフォームに特異的な siRNA や阻害剤を用いて、これらの肉腫組織型の依存性が高い PI3K アイソフォームを検討した。その結果、PI3K

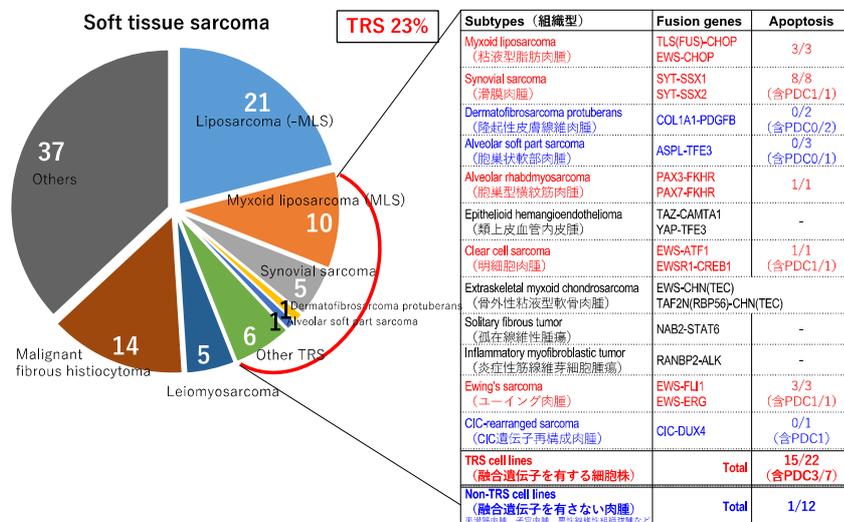


図 2 PI3K 阻害剤 ZSTK474 によりアポトーシス誘導を認める肉腫細胞株

の阻害ではアポトーシス誘導も増殖抑制も起きなかったが、PI3K の阻害により弱い PI3K シグナルの抑制とアポトーシス誘導が認められた。さらに、PI3K に加え、を同時阻害すると顕著なアポトーシス誘導が認められた。このことは、汎クラス I PI3K 阻害剤である ZSTK474 がこれらの TRS にアポトーシス誘導を伴う強い抗がん効果を発揮することの概念実証 (POC) となるものと考えられた。

また、ユーイング肉腫、滑膜肉腫などの TRS に本剤がアポトーシスを誘導するメカニズムを解析する目的で、薬剤暴露後の遺伝子発現解析・GSEA (Gene Set Enrichment Analysis) 解析を行った。その結果、PI3K パスウェイに並んでアポトーシス制御に関わる遺伝子セットの変動が認められた。実際、アポトーシス誘導を起こす肉腫組織型由来の細胞株では Bcl-2 ファミリーの PUMA、BIM のタンパク質発現量の上昇が認められ、ミトコンドリア膜透過性の亢進によりアポトーシスに至ること、PUMA や BIM の発現を siRNA によりロックダウンさせるとアポトーシス誘導が抑制されることが示された。このことから、ZSTK474 は PUMA や BIM の発現誘導を介してアポトーシスを誘導することがわかった (Isoyama S et al, Cell Death & Dis. 2023)。

(4)ゲノム解析

本研究では、肉腫パネルに含まれる細胞株について、外部の研究者との共同研究にて、順次 WES、RNA-seq による遺伝子変異・発現データを取得してきた。これまでに、肉腫細胞株 24 種、肉腫 PDC 9 種について解析が終了し、データベース化を完了している。

一方、ゲノムワイド shRNA ライブラリースクリーンについても、滑膜肉腫、ユーイング肉腫を手始めに解析を進めている。なお、本実験系は、プールドライブラリーの complexity を保ち信頼性の高いデータを得るために、ウイルス感染効率の最適化や、必要な感染細胞数 (3×10^7 細胞) の確保などが求められることから、各細胞株の実験条件の最適化を進めている。

(5)まとめと展望

以上のように、本研究では、肉腫パネルの拡張、薬剤感受性データの取得、WES、RNA-seq データの取得および shRNA スクリーンによる遺伝子依存性データの取得を行い、それらの相互比較により各肉腫組織型の治療標的および効果予測バイオマーカーの探索を進めてきた。その結果、先行して解析を進めている PI3K 阻害剤については、著効する肉腫組織型が絞り込まれ、それらの組織型の PI3K アイソフォーム依存性も明らかとなった。本研究成果により、製薬会社との産学共同研究として、新規肉腫治療薬の開発に進んでいる。

