

令和 4 年 6 月 15 日現在

機関番号：20101

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2019～2021

課題番号：19K07753

研究課題名(和文)AYA世代難治性軟部肉腫に対する新規標的抗がん治療法の開発

研究課題名(英文)Development of a new targeted anticancer treatment for Adolescent and Young Adult refractory soft tissue sarcoma

研究代表者

村瀬 和幸 (Murase, Kazuyuki)

札幌医科大学・医学部・講師

研究者番号：90444918

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,300,000円

研究成果の概要(和文)：AYA世代で問題となる進行軟部肉腫の予後改善のため、新規治療法の開発が望まれている。本研究ではFluorodeoxyglucose (FDG)を結合したLiposomeを使用した軟部肉腫に対する新たな試薬による抗癌剤感受性を明らかにするためにBH3 profilingとDrug delivery systemを検討した。これにより軟部肉腫における各種抗癌剤の治療効果と相乗効果を明らかとした。

研究成果の学術的意義や社会的意義

AYA世代で問題となる進行軟部肉腫の予後改善のため、新規治療法の開発が望まれている。本研究で検討したFluorodeoxyglucose (FDG)を結合したLiposomeを使用した軟部肉腫に対する新たなDDSは、軟部肉腫における新規治療法の可能性があるが、更なる改良・検討を要する課題であった。

研究成果の概要(英文)：Development of a new treatment method is desired to improve the prognosis of advanced soft tissue sarcoma, which is a problem in the Adolescent and Young Adult generation. In this study, we investigated the BH3 profiling and drug delivery system to clarify the anticancer drug susceptibility by a new reagent to soft tissue sarcoma using liposome bound with Fluorodeoxyglucose (FDG). This clarified the therapeutic and synergistic effects of various anticancer agents in soft tissue sarcoma.

研究分野：臨床腫瘍

キーワード：難治性軟部肉腫 標的抗がん治療法

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、研究者個人に帰属します。

## 様式 C-19、F-19-1、Z-19 (共通)

### 1. 研究開始当初の背景

日本では毎年 5000 人も AYA 世代の若者ががんに罹患している。AYA 世代のがん対策は政策提言にもある通り、これからの日本の医療にとって大きな課題である。今回我々は AYA 世代で問題となる希少がん、特に治療法の進歩の乏しい軟部肉腫に注目した。軟部肉腫の切除不能例に対する化学療法は Doxorubicin 単剤が未だに主流であるが効果に乏しい。進行軟部肉腫の予後改善のため、新規治療法の開発が AYA 世代のがん患者救済のためにも必須である。申請者らはこれまでに、Liposome を利用した新たな Drug delivery system (DDS)を開発<sup>1)</sup>。この技術を用い新たな標的抗がん療法を開発し特許も申請した(特許第 5936002 号)。そこで本研究ではこの DDS に、軟部肉腫に集積することが明らかになっている Fluorodeoxyglucose (FDG)を応用することで、軟部肉腫に対する新たな DDS を用いた新たな抗がん療法を開発することを目標とする。

### 2. 研究の目的

本研究の目的は上記の通り、AYA 世代に頻度の高い軟部肉腫の成績改善である。このために申請者が所属する札幌医科大学腫瘍内科で特許を有している(加藤、特許第 5936002 号)「組み合わせ医薬製剤」の技術を利用した軟部肉腫に対する新規細胞標的抗がん治療法の開発を目指す。この際に DDS の標的として利用するのは FDG である。FDG は特に軟部肉腫の場合はその悪性度の高さによって集積度が変わり、悪性度の高いものほど強く取り込まれることが報告されている(Br J Surg. 1999)。そこで本研究では FDG 修飾抗がん剤を設計・作製し、その特異性および抗腫瘍効果を明らかにすることを目的とする。さらに本研究ではこの新規製剤に BH3 profiling を組み合わせることで Precision Medicine に発展させたいと考えている。BH3 profiling により特定の薬剤添加にともなうアポトーシスの起こり易い状態(Priming)を比較検討することが可能となる<sup>2)</sup>。既に我々は日本人の胃癌、大腸癌における抗がん剤の効果予測に BH3 profiling を応用し、報告している<sup>3-4)</sup>。我々は北海道という広い医療圏で数多くの軟部肉腫の患者検体を入手出来る状況にある。最終的な目標は集積される軟部肉腫の患者検体に対し、我々が新規作成した FDG 修飾抗がん剤を利用した BH3 profiling を行う事で至適薬剤を事前に選択し治療する事である。

