

平成 30 年 6 月 5 日現在

機関番号：34419

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2015～2017

課題番号：15K09200

研究課題名(和文) 悪性胸膜中皮腫に対する癌幹細胞を標的とした新規治療法の開発

研究課題名(英文) Development of a novel treatment targeting cancer stem cells for malignant pleural mesothelioma

研究代表者

福岡 和也 (FUKUOKA, Kazuya)

近畿大学・医学部附属病院・教授

研究者番号：80305721

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,800,000円

研究成果の概要(和文)：アスベスト曝露に起因する悪性胸膜中皮腫は予後不良の難治性腫瘍であり、標準的治療法は未だ確立されていない。本研究では、悪性胸膜中皮腫に対して、次世代シーケンサーを用いた遺伝子発現解析を実施し、分子標的治療薬のターゲットとなる遺伝子変異を探索した。細胞株および胸膜腫瘍組織に共通して認められた遺伝子変異の中で、癌幹細胞の生存と増殖に関与するNOTCH1およびFBXW7、他疾患の原因遺伝子とされるTSC1およびBRCA2は、新規の治療標的となり得る可能性が示唆された。今後、これらの遺伝子や癌幹細胞を標的とした悪性胸膜中皮腫に対する新しい治療法の開発が期待される。

研究成果の概要(英文)：Malignant pleural mesothelioma (MPM) is an aggressive and highly-refractory tumor caused by asbestos exposure. To date, the standard treatment for MPM remains to be established. In the present study, to explore the gene mutations for the targets of molecular targeted therapy against MPM, we performed the gene expression analyses using next-generation sequencer. Of the gene mutations which were commonly identified in both MPM cell lines and pleural tumor tissues, NOTCH1, FBXW7, TSC1, and BRCA2 might be novel targets for molecular targeted therapy. NOTCH1 and FBXW7 are involved in survival and proliferation of cancer stem cells (CSCs). TSC1 and BRCA2 are causing genes of other genetic malignancies, on which existing molecular targeted agents show the anti-tumor activities. The present study indicated that these genes and CSCs can be applied for the promising targets of novel molecular targeted therapy against MPM.

研究分野：呼吸器内科学

キーワード：悪性胸膜中皮腫 遺伝子発現解析 癌幹細胞

1. 研究開始当初の背景

悪性胸膜中皮腫は予後不良の難治性腫瘍であり、その発生率および死亡数の増加が予想されている。本腫瘍に対する標準的治療法は未だ確立されておらず、手術療法によって腫瘍が完全切除されても治癒に至る症例は極めて少ない。腫瘍縮小および症状緩和を目的として化学療法が実施されるが、化学療法が生存期間の延長に寄与するか否かは明らかにされていない。また、増殖因子シグナル伝達阻害薬、血管新生阻害薬、DNA ヒストン脱アセチル化酵素阻害薬なども有効性を証明できなかった。したがって、悪性胸膜中皮腫の治療成績向上には新規治療法の開発が極めて重要な課題である。我々は、アデノシン (Nogi, Fukuoka, et al. Cell Physiol Biochem, 2012) やスフィンゴシン (Okuwa, Fukuoka, et al. Cell Physiol Biochem, 2012) などの生理活性物質が、悪性中皮腫細胞に対してアポトーシスを誘導することを報告してきたが、実際の治療応用には、更なる検討が必要である。

一方、悪性胸膜中皮腫における遺伝子異常に関しては、p16, neurofibromatosis type2 (NF2)、BRCA1 associated protein-1 (BAP1) などの癌抑制遺伝子の不活化がその発生や進展に重要な役割を果たす。我々は、悪性胸膜中皮腫症例から樹立した細胞株や組織検体を用いて、染色体 3p21 領域の高頻度欠失 (Yoshikawa, Fukuoka, et al, Int J Oncol, 2011)、上皮型悪性胸膜中皮腫に特異的な BAP1 の体細胞変異 (Yoshikawa, Fukuoka, et al. Cancer Sci, 2012)、クロマチン再構成に参与する mSWI/SNF の体細胞変異 (Yoshikawa, Fukuoka, et al. Int, J Cancer, 2014) などの遺伝子異常を報告してきた。同様に、NF2 の変異または欠失を細胞株の 80% において確認した。NF2 遺伝子産物である merlin は、その下流シグナル分子である焦点接着キナーゼ (focal adhesion kinase: FAK)