なお、本研究終了時点の 2023 年 3 月現在、肉腫パネルに含まれる細胞株が 73 株まで増えており、現在も各種ゲノム解析を順次進めている。また、薬剤感受性解析についても、米国食品医薬品局 (FDA) 承認薬ライブラリーを用いた HCA による薬効プロファイリングを実施中である。今後、これらの肉腫の基盤データをさらに活用して、肉腫の各組織型のがん化メカニズム、増殖生存に必須な遺伝子について系統的理解がなされ、新たな肉腫治療薬および効果予測バイオマーカーが見出されることが期待される。

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 1件）

1. 著者名 Isoyama Sho, Tamaki Naomi, Noguchi Yutaka, Okamura Mutsumi, Yoshimatsu Yuki, Kondo Tadashi, Suzuki Takeshi, Yaguchi Shin-ichi, Dan Shingo	4. 巻 14
2. 論文標題 Subtype-selective induction of apoptosis in translocation-related sarcoma cells induced by PUMA and BIM upon treatment with pan-PI3K inhibitors	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 Cell Death & Disease	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1038/s41419-023-05690-7	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13件（うち招待講演 4件/うち国際学会 2件）

1. 発表者名 Shingo Dan
2. 発表標題 Dependence of translocation-related sarcomas on PI3K isoforms and their potentials as therapeutic targets
3. 学会等名 中国国家自然科学基金委員会（NSFC）・中国科学院（CAS）・日本学術振興会（JSPS）合同シンポジウム（招待講演）（国際学会）
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 旦慎吾
2. 発表標題 PI3Kを標的とした肉腫治療薬の開発
3. 学会等名 第6回日本サルコーム治療研究会学術集会（招待講演）
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 礪山翔、玉城尚美、吉松有紀、近藤格、旦慎吾
2. 発表標題 PI3K阻害剤の染色体転座陽性肉腫に対する細胞死誘導メカニズムの解析
3. 学会等名 第6回日本サルコーム治療研究会学術集会
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 礒山翔、玉城尚美、旦慎吾
2. 発表標題 染色体転座陽性肉腫におけるClass1A PI3Kアイソフォーム阻害による抗がん作用の解析
3. 学会等名 第81回日本癌学会学術総会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 礒山翔、玉城尚美、旦慎吾
2. 発表標題 染色体転座陽性肉腫におけるクラス1A PI3Kアイソフォームの機能解析
3. 学会等名 第26回日本がん分子標的治療学会学術集会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 礒山翔、玉城尚美、旦慎吾
2. 発表標題 PI3K阻害剤の染色体転座陽性肉腫細胞に対するアポトーシス誘導作用の解析
3. 学会等名 第25回日本がん分子標的治療学会学術集会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 礒山翔、玉城尚美、旦慎吾
2. 発表標題 Mechanism of apoptosis induced by PI3K inhibitor in chromosomal translocation related-sarcoma
3. 学会等名 第80回日本癌学会学術総会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 旦 慎吾
2. 発表標題 肉腫を適応とする新規 PI3K 阻害剤の開発
3. 学会等名 患者由来がんモデル研究会（招待講演）
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 礪山翔、玉城尚美、旦慎吾
2. 発表標題 PI3K阻害剤ZSTK474の肉腫細胞に対する細胞死誘導作用の解析
3. 学会等名 第24回日本がん分子標的治療学会学術集会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 玉城尚美、礪山翔、旦慎吾
2. 発表標題 pan-PI3K阻害剤ZSTK474の滑膜肉腫に対するアポトーシス誘導機構の解析
3. 学会等名 第24回日本がん分子標的治療学会学術集会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 礪山翔、玉城尚美、旦慎吾
2. 発表標題 Induction of apoptosis by ZSTK474, a PI3K inhibitor in chromosomal translocation-positive sarcoma
3. 学会等名 第79回日本癌学会学術総会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 巨 慎吾
2. 発表標題 骨軟部肉腫を標的とした創薬
3. 学会等名 第4回日本肉腫学会・日本臨床肉腫学会合同年次総会学術シンポジウム（招待講演）
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 巨慎吾、玉城尚美、生田目奈知、吉澤雄也、岡村睦美、西村由美子、山崎佳波、矢口信一
2. 発表標題 Potential antitumor effect of a pan-PI3K inhibitor ZSTK474 on human sarcoma cell lines
3. 学会等名 AACR Annual Meeting 2019（国際学会）
4. 発表年 2019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	磯山 翔 (ISOYAMA Sho) (10843394)	公益財団法人がん研究会・がん化学療法センター 分子薬理部・研究員 (72602)	
研究分担者	近藤 格 (KONDO Tadashi) (30284061)	国立研究開発法人国立がん研究センター・研究所・分野長 (82606)	
研究分担者	田中 伯享 (TANAKA Noritaka) (30815882)	公益財団法人がん研究会・がん化学療法センター 分子薬理部・研究員 (72602)	削除：2019年12月18日

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
---------	---------