

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 6 月 30 日現在

機関番号：82504

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2011～2013

課題番号：23791673

研究課題名(和文) 分子プロファイルに基づく骨肉腫の薬剤感受性マーカーの探索

研究課題名(英文) Molecular profiling to predict chemosensitivity for osteosarcoma

研究代表者

岩田 慎太郎 (Iwata, Shintaro)

千葉県がんセンター(研究所)・医療局 整形外科・主任医長

研究者番号：90549685

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,200,000円、(間接経費) 960,000円

研究成果の概要(和文)：骨発生の悪性腫瘍である骨肉腫の予後は、その抗がん剤の効き具合(薬剤感受性)に大きく左右される。もしそれぞれの患者において薬剤感受性が予測できるのであれば、それぞれに合わせた治療が可能となる。

我々は過去に治療を行った22名の小児骨肉腫患者の腫瘍組織検体を用い、3群に分類した薬剤感受性ごとの遺伝子学的プロファイルを見つけ出し、これらを用いた薬剤感受性予測システムを構築を目指し研究を行った。その結果、ゲノム解析により8個の遺伝子マーカーが抽出され、これを用いた予測システムは新規の8名の骨肉腫患者の薬剤感受性を予測することに成功した。今後本システムの有用性をさらに多くの患者で検証していく予定である。

研究成果の概要(英文)：Chemosensitivity is the most important prognostic factor for osteosarcoma (OS). We have carried out our project to identify possible genomic markers for the prediction of chemosensitivity for pediatric OS patients using CGH technique. 22 tumor samples of pediatric conventional OS patients who divided into three groups according to the histological response to chemotherapy were applied. Differential aberration analyses resulted that 8 putative genomic markers harboring OS-related genes were selected for classifying each 3 groups. Scoring system to predict chemosensitivity was developed with these genomic markers and validation analysis with 8 independent patients confirmed that the scoring system was remarkably consistent to the patient properties. These signatures may be useful for the prediction of chemosensitivity and validation with more samples is awaited.

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：外科系臨床医学・整形外科学

キーワード：骨肉腫 CGH 薬剤感受性 ゲノム

1. 研究開始当初の背景

骨肉腫は骨原発悪性腫瘍としては最多の疾患であり、主に小児および青年期にその発症のピークをもつ。治療は術前および術後化学療法による全身療法と、手術等による局所療法からなり、近年多剤併用化学療法の導入と根治性を高めた局所療法の達成により、5年生存率は70-80%にも達してきている。しかしながら、化学療法が奏功しない患者の予後は5年生存率20-30%と未だに不良である。すなわち、化学療法感受性は骨肉腫における最も重要な予後規定因子であるとされている。

現在骨肉腫に対する標準治療は、治療前生検による診断確定、術前化学療法、広範切除を基本とする局所治療、そして術後化学療法とされている。また化学療法プロトコールは、MAPレジメン(メソトレキセート+アドリアマイシン+シスプラチン)およびIFO(イフォスファミド)が世界的にも広く受け入れられている。ファーストラインレジメンとしてMAPを導入し、画像もしくは病理学的効果判定によりMAPが不奏効と判断された場合、IFOの導入が検討される。本治療アルゴリズムの問題点としては、MAPレジメンの奏効性は手術による摘出腫瘍検体の検討により決定されるものであり、実際に治療を行なってみないとその有効性が判断できないところにある。もし骨肉腫患者ごとに抗癌剤感受性の予測が可能であれば、治癒への期待がさらに高まるだけでなく、約一年にも及ぶ治療期間を短縮させることも可能となる。

過去における骨肉腫患者の化学療法感受性の予測マーカーの研究の結果は、しかしながら信頼に足るマーカーの検出には至っていない。これには対象患者となる骨肉腫が希少疾患であること、また各報告内で化学療法プロトコールが体系化されていないことが原因となっていると思われる。

世界的にも過去10年以上治療成績の向上がみられていない本疾患領域では、化学療法感受性予測のためのマーカーの探索は、新規治療薬の開発と並び待ち望まれているところであり、研究結果をベッドサイドに迅速に還元しうる手法であると考えられる。

