

平成 30 年 5 月 11 日現在

機関番号：13901

研究種目：基盤研究(B) (一般)

研究期間：2014～2017

課題番号：26293334

研究課題名(和文) デスモイド腫瘍の変異解析と新規治療アルゴリズムの確立にむけた研究

研究課題名(英文) Mutation analysis for desmoid type fibromatosis and research for the establishment of a novel treatment algorithm

研究代表者

西田 佳弘 (Nishida, Yoshihiro)

名古屋大学・医学系研究科・准教授

研究者番号：50332698

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 9,800,000円

研究成果の概要(和文)：デスモイド腫瘍線維腫症(DF)における遺伝子変異の特定、変異型別の腫瘍原性・薬物応答の解明：平成29年度までに70例以上のDFに対して、CTNNB1の変異部位を解析し、wild type、41A、45F、45P以外の変異部位を特定した。メロキシカムの治療成績と遺伝子変異型との関連、単純切除の成績と遺伝子変異型との関連を明らかにした。メロキシカムおよび低用量抗癌剤治療効果に関するゲノムワイド関連解析を実施し、低用量抗癌剤治療の効果に関連するゲノム候補を挙げた。デスモイドマウスモデルとしてAPC欠損マウスを用いて実施予定とした。DFに対する診療アルゴリズムを作成し、日本整形外科学会にて承認された。

研究成果の概要(英文)：CTNNB1 analyses were achieved in over 70 cases with pathologically diagnosed as desmoid-type fibromatosis (DF). Mutational status was 41A, 45F and 45P in order of descending prevalence. Relationship between CTNNB1 mutation analysis and clinical outcome of meloxicam or simple resection was determined. Based on the results of these studies, three English papers were accepted. According to the evidence of these study, treatment algorithm was established and approved by Japanese Orthopaedic Association. This algorithm is used for establishment of clinical care guideline for DF. Genome wide association study revealed that gene X is related to the clinical outcome of low dose chemotherapy for DF. APC deficient mice is obtained and subjected to the experiment for DF-development model.

研究分野：整形外科学

キーワード：デスモイド CTNNB1 変異 アルゴリズム

### 1. 研究開始当初の背景

デスマイド型線維腫症は良悪性中間型腫瘍で、遠隔転移をしないため、生命を脅かすことはきわめて稀であるが、手術後のきわめて高い再発率と局所浸潤性により、患者の機能障害を高率に引き起こす。-カテニンの遺伝子変異が70-80%に認められ、発症原因とされるが、発症に至る明確なメカニズムはわかっていない。申請者らは、デスマイド腫瘍に対する広範切除の治療成績が不良であることを報告し (Shido, Nishida et al. Arch Orthop Traum Surg 2009)、他国からの報告も同様であることを確認した。この結果により当施設では2003年以降治療方針を変更し、デスマイド型線維腫症発症のメカニズムにCOX-2が関与することから、選択的COX-2阻害剤であるメロキシカムによる治療を前向きに全例実施し、良好な治療成績であることを報告した (Nishida et al. J Clin Oncol 2010)。この内容はMedscapeから取材を受け、配信された (COX-2 Inhibitor Potential Treatment for Extraabdominal Desmoid Tumors; <http://www.medscape.com/viewarticle/714621>)。

当施設におけるメロキシカム治療抵抗性のデスマイド型線維腫症に対してはメソトレキセートとビンブラスチンによる低用量抗癌剤治療の有効性 (2014 American Academy of Orthopaedic Surgeons, New Orleans, USA)、症例を選んで実施する辺縁切除による手術の有効性 (17th International Society of Limb Salvage, Bologna, Italy, 2013) (第51回癌治療学会、シンポジウム - 依頼 -、京都、2013) を報告した。海外を含めた他施設からは抗女性ホルモン剤、リザベンなどの保存治療を目的とした薬物治療、他種の抗癌剤治療、分子標的治療薬の報告があるが、治療効果は高くなく、また治療効果を予測する方法はない。

したがって、デスマイド型線維腫症に対する診療アルゴリズムは確立しておらず、受診した施設ごとに異なった治療方針を提示されることが多く、不適切な治療を受ける患者が少なくない。

