

令和 4 年 6 月 13 日現在

機関番号：17601
 研究種目：基盤研究(C) (一般)
 研究期間：2019～2021
 課題番号：19K08255
 研究課題名(和文) FAK阻害薬の骨原発悪性腫瘍への早期臨床応用実現を目標とした転移抑制機構の解明

研究課題名(英文) Elucidation of the inhibitory mechanism of metastasis in bony malignant tumors to realize the early clinical application of FAK inhibitor

研究代表者
 盛武 浩 (Moritake, Hiroshi)
 宮崎大学・医学部・教授

研究者番号：40336300
 交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,400,000円

研究成果の概要(和文)：ユーイング肉腫においてFAKとIGF-1Rの二重チロシンキナーゼ阻害薬TAE226により非常に高い転移抑制効果を見出し、分子生物学的にその機序を証明した。既存の抗がん剤の相乗効果も確認し論文報告した。次に骨肉腫の転移機構を解明するために、骨肉腫細胞株143Bの肺転移マウスモデルを確立し、骨肉腫患者2名の原発巣と肺転移巣とあわせてRNAを抽出した。2つのモデルで共通して肺転移巣で高発現の上位10個の各遺伝子欠損細胞株を樹立し、免疫不全マウスの脛骨に接種した。接種後4週目のCTと病理学的評価により、1遺伝子に肺転移縮小効果を認め、骨肉腫における肺転移促進遺伝子の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

骨原発腫瘍の転移例に対する治療成績の向上は認められていない。今回ユーイング肉腫で見出されたFAKとIGF-1R抑制による転移抑制メカニズム解明は、Novartis社の同薬剤TAE226の開発中止決定は誠に残念であるが、別のルートから臨床応用に繋がっていくことに期待したい。骨肉腫に関しても既存の化学療法の組み合わせでは限界があり、病態メカニズムからアプローチする新規薬剤に期待が集まる。本研究により、現在候補として再現性を確認している遺伝子が標的遺伝子として確定すれば、創薬に繋がりに骨肉腫転移症例の予後改善に期待できる。

研究成果の概要(英文)：We showed that TAE226, a dual inhibitor of FAK and IGF-1R, has a drastic inhibitory effect on metastasis in Ewing sarcoma. Furthermore, the molecular biological mechanism underlying the effect and the synergetic effect of various anticancer drugs was revealed. We established a mouse model of pulmonary metastasis using the osteosarcoma 143B cell line. RNA from primary and metastatic sites was extracted from mice and two patients, respectively. We compared the expression profile between primary and metastatic sites by RNA sequencing and extracted the 10 most-common genes among high-expression genes at metastatic sites. We then established sgRNA-based knockdown 143B cells for 10 genes and introduced these cells to tibias of immunocompromised mice. One gene showed an inhibitory effect on computed tomography and pathological evaluations at four weeks after inoculation, suggesting its relation to pulmonary metastatic machinery in osteosarcoma.

研究分野：小児腫瘍学

キーワード：骨肉腫 ユーイング肉腫 転移 RNAシーケンス FAK IGF-1R

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

骨肉腫およびユーイング肉腫 (Ewing's sarcoma, ES) は小児・若年成人において1, 2番目に多い骨原発悪性腫瘍である。いずれの腫瘍も多剤併用療法の進歩により限局例の予後は改善しているが、転移例は依然予後不良で生存率は20~30%に留まっており、その対策は急務である。申請者は腫瘍細胞の移動や転移に関与している Focal adhesion kinase (FAK) 阻害剤を用いることで骨肉腫および ES 細胞の増殖、転移能を抑制することを明らかにした。本研究では xenograft および PDX (Patient-derived xenograft) モデルを用いて 1) 小児骨原発悪性腫瘍の転移能を有する細胞分画の同定と FAK 活性の評価、2) 転移を制御する上流分子の同定と FAK 阻害療法の開発を行い、転移阻害剤として臨床応用するための基礎研究を行う計画をたてた。しかし最も有効性を示した FAK 阻害薬 TAE226 が Novartis 社より開発中止の判断となったため新規標的遺伝子を探索する方針へ変更した。本研究開始段階で骨肉腫の肺転移を促進する候補遺伝子は同定されておらず、同一患者の骨肉腫原発巣と肺転移巣から RNA を抽出、さらに骨肉腫肺転移 xenograft モデルでも同様に骨原発巣と肺転移巣の RNA を抽出しトランスクリプトーム解析を行い、2つのモデルで共通して肺転移巣で高発現の遺伝子を同定し、候補遺伝子を明らかにしたい。

2. 研究の目的

本研究は、骨肉腫の肺転移を促進する候補遺伝子を同定し、それらを阻害することで肺転移を抑制できるか明らかにする。さらに、その遺伝子を治療標的とした創薬を試み、難治である肺転移を有する骨肉腫の治療成績を改善することを目的として下記の研究を遂行する。まず骨肉腫細胞株 xenograft モデルおよび患者検体から原発巣と肺転移巣の腫瘍細胞の RNA を抽出しトランスクリプトーム解析 (RNA-seq) を行い、xenograft および患者検体で共通して高発現している遺伝子を抽出する。これらの候補遺伝子を転移予測マーカーとして臨床応用するため(1)-(3)の研究を遂行する方針とした。(1)候補の上位遺伝子から、肺転移を促進するマスター遺伝子を同定する。(2)患者検体で候補遺伝子の発現解析を行い臨床情報と統合する。(3)新規患者検体については PDX マウスを作製し、候補遺伝子の阻害剤を投与することで、肺転移を抑制できるかを明らかにする。