2. 研究の目的

現時点で有用な化学療法感受性予測のためのマーカーが存在しない骨肉腫において、化学療法奏功例および不奏功例の臨床検体を用いたゲノムコピー数異常解析および遺伝子発現解析を行うことで、以下を達成することを本研究計画の目的とする。

骨肉腫の化学療法感受性を規定する genomic marker の同定

Genomic marker に基づく化学療法感受性

の予測システムの構築

3. 研究の方法

1) 対象症例の選択

千葉県がんセンターにて1993年以降に診断および治療を受けた骨肉腫患者より採取され、バイオバンクに保存されている骨肉腫腫瘍検体86検体のうち、以下の条件に適合する検体を抽出した。

- (a) 病理学的に conventional high-grade osteosarcoma の診断が確認されている
- (b) 四肢骨発生例
- (c) 治療開始前の生検材料由来の腫瘍組織が利用可能
- (d) 診断時年齢が25歳以下
- (e) 生存例は追跡期間が2年以上
- (f) 局所療法として根治的腫瘍広範切除術が施行されている

その結果、30例の検体が解析対象となった。この内、2008年以前に採取された検体22例を learning set、それ以降に採取された検体8例を validation set とした。

2) 化学療法感受性によるグルーピング

本研究の主目的である、化学療法感受性の予測のため、本研究においては全症例を以下の3グループに層別化した。

Group A: MAPレジメンに奏効(腫瘍切除検体にて腫瘍壊死率90%以上)

Group B: MAPレジメン不奏効(画像的診断で腫瘍増大)もIFOが奏効(腫瘍切除検体にて腫瘍壊死率90%以上)

Group C: MAP、IFOともに不奏効

Learning set 22例の内訳は、Group A;8例、Group B;6例、Group C;8例であった。またこの3群間の臨床病理学的背景はその転帰意外はほぼ同一であった(図1)。

	Group A	Group B	Group C
Number	8	6	8
Age (Mean)	10-21	8-20	6-21
Sex (Male:Female)	7:1	3:3	5:3
Stage (2A:2B:3)	4:4:0	4:1:1	3:4:1
Local treatment	Surgery	Surgery	Surgery
Chemotherapy	MAP	MAP+I	MAP+I
Chemosensitivity	Good	Good	Poor
Outcome (Alive:Dead)	7:1	5:1	2:6

(図1)

3) 解析方法

DNA および RNA はそれぞれの凍結検体よりキットを用いて抽出された。いずれの検体も、パラフィン切片において腫瘍細胞のコンテンツが80%以上であることが確認されている。500ngのDNAがarray CGH解析に供された。プラットフォームはAgilent Human Genome CGH Microarray Kit 4x44Kを用いた。解析ソフトウェアはAgilent Genomic Workbenchを用いた。

また1ugのRNAよりcDNAが作成され、各遺

伝子に特異的な primer を用いて RT-PCR が施行された。

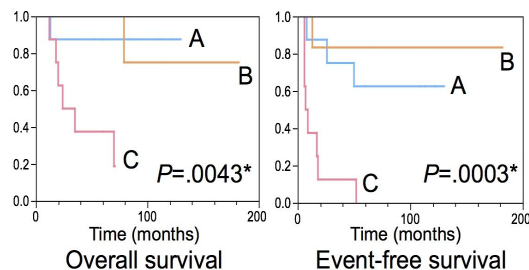
さらに次世代シーケンサーを用いた薬剤感受性関連遺伝子の変異検索を行った。これは薬剤低感受性症例を中心に 11 症例より抽出された DNA とその正常コントロールとしての末梢血由来 DNA を比較し、腫瘍特異的の変異を検索した。使用プラットフォームは 409 のがん関連遺伝子セットを搭載した Ion AmpliSeq Comprehensive Cancer Panel を用いた。

4. 研究成果

1) 各グループの治療成績

まず解析に先立ち、learning set 22 例を上記のごとく 3 グループに分類した際のそれぞれの治療成績を示す。

これらグループにおいても、化学療法奏効群 (Group A & B) は不奏効群 (Group C) に対し、全生存率および無病生存率ともに有意に良好であることが示された (図 2)。



(図 2)

2) 全骨肉腫症例に共通して見られるコピー数異常

全 22 例において高頻度にコピー数異常が認められた共通の領域は以下の通りであった。これらの領域は、17p gain や 8q gain、また 13q loss など、過去の骨肉腫に関する報告と重複するものも多く見られ、これらの領域が骨肉腫の tumorigenesis に関与する可能性が示唆された (表 1)。