### 2. 研究の目的

本研究は、まだ解明されていない -カテニンの遺伝子変異による薬物応答性の差異・患者に対する各種治療の効果予測とともにドラッグリポジショニングによる新規デスマイド治療薬の同定を行い、最終的には変異に基づいた新しいデスマイド治療のアルゴリズムを確立するための基礎研究を行う。研究期間内に以下のことを明らかにする。

(1) 既保存デスマイド検体あるいは新規患者の生検組織を使用して、-カテニン遺伝子変異の型を特定する。新規変異型も予備実験でみついている。

(2) -カテニン各遺伝子変異+と-の細胞株を新規に樹立し、各細胞株の腫瘍原性を特定

する。また各細胞株の薬物応答性を解析する。

(3) 上記細胞株を使用して、既存薬剤を用いたドラッグリポジショニング法により、デスマイド腫瘍に対する新規治療薬を発見する。

(4) メロキシカム治療における効果良好群と不良群間での薬理作用の違いをゲノムワイド関連解析 (GWAS) によって解析する。副次的目的として GWAS により、デスマイド発症の感受性遺伝子を特定する。

(5) 手術・メロキシカム・メソトレキセートとビンブラスチン治療効果と -カテニン遺伝子変異との関連を解析し、デスマイド腫瘍の新規治療アルゴリズムを確立する。

### 3. 研究の方法

(1) デスマイド型線維腫症における遺伝子変異の特定、変異型別の腫瘍原性の解明

保存されているデスマイド腫瘍の生検・手術検体および新規患者の組織を使用して遺伝子変異を特定する。遺伝子は凍結保存検体から抽出 (Roche 社 High Pure PCR® Template Preparation Kit) し、保存してあるパラフィン包埋標本からは脱パラフィン処理後、削り取ったサンプルを用いて抽出する (Roche High Pure PCR Template Preparation Kit)。DNA integrity をハウスキーピング遺伝子 (GAPDH) によって確認後、特異的プライマーを用いて蛍光ダイレクトシークエンシングにより -カテニン中の変異部位を特定する。

院内 IRB でデスマイド型線維腫症に関する研究の承認を得る。患者からのインフォームドコンセントを得た上で、細胞株を樹立し、各細胞株の遺伝子変異を特定し、腫瘍原性を明らかにする。

(2) 手術・各種薬物治療効果と変異部位との関連、GWAS 解析

前向き薬物治療 (メロキシカム、メソトレキセートとビンブラスチン) の臨床試験のデータを本研究期間内でも一層蓄積し (西田、小澤、新井が担当) 前記 1.a. で特定した遺伝子変異型と治療奏功性の関連を解析する。

これまでに実施した手術の組織検体を使用して実施する変異解析結果 (1.a. にて実施) と手術治療成績 (再発の有無) との関連を明らかにする。手術による再発有り群と無し群に分け、遺伝子変異型との関連を特定、および再発に関する生存率を Kaplan-Meier 法で算定し、遺伝子変異型間の生存率の差を logrank 法にて有意差検定する。

デスマイド腫瘍患者に前向き臨床試験として投与されたメロキシカムの DNA が保存されている。薬物治療効果に関する GWAS 解析を実施する。理化学研究所の研究分担者である筈田によって実施される。メソトレキセートとビンブラスチンによる低用量化学療法において薬効のある群とない群に分け、薬効の違いについても GWAS により明らかにする。

(3) 新規治療薬の開発

薬物リポジショニング法により既存薬ライ

ブラリーからオフラベル新規治療薬を開発する。申請者がすでに樹立したデスモイド型線維腫症細胞株 2 種（ $\beta$ -カテニン変異あり、なし）を使用し、コントロールとして正常のヒト線維芽細胞（Detroit 551）を用いて、効果のある既存薬を特定する。

(4)デスモイド型線維腫症に対する診療アルゴリズムの確立

CTNNB1 変異型と各種治療成績との関連解析結果から、本邦初の診療アルゴリズムを確立する。

#### 4. 研究成果

(1)患者からインフォームドコンセントを取得し、腫瘍組織から DNA を抽出。70 例以上において CTNNB1 の変異解析を実施した。最多は T41A 変異型であり、順に S45F、S45P と続いた。まずは前向きにメロキシカム治療を実施した 31 例について、 $\beta$ -カテニン免疫染色結果と治療効果には有意な関連があることが明らかとなった（Hamada, Nishida et al, Tumor Biol, 2014）。

