

研究報告書

平成29年度：A課題

平成31年4月30日

公益財団法人 がん研究振興財団

理事長 堀田知光 殿

研究施設 国立がん研究センター研究所
創薬標的シーズ評価部門

住 所 東京都中央区築地5-1-1

研究者氏名 小山 理恵子



(研究課題)

難治な希少がんである CIC-DUX4 肉腫の新しい治療法の開発：世界初の患者由来がんモデルを用いた融合遺伝子の機能解析および適応拡大に向けたシーズの探索と検証

平成30年3月9日付助成金交付のあった標記A課題について研究が終了致しましたのでご報告いたします。なお、現時点で論文未発表の内容があり、一部名称を伏せて報告させていただきます。

CIC-DUX4 肉腫は、小児・若年者に発生頻度が高く、Ewing 肉腫と形態が酷似する。多くに転移が認められ、完全切除以外の根治的な治療法は確立されていない。

我々は、CIC-DUX4 肉腫症例の手術検体からゼノグラフトと細胞株のがんモデルを樹立し、プロテオーム像やチロシンキナーゼ活性がほぼ保存されていることを示した。悪性腫瘍治療薬の承認薬 120 種類で、細胞株の増殖抑制能をスクリーニングしたところ、アクチノマイシン D、ボルテゾミド等で有効性を示し、チロシンキナーゼ阻害剤クリゾチニブは分子標的薬として期待できた (Oyama *et al.*, *Sci. Rep.*, 5:7:4712, 2017)。

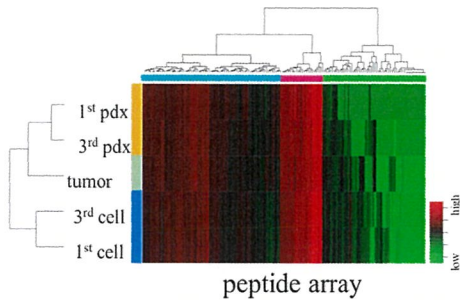
本課題では、CIC-DUX4 細胞株を使用して、①CIC-DUX4 キメラタンパク質複合体の解析、②CIC-DUX4 肉腫モデルのキノーム解析、③既存抗がん剤適応の可能性、について検証を行った。

① CIC-DUX4 キメラタンパク質複合体の解析

磁性体ビーズに固定した CIC 抗体で CIC-DUX4 細胞株の可溶性画分の免疫沈降を行った。CIC 抗体を介して結合したタンパク質を Laemmli 緩衝液で溶出しアルキル化後、トリプシン消化して得られたペプチドを逆相カラムクロマトグラフィーで分離して質量分析計に供した。同定されたタンパク質群を機能分類したところ、リン酸化、選択的スプライシング、アセチル化など核内タンパク質が豊富で細胞増殖が活発である特徴が示された。DUX4 との相互作用が示唆されている分子数種も確認した。

②CIC-DUX4 肉腫モデルのキノーム解析

CIC-DUX4 肉腫、ゼノグラフト株、細胞株をそれぞれ可溶化し、チロシンキナーゼの基質ペプチド 144 アレイ (Tyrosin kinase PamChip, PamGne 社) に供した。各基質ペプチドに対するチロシンキナーゼ活性は、リン酸化チロシン抗体に標識した蛍光強度の経時時間変化から得た。可溶性画分に含まれるチロシンキナーゼ群を Phosphonet (Kinexus bioinformation 社) でシミュレーションを行い、Src チロシンキナーゼ、Lck チロシンキナーゼ、Axl チロシンキナーゼなどが高度に活性化していることが示唆された。



手術検体、継代数の異なるゼノグラフト株 2 種、各ゼノグラフト株から樹立した細胞、それぞれに内在する様々なチロシンキナーゼ活性を、基質ペプチドアレイのリン酸化反応速度から求めた。がんモデルは、手術検体と非常によく似たリン酸化能を示した。

② CIC-DUX4 細胞株を用いた抗がん剤試験

チロシンキナーゼ阻害薬 50 種で細胞増殖抑制スクリーニングを行った。酵素で分散した細胞を 384 穴プレートに播種し、翌日チロシンキナーゼ阻害剤を添加、72 時間後に細胞生存活性を定量した。細胞感受性レベルから抗がん剤を 7 グループに分類した。最も効果のあったグレード 1 はユーイング肉腫治療薬のアクチノマイシン D とドキシソルビシンであった。ユーイング肉腫治療薬ビンクリスチン、エトポシドはグレード 5 であった。グレード 2 には他のグレードに含まれない特徴的なチロシンキナーゼであるターゲット #1 の化合物 3 剤が存在した。同ターゲット #1 の抗がん剤について、さらに 11 種の化合物で有効性の検証を行ったところ、10 剤で増殖抑制効果を示した。このうち IC_{50} が $10 \times 10^{-6} M$ 以下の化合物が 8 剤あった。

【考察】

CIC-DUX4 肉腫の化学療法奏功性は 30% 程度と言われ、有効な抗がん剤の情報が必要とされている。同細胞株は、様々なチロシンキナーゼ全般にわたり活性をよく保存していることから、同分子標的の検証に有用と推測される。

今回増殖抑制効果を確認したチロシンキナーゼのターゲット #1 には FDA 承認薬が 2 剤含まれていた。ターゲット #1 は他に FDA 承認薬 3 剤があるので、入手後直ちに検証する予定である。

また、CIC-DUX4 キメラタンパク質複合体の検索結果から、リン酸化蛋白、核内蛋白など発症機序に関わると推測される分子の関与が示唆された。新しい実験系を構築しさらに詳細な解明を進めている。

【本研究関連の学会発表】

ポスター発表

希少がん・肉腫の患者由来がんモデルの構築：樹立において保存される発現プロファイルと抗がん剤適応拡大の研究

第 77 回日本癌学会学術総会 2018 年 9 月 29 日 大阪国際会議場・リーガロイヤルホテル大阪、大阪市

招待講演

肉腫に対するトランスレーショナルリサーチ

平成 30 年度がん研究シンポジウム 2019 年 3 月 23 日 国立がん研究センター、東京