

201438085A

厚生労働科学研究委託費

革新的がん医療実用化研究事業

臨床検体を用いた多層的オミクス解析による分子標的薬の  
肉腫への適応拡大のための基盤的研究

平成26年度 委託業務成果報告書

業務主任者 近藤 格

平成27年（2015） 3月

本報告書は、厚生労働省の厚生労働科学研究委託事業による委託業務として、独立行政法人国立がん研究センターが実施した平成26年度「臨床検体を用いた多層的オミクス解析による分子標的薬の肉腫への適応拡大のための基盤的研究」の成果を取りまとめたものです。

## 目 次

I. 委託業務成果報告（総括）	2
臨床検体を用いた多層的オミクス解析による分子標的薬の肉腫への適応拡大のための基盤的研究 近藤格	
II. 委託業務成果報告（業務項目）	8
1. ゲノム情報を活用した適応拡大のための分子標的薬候補の同定 市川仁、土屋直人、川井章、近藤格、齊藤秀	9
2. パゾパニブの奏効性・抵抗性の分子背景に向けたプロテオーム解析 近藤格、小林英介	14
3. 病理標本を用いた解析 吉田朗彦	17
4. 血中エクソソーム解析によるバイオマーカーの開発 落谷孝広、小林英介	19
5. 既存薬の肉腫細胞での効果とその薬効の分子背景の解析 近藤格、太田力	22
6. バイオマーカー分子の機能解析および治療標的としての可能性の検討 齊藤秀	25
7. 基礎研究の成果に基づく希少がんにおける適応拡大のあり方に関する検討 近藤格	27
III. 学会等発表実績	30
IV. 研究成果の刊行物・別刷	43~

## I. 委託業務成果報告（総括）

厚生労働科学研究委託費（革新的がん医療実用化研究事業）  
委託業務成果報告（総括）

「臨床検体を用いた多層的オミクス解析による分子標的薬の肉腫への適応拡大  
のための基盤的研究」

業務主任者

近藤格 国立がん研究センター研究所 希少がん研究分野 分野長

研究要旨

本研究の目的は、肉腫での分子標的薬の適応拡大を促進することである。症例が少なく市場規模が小さい肉腫では、適応拡大が緊急の課題である。基礎研究の成果に基づく適応拡大可能な薬の同定、そして適切な症例選択のための診断技術が必要である。本研究では、肉腫のゲノム・遺伝子発現データに基づき、肉腫に適応拡大が可能な分子標的薬を同定する。また、肉腫で承認されている唯一の分子標的薬であるパゾパニブと同じ効果あるいは相補的效果を肉腫に与える分子標的薬を、培養細胞のmRNAの変動パターンをConnectivity Map法で比較解析し推定する。そして、パゾパニブの肉腫症例へ奏効性を予測するための新しい診断技術を開発する。本研究によって分子背景の解析データに基づいて肉腫で適応拡大が図られるようになれば、既存の分子標的薬の肉腫への適応拡大の流れは大きく促進され、ドラッグ・ラグの解消が進むことが予想される。また、個別的に奏効性を予測できる診断技術は、分子標的薬の適応拡大の承認のプロセスにも大きく貢献すると考えられる。本研究のアプローチの有効性が肉腫で実証されれば、他の希少がんにも同様のアプローチを当てはめることでドラッグ・ラグの解消が波及していくと予想される。また、本研究を通じて、希少がんの適応拡大の研究のあり方について検討する。

ゲノム情報を活用した適応拡大のための分子標的薬候補の同定

市川仁 国立がん研究センター研究所 臨床ゲノム解析部門 部門長  
土屋直人 国立がん研究センター研究所 ゲノム生物学研究分野 ユニット長  
川井章 国立がん研究センター中央病院 骨軟部腫瘍科 医長

近藤格 国立がん研究センター研究所 希少がん研究分野 分野長  
齊藤秀 株式会社オプト データサイエンスラボ 所長

パゾパニブの奏効性・抵抗性の分子背景に向けたプロテオーム解析  
近藤格 国立がん研究センター研究所 希少がん研究分野 分野長  
小林英介 国立がん研究センター中央病院 骨軟部腫瘍科 医員

病理法本を用いた解析

吉田朗彦 国立がん研究センター中央病院 病理科 医員

血中エクソソーム解析によるバイオマーカーの開発

落谷孝広 国立がん研究センター研究所 分子細胞治療研究分野 分野長  
小林英介 国立がん研究センター中央病院 骨軟部腫瘍科 医員

既存薬の肉腫細胞での効果とその薬効の分子背景の解析

近藤格 国立がん研究センター研究所 希少がん研究分野 分野長  
太田力 国立がん研究センター研究所 創薬標的・シーズ評価部門ユニット長

バイオマーカー分子の機能解析および治療標的としての可能性の検討

齊藤秀 株式会社オプト データサイエンスラボ 所長

基礎研究の成果に基づく希少がんにおける適応拡大のあり方に関する検討

近藤格 国立がん研究センター研究所 希少がん研究分野 分野長

#### A. 研究目的

本研究の目的は、肉腫での分子標的薬の適応拡大を促進することである。希少がんである肉腫においては治療法が限られていることから、ドラッグ・ラグの解消を望む患者団体の声には切実なものがあり、要望はとりわけ強い。市場規模が限られる肉腫においては新規の抗がん剤の開発は商業的に困難であり、既存の分子標的薬の適応拡大は現実的な戦略であると考えられる。