各種変異型の培養細胞系を樹立した（S45F、T41A、wild type）。すべての培養細胞で  $\beta$ -カテニンの核内染色陽性像が観察され、特に S45F 変異型を有する細胞で強く見られた。3 種の培養細胞すべてでメロキシカムによる増殖抑制が見られ、Wnt/  $\beta$ -catenin pathway の下流遺伝子の活性化状態は変異型によって異なっていた（Hamada, Nishida et al, Cancer Med, 2016）。

(2)33 例の CTNNB1 変異解析を実施した症例について、S45F 変異型は有意にメロキシカム治療効果が不良であることが明らかとなった（Hamada, Nishida et al, PLoS One 2014）。

Table. S45F mutation status and efficacy of meloxicam

	S45F (+)	S45F (-)
Favorable group	0	20
Unfavorable group	4	9

メソトレキセートとピンブラスチンによる低用量化学療法の有用性を示し、治療効果と CTNNB1 変異型との間には関連がないことを明らかにした。これはメロキシカムとは異なり、変異型に関係なく（ $P=0.52$ ）メソトレキセートとピンブラスチン治療は効果が期待できる結果となった（Nishida et al, Int J Clin Oncol 2015）。

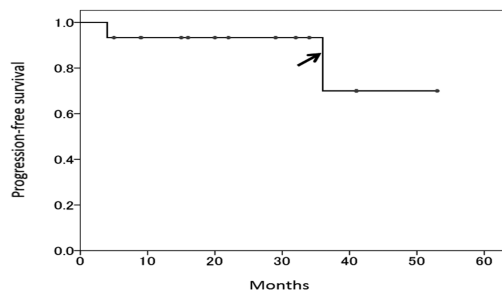


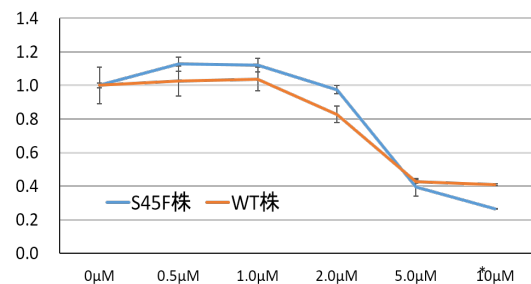
図 1. メソトレキセートとピンブラスチン治療に関する progression-free survival

デスモイド型線維腫症に対して従来の手術治療は広範切除であったが、我々の施設では 10 年以上前より症例を選択して辺縁切除による手術を実施している。13 例と症例数は少ないが CTNNB1 変異型、発生部位などの臨床因子と手術成績の関連を明らかにした。再発例は 1 例のみであり、従来の報告よりきわめて低い再発率であった。またこの 1 例は変異型が S45F であった。症例数は少ないが、体幹発生で画像上浸潤性がなく、S45F 以外の変異型であれば辺縁切除による手術でも良好な成績が期待できる可能性を示した（Nishida et al, Oncol Lett, 2016）。

メロキシカムおよびメソトレキセートとピンブラスチン療法に関して GWAS 解析を実施した。メロキシカム responder 27 例、non-responder 26 例について 100 種類の薬物動態関連遺伝子のターゲットシーケンシングを実施した。2 群間で有意差（ $P<0.05$ ）の見られる 8 関連遺伝子を同定した。メソトレキセートとピンブラスチンについては responder 8 例と non-responder 12 例との間でも同様に 100 種類の薬物動態関連遺伝子のターゲットシーケンシングを実施した。1 遺伝子 X が有意な候補として同定された。