### 3. 研究の方法

まず Doxorubicin, Ifosfamide, Docetaxel, Gemcitabine, Pazopanib, Trabectedin, Eribulin と FDG を結合したプロタイプを作製。使用する細胞株として NOS-1、SKN、SS-A3-1、Aska-SS、HT1080 を用意。FDG-FITC を利用し細胞内への導入効率を flow cytometer で定量的に検討した。更に各細胞株に FDG 修飾抗がん剤を添加し、殺細胞効果を WST-1 assay を用いて評価した。加えて BH3 profiling を行い、薬剤感受性を確認した。in vivo でヌードマウスに  $5 \times 10^6$  cell のヒト軟部肉腫細胞を皮下に接種し、担癌マウスを作製。腫瘍径が 5mm になった時点で研究を開始。FDG 修飾抗がん剤治療群と非修飾抗がん剤治療群に分けて、腫瘍に対する delivery 効率を IVIS in vivo image analyser で解析した。また 2019 年から 2021 年までに 29 人の軟部肉腫患者の組織型、治療薬、予後調査を行い情報収集した。

### 4. 研究成果

#### (1) NOS-1、SKN、SS-A3-1、Aska-SS、HT1080 における FDG-FITC 導入効率の検討

各種細胞を  $0.5 \times 10^6$  cell 用意。48hr 培養後に FDG-FITC の濃度を 1 uM、10 uM、20 uM、50 uM、100 uM で添加。1 時間培養後に flow cytometer で測定。結果、3 回の独立した実験で図 1 に示す通り FITC のみのコントロールと比較して FDG 濃度依存的に導入効率上昇を認めた。

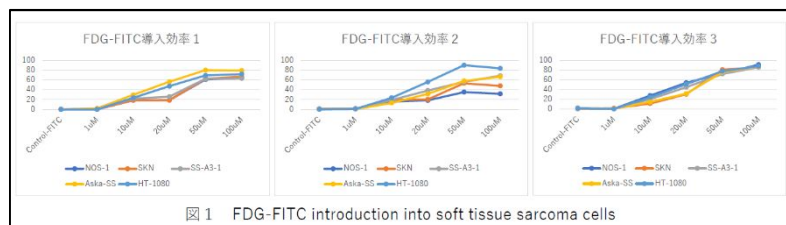


図 1 FDG-FITC introduction into soft tissue sarcoma cells

#### (2) WST-1 assay による殺細胞効果の検討

各種軟部肉腫を  $2.5 \times 10^3$  cell 用意。24hr 培養後に Doxorubicin、Ifosfamide、Docetaxel、Gemcitabine、Pazopanib、Trabectedin、Eribulin を濃度別に添加し、殺細胞効果を検討した。これにより細胞毎に至適薬物濃度を設定。以降は同条件にて FDG 濃度を 1 uM、10 uM、20 uM、50 uM、100 uM に振って測定。図は representative data として FDG-Gemcitabine をそれぞれの濃度で添加した結果を示す。結果、濃度依存的な殺細胞効果を認めた。

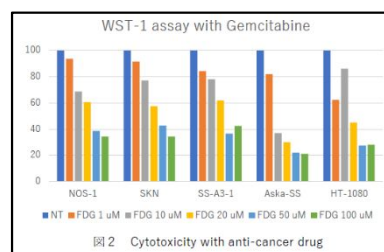


図 2 Cytotoxicity with anti-cancer drug

(3) BH3 profiling による薬剤感受性の確認  
 各種軟部肉腫に対して既報<sup>2)</sup>に従って BH3 profiling を行った。上記と同様の培養条件および FDG 50 uM で細胞および試薬を用意。その後、各種細胞を  $3.0 \times 10^4$  cell を用意し BH3 ペプチド (Bim, Bid, Bad, Noxa, Puma, Bmf, HRK) をそれぞれ添加し、30 分間培養。その後、TMRE で染色し flow cytometer で % Depolarization を測定した。結果、いずれの細胞も Bad、Puma、Bmf にて脱分極が上昇しており Anti-apoptotic protein の Bcl2 依存性の Apoptosis が起きていることが示唆された。また NOS-1 と HT1080 ではその傾向が強いことが示唆された。また Trabectedin と Eribulin では脱分極が起きやすい状態であった。