Alteration	Frequency	Key genes
Gain 17p11.2-12	68-82%	PMP22, COPS2
1p	59-68%	SKI, JUN, NRAS
8q	50-68%	MYC, RECQL4
Loss 13q12.12-31	55-64%	RB1
9p21.3-22.3	55-59%	CDKN2A/B
10q21.1-26.3	50-59%	PTEN, FGFR2

(表 1)

3) 各グループを分別するゲノムマーカー array CGH の手法で集められたデータから、Differential aberration analysis の方法により、Group A と Group B&C を分別するゲノムマーカー (Marker X) および Group A&B と Group C を分別するゲノムマーカー (Marker Y) を抽出した (表 2)。これらのマーカー領

域には、これまでに骨肉腫関連遺伝子候補が多く含まれていた。特に薬剤不奏効群の predictive marker となる領域には、これまでに骨肉腫の tumorigenesis や他の癌腫での薬剤抵抗性に関与することが報告されている遺伝子群が内包されており、これらの遺伝子が骨肉腫においても重要な機能を司っている可能性が示唆された。

Marker X (A vs BC)

Alteration	A	BC	P-value	Key gene
2q33.1 loss	7/8	3/14	.00464	ERBB4
3q13.31 loss	6/8	2/14	.00832	LSAMP
4qcen gain	6/8	2/14	.00832	IGFBP7
16pter loss	5/8	0/14	.00213	-

Marker Y (AB vs C)

Alteration	AB	C	P-value	Key gene
6p12.1 gain	0/14	4/8	.00957	-
9q34.12 loss	0/14	4/8	.00957	NOTCH1
12q13.1 amp	0/14	4/8	.00957	CDK4
19pter loss	0/14	4/8	.00957	-

(表 2)

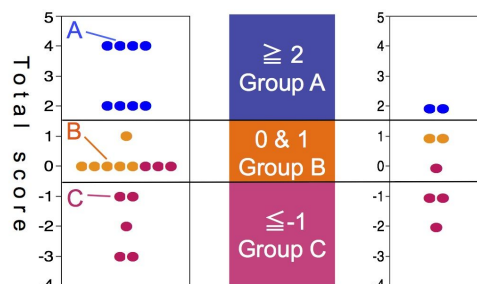
4) 化学療法奏効性予測モデルの作成

上記の結果から、それぞれの化学療法奏効性をもっとも反映されるようなスコアリングシステムを作成した。

これは、Marker X、Y をそれぞれ +1、-1 とし、それぞれのマーカーの存在から合計点を算出、これによるグルーピングが実際の化学療法奏効性とどれだけ相関があるかを検証した。

その結果、learning set 22 例においては、0 および 2 点が Group A、B、C の 3 群を分ける閾値として設定することでこれら 3 群を分別することができた。

さらに validation set 8 例による独立した検証実験が行われたところ、本スコアリングシステムは上記 8 例をそれぞれの化学療法感受性を示す群に高い精度をもって分別することができた (図 3)。以上より、本化学療法奏効性予測モデルの有用性が検証された。



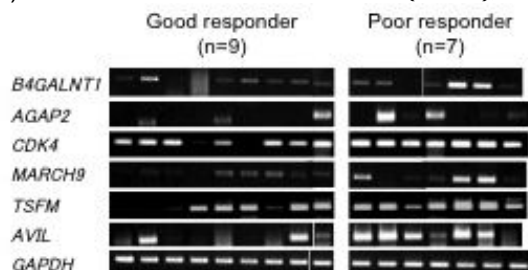
Learning set (n=22) Validation set (n=8)

(図 3)

5) 12q13 遺伝子群の発現解析

上記の中で特に化学療法奏効性と強い関連を持った 12q13 領域において、本領域内のがん関連遺伝子の発現解析を行った。18 遺伝子

それぞれの primer set を作成し、RT-PCR で good responder 群(Group A & B)と poor responder 群(Group C)との2群間比較を行った。その結果、これらの遺伝子の多くは12q13領域の増幅を示す poor responder 群(Group C)において比較的発現が高かった(図4)。