(3)ドラッグレポジショニング法により、monolayer culture で有意に腫瘍抑制効果を持つ薬剤 Y を同定した。

図 2. 薬物 Y による S45F、WT 細胞に対する抗腫瘍効果



しかし、デスモイド自然発症マウスモデルの確立に難渋し、in vivo のデータ取得にはいたっていない。

(4)デスモイド型線維腫症に対する診療アルゴリズムについては、まず診断が重要である。CTNNB1 変異型解析は治療成績推測にも重要である可能性を示したが（Hamada, Nishida et al, PLoS One 2014）（Nishida et al, Int J Clin Oncol 2015）（Nishida et al, Oncol Lett, 2016）, 診断確定にも重要であることを踏まえて診療アルゴリズムを確立した。この内容は日本整形外科学会骨軟部腫瘍委員会および日本整形外科学会理事会の承認を経て、日本整形外科学会ホームページおよび日整会ニュースに掲載された（<https://www.joa.or.jp/public/bone/algorithm.html>）。

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 5 件)

Simple resection of truncal desmoid tumors: A case series.  
Nishida Y, Tsukushi S, Urakawa H, Hamada S, Kozawa E, Ikuta K, Ishiguro N  
Oncol Lett. 2016 Aug;12(2):1564-1568. doi: 10.3892/ol.2016.4792 査読有

Characteristics of cultured desmoid cells with different CTNNB1 mutation status.  
Hamada S, Urakawa H, Kozawa E, Arai E, Ikuta K, Sakai T, Ishiguro N, Nishida Y.  
Cancer Med. 2016 Feb;5(2):352-60. doi: 10.1002/cam4.582. 査読有

Low-dose chemotherapy with methotrexate and vinblastine for patients with desmoid tumors: relationship to CTNNB1 mutation status.  
Nishida Y, Tsukushi S, Urakawa H, Hamada S, Kozawa E, Ikuta K, Ando Y, Ishiguro N.  
Int J Clin Oncol. 2015 Dec;20(6):1211-7. doi: 10.1007/s10147-015-0829-0. 査読有

Nuclear expression of  $\beta$ -catenin predicts the efficacy of meloxicam treatment for patients with sporadic desmoid tumors.  
Hamada S, Urakawa H, Kozawa E, Futamura N, Ikuta K, Shimoyama Y, Nakamura S, Ishiguro N, Nishida Y.  
Tumour Biol. 2014 May;35(5):4561-6. doi: 10.1007/s13277-013-1600-7. 査読有

CTNNB1 S45F mutation predicts poor efficacy of meloxicam treatment for desmoid tumors: a pilot study.  
Hamada S, Futamura N, Ikuta K, Urakawa H, Kozawa E, Ishiguro N, Nishida Y.  
PLoS One. 2014 May 1;9(5):e96391. doi: 10.1371/journal.pone.0096391. 査読有

[学会発表](計 23 件)

21st Annual Meeting Connective Tissue Oncology Society  
Lisbon (Portugal) 2016.11.9-12 (Day2)  
Nishida Y, Kawai A, Toguchida J, Ogose A, Ae K, Kunisada T, Matsunobu T, Hamada S, Sakai T.  
Clinical features and treatment outcome of desmoid-type fibromatosis based on data of the bone and soft tissue tumor registry in japan. (Poster)

第 31 回日本整形外科学会基礎学術集会

2016.10.13-14(Day1) 福岡  
酒井 智久, 濱田 俊介, 生田 国大, 大田 剛広, 浦川 浩, 小澤 英史, 石黒 直樹, 西田 佳弘  
デスモイド型線維腫症における非リン酸化  $\beta$ -catenin 免疫染色の有用性(ポスター)

第 49 回日本整形外科学会骨・軟部腫瘍学術集会 2016.7.14-15(Day2) 東京  
酒井 智久, 濱田 俊介, 浦川 浩, 小澤 英史, 生田 国大, 石黒 直樹, 西田 佳弘  
術後再発を来した腹腔外発生デスモイド型線維腫症に対する治療成績

The 29th annual meeting of the European Musculo Skeletal Oncology Society (EMSOS), La Baule (France) 2016.5.25-27  
Nishida Y.  
R1 resection for selected patients with extra-peritoneal desmoid-type fibromatosis. (Poster)

第 89 回日本整形外科学会学術総会 2016.5.12-15(Day3) 横浜  
西田 佳弘, 戸口田 淳也, 生越 章, 阿江 啓介, 国定 俊之, 松延 知哉, 濱田 俊介, 酒井 智久, 川井 章  
日整会骨・軟部腫瘍登録データに基づいたデスモイド型線維腫症の診療実態・治療成績調査(ポスター)

The 11th Meeting of The Asia Pacific Musculoskeletal Tumour Society, Singapore, 2016.4.21-23(Day3)  
Nishida Y, Urakawa H, Hamada S, Kozawa E, Ikuta K, Sakai T, Ishiguro N.  
Planned Simple Resection for Selected Patients with Desmoid-Type Fibromatosis in the Conservative Treatment Algorithm.