を制御することによって、細胞の接着、浸潤、運動性を調節する。NF2 が不活化した merlin 陰性の悪性中皮腫細胞では FAK 活性が上昇し、細胞運動性と浸潤性が亢進する。Weinberg らによって、FAK は癌細胞の自己複製能に関与し癌幹細胞の増殖と生存に必須のシグナル伝達経路であることが明らかにされたことから、癌幹細胞が FAK を介した悪性胸膜中皮腫の新しい治療標的となる可能性が示唆された。これらの知見をもとに、2014 年、わが国においても悪性胸膜中皮腫患者を対象とした FAK 阻害薬 defactinib の有効性を検討するグローバル第 Ⅲ 相試験 (COMMAND 試験) が開始された。本試験の目的は、標準的 1 次化学療法後に増悪を認めない症例に対して、プラセボ投与群と defactinib 投与群の両群間で生存期間を比較することによって、defactinib の有効性を評価することである。しかしながら、本試験では、defactinib が実際に標的とされる FAK および癌幹細胞に作用しているかを証明する POC (proof of concept) が検証されていないため、本薬剤が臨床導入されるには FAK および癌幹細胞に対する効果を分子および遺伝子レベルで解明しておくことが重要な課題とされた。

悪性胸膜中皮腫において明らかにされた頻度の高い遺伝子変異は全て癌抑制遺伝子であり、活性型の癌遺伝子変異の頻度は極めて低い。このため、ドライバー遺伝子変異をターゲットとする既存のチロシンキナーゼ阻害薬などの多くは有効性を示すことなく、悪性胸膜中皮腫に対して有効な分子標的治療法は未だ確立されていないのが現状である。

2. 研究の目的

我々は、これまでに肺癌、消化器癌、乳癌、原発不明癌などの固形癌患者を対象として、次世代シーケンサーを用いた遺伝子発現解

析によるクリニカルシーケンスを実施し、ゲノム情報に基づいた個別化医療を推進してきた豊富な実績を有する。本研究では、悪性胸膜中皮腫に対して、次世代シーケンサーを用いた遺伝子発現解析を実施し、抗癌剤感受性に関連する遺伝子異常や分子標的治療薬のターゲットとなるアクションナブルな遺伝子変異を探索するとともに、癌幹細胞を標的とした新しい治療法開発のための基盤を構築する。

3. 研究の方法

(1) 悪性胸膜中皮腫細胞株に対する細胞障害性抗癌剤の増殖抑制効果の検討

悪性胸膜中皮腫における抗癌剤感受性に関連する遺伝子異常を探索するために、抗中皮腫活性を有する細胞障害性抗癌剤の悪性胸膜中皮腫細胞株に対する増殖抑制効果をMTT assayにて検討した。ATCC (American Type Culture Collection)から入手した15種類の悪性胸膜中皮腫細胞株(Mero-14, -25, -41, -48a, -82, -83, -84, -95, NO36, ONE58, HMMME, ACC-MESO-1, ACC-MESO-4, JU77, LO68)に、cisplatin (CDDP), pemetrexed (PEM), gemcitabine (GEM)を72時間接触させ、各薬剤の50%増殖抑制濃度(IC₅₀値)を算出し、感受性を評価した。

(2) 悪性胸膜中皮腫細胞株および悪性胸膜中皮腫切除例の胸膜腫瘍組織(臨床検体)における遺伝子発現解析

15種類の悪性胸膜中皮腫細胞株(Mero-14, -25, -41, -48a, -82, -83, -84, -95, NO36, ONE58, HMMME, ACC-MESO-1, ACC-MESO-4, JU77, LO68)および広島大学病院腫瘍外科にて切除された悪性胸膜中皮腫13例の胸膜腫瘍組織から核酸を抽出し、次世代シーケンサーを用いて遺伝子発現解析を実施した。次世代シーケンサーは、ライフテクノロジー社製のIonProtonを使用した。遺伝子変異解析および融合遺伝子解析に

は、OncoPrint Comprehensive Assayを用いた。本アッセイでは、DNA解析によって、ターゲットを約170の癌遺伝子および癌抑制遺伝子に絞り込んだ解析を実施することができ、同様にRNA解析によって、22の融合遺伝子の発現解析が可能とされた。集積された遺伝子変異データを基に、疾患関連変異データ解析ソフトを用いて生物学的に重要と考えられる遺伝子変異を抽出した。

4. 研究成果

(1) 悪性胸膜中皮腫細胞株における各種細胞障害性抗癌剤に対する感受性

細胞株の中で、LO68は増殖速度が遅く評価不能であったため、これを除いた14種類の細胞株を用いて検討した。各細胞株に対する、細胞障害性抗癌剤のIC₅₀値は、CDDP 0.304 ~ 42.3 μM, PEM 0.102 ~ >100 μM, GEM 0.008 ~ >1 μMであり、悪性胸膜中皮腫細胞株は、各種細胞障害性抗癌剤に対して、異なる薬剤感受性パターンを示した(図1)。PEMに対する感受性の相違から、高感受性株(MESO4, NO36, ONE58, JU77, Mero-48a)と低感受性株(MESO1, HMMME, Mero-14, -25, -41, -82, -83, -84, -95)とに大別することができた。