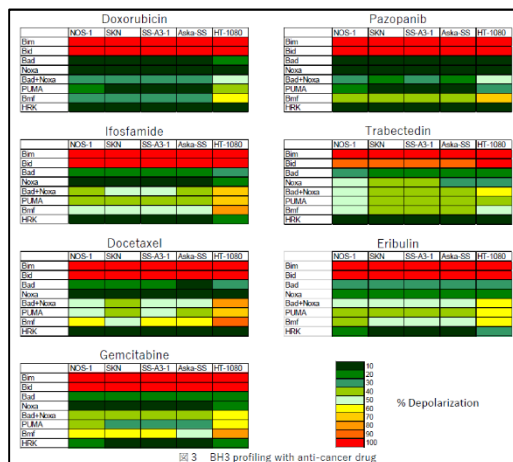


図3 BH3 profiling with anti-cancer drug

(4) IVIS による delivery 効率確認  
 既報<sup>5)</sup>に従い in vivo でヌードマウスに  $5 \times 10^6$  cell の NOS-1、HT1080、SS-A3-1 を皮下に接種し、担瘤マウスを作製。FDG-FITC を投与し 96 時間後に腫瘍に対する delivery 効率を IVIS in vivo image analyser で解析した。結果、図 4 に示す通り腫瘍への集積は認めるものの、腫瘍以外の部位、頭部や特に肝臓への取り込みが多い結果となった。これにより非特異的な副作用が起きる可能性が示唆された。特異度を高めるため、更なる検討を要すると考えられた。

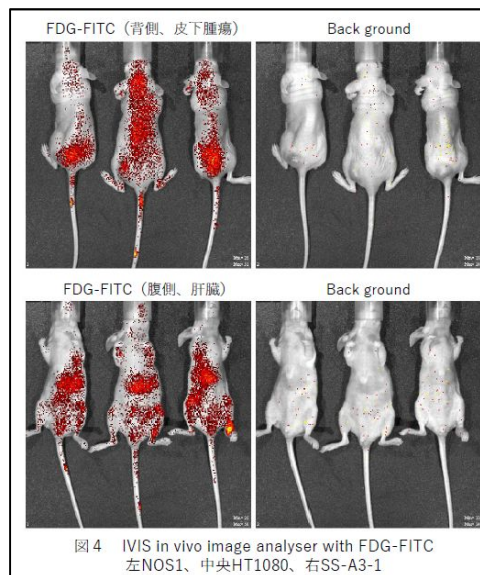


図4 IVIS in vivo image analyser with FDG-FITC  
 左NOS1、中央HT1080、右SS-A3-1

(5) 軟部肉腫患者の情報収集  
 2019 年から 2021 年までに当科で経験した 29 人の軟部肉腫患者における組織型、治療薬 (Doxorubicin、Ifosfamide、Docetaxel、Gemcitabine、Pazopanib、Trabectedin、Eribulin) と使用量、効果と予後調査を行いデータベース化した。

< 引用文献 >

- 1) Sato Y, Murase K, et al, Resolution of liver cirrhosis using vitamin A-coupled liposomes to deliver siRNA against a collagen-specific chaperone. Nat Biotechnol. 2008 Apr;26(4):431-42.
- 2) Murase K, et al, Increased mitochondrial apoptotic priming of human regulatory T cells after allogeneic hematopoietic stem cell transplantation. Haematologica. 2014 Sep;99(9):1499-508.
- 3) Kubo T, Murase K, et al, BAK is a predictive and prognostic biomarker for the therapeutic effect of docetaxel treatment in patients with advanced gastric cancer. Gastric Cancer. 2016;19:827-838.
- 4) Kazuma Ishikawa, Murase K, et al, BH3 profiling discriminates the anti-apoptotic status of 5-fluorouracil-resistant colon cancer cells. Oncol Rep. 2019 Dec;42(6):2416-2425.
- 5) Yoshida M, Murase K, et al, Targeting anticancer drug delivery to pancreatic cancer cells using a fucose-bound nanoparticle approach. PLoS One. 2012;7(7):

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔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	加藤 淳二  (Kato Junji)  (20244345)	札幌医科大学・医学部・教授    (20101)	
研究分担者	高田 弘一  (Takada Kohichi)  (90398321)	札幌医科大学・医学部・講師    (20101)	

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