第 4 回 Rare Cancers Meeting、東京 2016.1.28  
西田 佳弘  
デスモイド型線維腫症:「Enigma」な腫瘍に対する診療方針

第 30 回日本整形外科学会基礎学術集会 2015.10.22-23(Day1) 富山  
濱田 俊介, 大河原 美静, 浦川 浩, 小澤 英史, 生田 国大, 大野 欽司, 石黒 直樹, 西田 佳弘  
デスモイド腫瘍に対するオフラベル治療薬の探索

2015 DTRF International Desmoid Tumor Research Workshop, Philadelphia (USA) 2015.10.18  
Nishida Y.  
Planned simple resection for selected patients with extra-peritoneal desmoid

tumors.

第 48 回日本整形外科学会骨・軟部腫瘍学術集会 2015.7.9-10(Day2) 高松  
瀧田 俊介, 筑紫 聡, 浦川 浩, 小澤 英史,  
生田 国大, 石黒 直樹, 西田 佳弘  
デスマイド腫瘍における MRI の信号強度とメロキシカム治療反応性の相関

第 48 回日本整形外科学会骨・軟部腫瘍学術集会 2015.7.9-10(Day2) 高松  
西田 佳弘, 筑紫 聡, 浦川 浩, 瀧田 俊介,  
小澤 英史, 生田 国大, 石黒 直樹  
メロキシカム治療抵抗性デスマイド腫瘍患者に対するメソトレキセートとピンプラスチンによる低用量化学療法

51st Annual Meeting of the American Society of Clinical Oncology  
Chicago (USA) 2015.5.29-6.2  
Nishida Y, Tsukushi S, Urakawa H, Hamada S, Kozawa E, Ikuta K, Ando Y, Ishiguro N.  
Low-dose chemotherapy with methotrexate and vinblastine for Japanese patients with desmoid tumors: Relationship to CTNNB1 mutational status. (Publication only)  
Citation: J Clin Oncol 33, 2015 (suppl; abstr e21524)

第 88 回日本整形外科学会学術総会  
2015.5.21-24(Day1) 神戸  
瀧田 俊介, 西田 佳弘, 筑紫 聡, 浦川 浩,  
小澤 英史, 生田 国大, 石黒 直樹  
孤発性デスマイド腫瘍の運動力学的環境とメロキシカムの治療効果との相関性(ポスター)

2015 Annual Meeting of American Academy of Orthopaedic surgeons  
Las Vegas (USA) 2015.3.24-28 (Day1)  
Nishida Y, Tsukushi S, Hamada S, Urakawa H, Kozawa E, Ikuta K, Ishiguro N.  
Treatment Algorithm for Sporadic Desmoid Tumors Based on CTNNB1 Mutational Status

愛知県がんセンター研究所特別招聘セミナー,名古屋 2015.3.17  
西田 佳弘  
デスマイド腫瘍に対する治療アルゴリズムの確立に向けて

19th Annual meeting Connective Tissue Oncology Society  
Berlin (Germany) 2014.10.15-18(Day2)  
Nishida Y, Hamada S, Urakawa H, Ikuta K, Tsukushi S, Kozawa E, Ota T, Ishiguro N  
CTNNB1 mutational status directed treatment modality for patients with extra-peritoneal desmoids tumors (Poster)

第 123 回中部日本整形外科災害外科学会・

学術集会 2014.10.3-4(Day2) 名古屋  
瀧田 俊介, 浦川 浩, 小澤 英史, 筑紫 聡,  
石黒 直樹, 西田 佳弘  
CTNNB1( -catenin)遺伝子変異によるデスマイド腫瘍に対するメロキシカム治療の効果予測