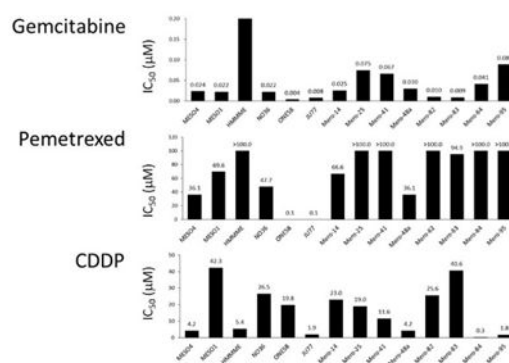


図1 細胞株に対する細胞障害性抗癌剤の増殖抑制効果

(2) 悪性胸膜中皮腫細胞株において認められた遺伝子変異

15種類の悪性胸膜中皮腫細胞株における解

析結果から、融合遺伝子は検出されなかった。4細胞株に遺伝子変異は認められず、11細胞株に合計18の遺伝子変異を認めた(図2)。1個の遺伝子変異を認めたものが6細胞株であったが、複数の遺伝子変異を有する細胞株も認められた(3変異:2細胞株、2変異:3細胞株)。遺伝子変異の内訳は、TP53が4細胞株(27%)と最も頻度が高く、BAP1が3細胞株(20%)、NOTCH1が2細胞株(13%)とこれに続いた。NF2は、1細胞株(7%)にのみ認められた。また、PEM高感受性株と低感受性株との比較では、PEMに対する感受性に影響を及ぼす遺伝子変異を同定することはできなかった。

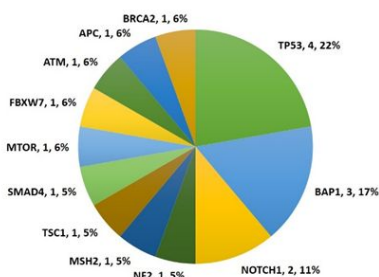


図2 細胞株において認められた遺伝子変異の内訳

(3)悪性胸膜中皮腫切除例の胸膜腫瘍組織(臨床検体)において認められた遺伝子変異

悪性胸膜中皮腫13例の胸膜腫瘍組織のうち、3例は解析が困難であり、10例から解析結果が得られた。細胞株での検討と同様に、融合遺伝子は検出されなかった。10例中2例には遺伝子変異を認めず、8例に合計18遺伝子変異を認めた(図3)。1個の遺伝子変異を認めたものが3例であったが、複数の遺伝子変異を有する症例も認められた(5変異:1例、3変異:2例、2変異:2例)。遺伝子変異の内訳は、BAP1が5例(50%)と最も頻度が高く、次いでNF2が2例(20%)であった。

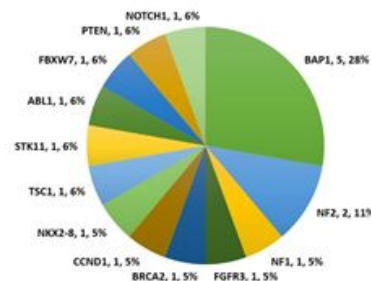


図3 腫瘍組織(臨床検体)において認められた遺伝子変異の内訳

悪性胸膜中皮腫細胞株と腫瘍組織(臨床検体)に共通して認められた遺伝子変異は、BAP1、NF2、NOTCH1、FBXW7、TSC1、BRCA2であった。この中で、BAP1およびNF2の遺伝子変異頻度に関しては、これまでの報告と概ね一致していた。その他の遺伝子変異は、今回の検討によって、悪性胸膜中皮腫において初めて明らかにされた新しい知見であった。NOTCH1を介するシグナル伝達経路は、癌幹細胞の自己複製能の維持に必要とされる。また、FBXW7は、癌幹細胞ニッチ形成に関与することから、これらの遺伝子は、悪性胸膜中皮腫に対する癌幹細胞を標的とした新しい治療法を開発する上で、重要な役割を果たす可能性が示唆された。一方、TSC1は、結節性硬化症の原因遺伝子のひとつであり、同遺伝子変異陽性腫瘍においては、mTORが活性化し、エベロリムスなどのmTOR阻害薬に対する感受性亢進の可能性が考えられる。また、BRCA2の遺伝子変異は、変異アレルの頻度などによって、体細胞変異であることが推察された。BRCA1および2遺伝子変異は、遺伝性乳癌・卵巣癌症候群において高頻度に認められ、同変異陽性腫瘍に対するオラパリブなどのポリADP-リボースポリメラーゼ(PARP)阻害薬の感受性亢進が期待されている。今回の検討から、TSC1およびBRCA2遺伝子が悪性胸膜中皮腫におけるアクションナブルな遺伝子変異の候補となる可能性が示唆された。