(図4)

6) 次世代シーケンサーによる変異解析
 これまでに11症例において次世代シーケンサーによる変異解析を行った。Total read 9.3G base、mean read length 110bp、average coverage 約1500(98.9%)と良好なシーケンスが達成されており、この結果153のSNV候補が抽出された(5%以上の頻度で抽出)。これは1検体あたり13.9個となる。これまでに3つの新規骨肉腫関連変異候補を同定しており、これらは転写因子やチロシンキナーゼファミリー遺伝子を含む。

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文](計1件)

Iwata S, Ishii T, Kawai A, Hiruma T, Yonemoto T, Kamoda H, Asano N, Takeyama M. Prognostic Factors in eElderly Osteosarcoma Patients: A Multi-institutional Retrospective Study of 86 Cases. Ann Surg Oncol 21,263-268,2014

[学会発表](計9件)

第44回日本整形外科学会骨・軟部腫瘍学術集会(2011.7.14 京都) Genomic approachによる骨肉腫の化学療法感受性予測. 岩田慎太郎、大平美紀、上條岳彦、米本司、石井 猛、舘崎慎一郎、中川原章

第70回日本癌学会総会(2011.10.5 名古屋) Genomic approach to the prediction of chemotherapy sensitivity in osteosarcoma. Iwata S, Ohira M, Ishii T, Yonemoto T, Hagiwara Y, Tatzaki S, Nakagawara A

2012 The Connective Tissue Oncology Society Annual Meeting (2012.11.14-17

Prague, Czech) Genomic predictor of response to preoperative chemotherapy in patients with pediatric osteosarcoma. Iwata S, Ohira M, Ishii T, Tatzaki S, Nakagawara A

第54回日本小児血液・がん学会学術集会(2012.12.1-2 横浜) ゲノム解析による骨肉腫患者の至適化学療法予測システム. 岩田慎太郎、大平美紀、米本司、石井 猛、鴨田博人、中川原章

American Association for Cancer Research Annual Meeting 2012 (2012.3.31-4.4 Chicago, USA) Genomic approach to the prediction of chemotherapy sensitivity in osteosarcoma. Iwata S, Ohira M, Kamijo T, Ishii T, Tatzaki S, Nakagawara A

American Association for Cancer Research Annual Meeting 2013 (2012.4.6-10 Washington DC, USA) Genomic predictors of response to preoperative chemotherapy in patients with pediatric osteosarcoma. Iwata S, Ohira M, Yonemoto T, Ishii T, Kamoda H, Nakagawara A

第72回日本癌学会総会(2013.10.3-5 横浜) ゲノム解析による小児骨肉腫患者の至適化学療法予測システム. 岩田慎太郎、大平美紀、石井 猛、影山肇、片山稔、横井左奈、永瀬浩喜、米本司、中川原章

第51回日本癌治療学会学術集会(2013.10.24-26 京都) ゲノム解析の手法を用いた小児四肢発生骨肉腫患者の至適化学療法予測システムの確立. 岩田慎太郎、大平美紀、石井 猛、影山肇、片山稔、横井左奈、永瀬浩喜、米本司、中川原章

AACR Special Conference on Pediatric Cancer at the Crossroads: Translating Discovery Into Improved Outcomes (2013.11.3-6 San Diego, USA) Characterization of genomic alterations in pediatric osteosarcoma with differential chemosensitivities: Construction of genome-based prediction system using preoperative biopsy samples. Iwata S, Yonemoto T, Kageyama H, Yokoi S, Nagase H, Nakagawara A, Ishii T, Ohira M

〔図書〕(計 1 件)

岩田慎太郎、大平美紀、米本司 5. 骨肉腫におけるゲノム解析の現状と未来 先端医療シリーズ 44 「臨床医のための最新整形外科」(平澤泰介)、先端医療技術研究所、151-154、2013 (分担執筆)

〔産業財産権〕

○ 出願状況(計 0 件)

取得状況(計 0 件)

6. 研究組織

(1) 研究代表者

岩田慎太郎(千葉県がんセンター整形外科
医長)

研究者番号: 90549685

(2) 研究分担者

無し

(3) 連携研究者

大平美紀(千葉県がんセンター研究所 がんゲノム研究室長)

研究者番号: 20311384