第 29 回日本整形外科学会基礎学術集会  
2014.10.9-10(Day2) 鹿児島  
瀧田 俊介, 浦川 浩, 新井 英介, 小澤 英史,  
二村 尚久, 生田 国大, 石黒 直樹, 西田 佳弘  
CTNNB1 変異型別の腹壁デスマイド細胞株の樹立

第 47 回日本整形外科学会骨・軟部腫瘍学術集会 2014.7.17-18(Day2) 大阪  
西田 佳弘, 筑紫 聡, 浦川 浩, 小澤 英史,  
新井 英介, 二村 尚久, 瀧田 俊介, 生田 国大, 石黒 直樹  
腫瘍径の大きなデスマイド腫瘍に対する治療アルゴリズム

第 47 回日本整形外科学会骨・軟部腫瘍学術集会 2014.7.17-18(Day2) 大阪  
瀧田 俊介, 浦川 浩, 新井 英介, 小澤 英史,  
二村 尚久, 生田 国大, 筑紫 聡, 石黒 直樹, 西田 佳弘  
デスマイド腫瘍に対するメロキシカム治療の効果予測 CTNNB1( -catenin)遺伝子変異による

②(Invited lecture) Catholic University International Symposium of musculoskeletal Oncology and Case Conference of KBJTS, Seoul, Korea 2014.6.12  
Nishida Y.

Treatment algorithm for patients with desmoid tumors: Key to an "enigma" tumor

②American Society of Clinical Oncology Annual '14 Meeting  
Chicago (USA) 2014.5.30-6.3  
Nishida Y, Hamada S, Tsukushi S, Urakawa H, Ishiguro N, Ando Y.  
MTX and VBL treatment for patients with desmoid tumors resistant to meloxicam treatment: Relationship between efficacy and CTNNB1 mutation status. (Publication only)

③第 87 回日本整形外科学会学術総会  
2014.5.22-25(Day4) 神戸  
西田 佳弘, 筑紫 聡, 浦川 浩, 小澤 英史,  
新井 英介, 二村 尚久, 瀧田 俊介, 生田 国大, 石黒 直樹  
デスマイド治療のアルゴリズム メロキシカム抵抗性デスマイド腫瘍

〔図書〕(計 3 件)

トピックス：デスモイド型線維腫症に対する薬物療法

西田 佳弘

今日の整形外科治療指針 第7版 編集：土屋弘行他

東京：医学書院 Page204 (2016.5)

デスモイド型線維腫症 6. 骨・軟部腫瘍および腫瘍類似疾患

西田 佳弘

今日の整形外科治療指針 第7版 編集：土屋弘行他

東京：医学書院 Page203 (2016.5)

Lesson 5. 肉腫化学療法の組織別治療戦略を理解する 6. デスモイド

西田 佳弘

肉腫化学療法マスタークラス 編集：川井 章

東京：南山堂 Page366(245-249) 2015.6

〔産業財産権〕

出願状況(計 0 件)

取得状況(計 0 件)

〔その他〕

ホームページ等

デスモイド型線維腫症に対する診療アルゴリズム  
日本整形外科学会のホームページ  
(<https://www.joa.or.jp/public/bone/algorithm.html>)

日本整形外科学会広報室ニュース第109号に掲載

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

西田 佳弘 (NISHIDA, Yoshihiro)

名古屋大学・医学系研究科・准教授

研究者番号：50332698

### (2) 研究分担者

蒔田 泰誠 (MUSHIRODA, Taisei)

国立研究開発法人理化学研究所・生命医科学研究センター・チームリーダー

研究者番号：40392146

研究分担者

浦川 浩 (URAKAWA, Hiroshi)

名古屋大学・医学部附属病院・病院講師

研究者番号：60584753

研究分担者

新井 英介 (ARAI, Eisuke)

名古屋大学・医学部附属病院・病院助教

研究者番号：40612841

研究分担者

小澤 英史 (KOZAWA, Eiji)

愛知がんセンター(研究所)・分子病態学部・研究員

研究者番号：60635572

研究分担者

生田 国大 (IKUTA, Kunihiro)

名古屋大学・医学部附属病院・医員

研究者番号：40732657

研究分担者

濱田 俊介 (HAMADA, Shunsuke)

名古屋大学・医学部附属病院・医員

研究者番号：90747289