3. 研究の方法

(1)肺転移を促進する候補遺伝子の同定

申請者らは骨肉腫細胞株 143B を免疫不全 (NOG) マウスの骨に接種することで肺転移や骨髄転移を再現する xenograft の作製に成功している。転移を促進する候補遺伝子について sgRNA を作製しレンチウイルスベクターで 143B に導入することで遺伝子欠損骨肉腫細胞株を樹立する。それぞれの細胞株での転移・浸潤能を *in vitro* の migration assay で評価する。著しく細胞の遊走・浸潤能が障害された遺伝子を絞り込み、NOG マウスに接種する。接種後 4 週目に CT で肺転移を評価し、肺転移が抑制された遺伝子については(2)の患者検体での評価に進む。

(2)患者検体での肺転移制御遺伝子の解析

(1)で同定した肺転移制御遺伝子について患者検体を用いた発現解析を行う。新規および既存検体から RNA を抽出後に cDNA を作製し定量 PCR で遺伝子発現解析を行う。さらに凍結検体から蛋白質を抽出しウエスタンブロッティング法で蛋白発現を確認する。病理組織標本では免疫組織染色あるいは蛍光免疫染色を行い候補遺伝子の発現を解析する。臨床情報では生存期間、抗がん

剤感受性、転移の有無を抽出し遺伝子発現との相関を明らかにする。さらに原発巣と肺転移巣の病理組織標本から実際に候補遺伝子が肺転移巣に高発現しているか確認を行う。

(3)PDX を用いた肺転移抑制療法の開発

(1)で同定した肺転移制御遺伝子について阻害剤の有無を確認する。阻害剤が存在せず細胞表面抗原である場合には抗体薬のスクリーニングを MabGenesis 社に依頼する。その効果を PDX マウスおよび骨肉腫細胞株 143B xenograft への投与により確認する。接種後 4 週目に CT で肺転移を評価し肺転移が有意に抑制された阻害剤・抗体薬については新規肺転移抑制治療薬として特許取得を目指す

4 . 研究成果

(1)肺転移を促進する候補遺伝子の機能解析

患者ならびに PDX マウスに共通する転移を促進する候補遺伝子の上位 10 個を抽出し、sgRNA を作製しレンチウイルスベクターで 143B に導入することで遺伝子欠損骨肉腫細胞株を樹立した。また、目的遺伝子欠損がなされているかは real-time PCR での発現低下で確認し、10 遺伝子すべて遺伝子欠損骨肉腫細胞株の作製に成功した。*in vitro*の実験として、各細胞株で migration assay 施行したが、コントロールと比較して統計学的に有意差はないものの抑制傾向が確認されたため、*in vivo*の実験で転移巣が抑制されるかを確認する方針とした。遺伝子欠損骨肉腫細胞株を免疫不全マウス(各 n=3 ずつ)の前脛骨部に接種し、4 週後に肺転移病変を評価した。全例、原発巣は腫瘍を形成し、胸部 CT で肺転移病巣が確認された。全例を安楽死させ、肺の組織学的評価を行った。全例に病理学的に肺転移を認めており、今回抽出した 10 遺伝子は肺転移促進に直接的影響のある遺伝子とは考えにくい。ただし 1 遺伝子に肺転移数と体積の減少を認め、治療標的になる可能性があり、接種マウス数を増やして再現性を確認中である。さらに候補範囲を広げ、追加の 10 遺伝子の sgRNA 作製を終えており、NOG マウスへの接種、転移巣の評価という工程を繰り返す。(1)で有意な候補遺伝子が同定できれば、(2)(3)へ順次進んでいく予定である。

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 Moritake H, Saito Y, Sawa D, Sameshima N, Yamada A, Kinoshita M, Kamimura S, Konomoto T, Nunoi H.	4. 巻 8
2. 論文標題 TAE226, a dual inhibitor of focal adhesion kinase and insulin-like growth factor-I receptor, is effective for Ewing sarcoma.	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Cancer Medicine	6. 最初と最後の頁 7809-7821
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1002/cam4.2647	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2件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 盛武 浩
2. 発表標題 小児希少疾患の克服に向けて病態から考える
3. 学会等名 第171回日本小児科学会鹿児島地方会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Moritake H, Saito Y, Sameshima N, Yamada A, Kinoshita M, Kamimura S, Konomoto T, Nunoi H
2. 発表標題 TAE226, a dual inhibitor of focal adhesion kinase and insulin-like growth factor-I receptor, is an effective treatment for Ewing sarcoma
3. 学会等名 51th Congress of the international society of paediatric oncology
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
---------------------------	-----------------------	----

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