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 11 件)

1. 福岡和也. 悪性中皮腫のバイオマーカー - 可溶性メソテリン関連ペプチドを中心に -. 医学のあゆみ 2017; 263 (13): 1145-1150. 査読無し
2. 福岡和也. わが国におけるがん臨床研究の制度的基盤. 近畿大医誌 (Med J Kindai Univ) 2017; 42: 91-97. 査読有り
3. Shimizu T, Fukuoka K, Takeda M, Iwasa T, Yoshida T, Horobin J, Keegan M, Vaickus L, Chavan A, Padval M, Nakagawa K. A first-in-Asian phase 1 study to evaluate safety, pharmacokinetics and clinical activity of VS-6063, a focal adhesion kinase (FAK) inhibitor in Japanese patients with advanced solid tumors. Cancer Chemother Pharmacol, 2016; 77(5):997-1003. doi: 10.1007/s00280-016-3010-1. 査読有り
4. Hasegawa S, Okada M, Tanaka F, Yamanaka T, Soejima T, Kamikonya N, Tsujimura T, Fukuoka K, Yokoi K, Nakano T. Trimodality strategy for treating malignant pleural mesothelioma: results of a feasibility study of induction pemetrexed plus cisplatin followed by extrapleural pneumonectomy and postoperative hemithoracic radiation (Japan Mesothelioma Interest Group 0601 Trial). Int J Clin Oncol. 2016; 21(3):523-530. doi: 10.1007/s10147-015-0925-1. 査読あり
5. Fukuoka K. Small cell lung cancer with isolated unitonsillar metastasis successfully treated with chemotherapy. Arch Cancer Res, 2016; 4 (1): 62. (open access) 査読有り
6. 福岡和也. わが国における臨床研究をめぐる最近の動向. 近畿大医誌 (Med J Kindai Univ) 2016; 41: 69-75. 査読有り
7. 福岡和也. 新しく臨床導入された中皮腫血液診断バイオマーカー: 可溶性メソテリン関連ペプチド (SMRP). 生体の科学 2016; 67: 464-465. 査読無し
8. Krug LM, Kindler HL, Calvert H, Manegold C, Tsao AS, Fennell D, Öhman R, Plummer R, Eberhardt WEE, Fukuoka K, Gaafar RM, Lafitte J-J, Hillerdal G, Chu Q, Buikhuisen WA, Lubiniecki GM, Sun X, Smith M, Baas P. Vorinostat in patients with advanced malignant pleural mesothelioma who have progressed on prior chemotherapy (VANTAGE-014): a phase 3, randomized, double-blind, placebo-controlled trial. Lancet Oncol, 2015; 16(4): 447-456. doi: 10.1016/S1470-2045(15)70056-2 査読あり
9. Nishimura Y, Kumagai-Takei N, Matsuzaki H, Lee S, Maeda M, Kishimoto T, Fukuoka K, Nakano T, Otsuki T. Functional alteration of natural killer cells and cytotoxic T lymphocytes upon asbestos exposure and in malignant mesothelioma patients. Biomed Res Int. 2015; 2015:238431. doi: 10.1155/2015/238431. 査読有り
10. 福岡和也. 「新しい検査法」悪性中皮腫に対する新しい血液診断マーカー 可溶性メソテリン関連ペプチド. モダンメディア 2015; 61: 98-103. 査読無し
11. 福岡和也. 質疑応答「メソテリンの腫瘍マーカーとしての可能性」. 日本医事新

報 2015; 4738: 64-65. 査読無し

〔学会発表〕(計 0 件)

〔図書〕(計 1 件)

福岡和也. 1 から学ぶ医師主導臨床研究の基本. がん研究推進のために知っておきたい最新情報, A・M・S, 東京, 2018.(68 頁)

〔産業財産権〕

出願状況 (計 0 件)

取得状況 (計 0 件)

〔その他〕

該当なし

6 . 研究組織

(1)研究代表者

福岡 和也 (FUKUOKA, Kazuya)
近畿大学・医学部附属病院・教授
研究者番号 : 80305721

(2)研究分担者

西尾 和人 (NISHIO, Kazuto)
近畿大学・医学部・教授
研究者番号 : 10208134