症例が限られる肉腫では、適応拡大に向けた分子背景の解明に基づく基礎的検討が課題である。本研究では、臨床検体や培養細胞を用いた網羅的解析を主なアプローチとする。すなわち、①ゲノム情報を活用した適応拡大のための分子標的薬候補の同定、②パゾパニブの奏効性・抵抗性の分子背景の理解に向けた網羅的解析、を行う。国立がん研究センターのバイオバンクの試料の活用することで一般には入手し難い肉腫の臨床検体を用いた

研究を行う。また、同センターの研究環境を活かし、ゲノム、トランスクリプトーム、プロテオームと、多層的なオミクス解析を行う。そして、バイオインフォマティクスの手法を応用することで、膨大なデータから目的の分子背景・薬剤を選択する。

希少がんの代表である肉腫の研究を通じて、希少がんの一般に通じる適応拡大のための研究の方法論を検討する。

## B. 研究方法

[ゲノム情報を活用した適応拡大のための研究] 国立がん研究センターのバイオバンク試料（腫瘍組織）を使用した。脱分化型肉腫の腫瘍組織を対象に、国立がん研究センターで開発されたクリニカルシーケンスシステムを用いた解析を行った。Ewing 肉腫の腫瘍組織を対象に miRNA の網羅的解析を実施した。肉腫の培養細胞株パネルに対して、既存の分子標的薬の感受性を調べ、処理前後での mRNA の網羅的発現解析を実施した。滑膜肉腫に奏効することが *in vitro* の実験で判明していた 2 種類の分子標的薬について、骨肉腫においても応答性を調べ網羅的発現解析データを取得した。[パゾパニブの奏効性・抵抗性の分子機構の理解のための研究] 胞巣状軟部肉腫におけるパゾパニブの標的分子の発現・自己リン酸化を抗体アレイを用いて調べた。パゾパニブによる処理で滑膜肉腫細胞から放出されるエクソソームに含まれる miRNA の網羅的発現解

析を行った。[希少がんの適応拡大のための研究の方法論の確立] 本研究に関わる臨床医および研究者の意思疎通を密接にし、課題や問題点の抽出解決策の実践を通じて、症例が少ない希少がんのための適応拡大の研究の方法論を検討した。

### （倫理面への配慮）

手術検体などの臨床検体を用いる研究の実施について国立がん研究センターの倫理委員会で承認を得て実施した。また、診療の過程で得られた残余の臨床検体を医学研究に用いることについて説明を受け同意を表明した症例の検体を使用した。検体は匿名化され個人が特定されることがなく、提供者に不利益がおよばないように配慮した状態で研究は実施された。

## C. 研究結果

40 症例の脱分化型肉腫のクリニカルシーケンスを行い、治療標的候補の 104 遺伝子の変異と増幅及び 16 遺伝子の融合に関するデータを取得した。また、予後の異なる Ewing 肉腫 9 症例において miRNA の網羅的発現解析を行い、臨床的事象に対応する miRNA を同定し、機能解析に着手した。分子標的薬を含む 17 種類の抗がん剤の滑膜肉腫培養細胞への効果を調べ、網羅的解析データを取得した。さらに、滑膜肉腫に奏効する分子標的薬のほかの肉腫への効果を調べ、処理前後で発現が変化する mRNA の網羅的データを採取した。培養細胞を用いた分子標的薬応

答性遺伝子のデータを解析するための Connectivity Map 法のプラットフォームを構築した。

胞巣状軟部肉腫におけるパゾパニブの標的分子の発現・自己リン酸化を抗体アレイを用いて調べ、自己リン酸化が亢進している膜型チロシンリン酸化酵素を特定した。また、パゾパニブに抵抗性を示す胞巣状軟部肉腫細胞においては、パゾパニブの標的としては PDGFR が過剰発現しているものの、その自己リン酸化が認められないことがわかった。パゾパニブによる処理で滑膜肉腫細胞から放出されるエクソソームに含まれる miRNA の網羅的解析データの取得を進めた。

臨床医と基礎研究者の間での知識背景の相違の克服、臨床検体と培養細胞とそれぞれを用いた研究の特色と結果の融合を見据えた実験デザインの構築、バイオバンクの量と質の向上に関する課題、臨床応用に向けて必要な事項、等について議論した。

#### D. 考察

肉腫の適応拡大を促進することを目的として、新しい適応拡大のための分子標的薬の同定と、すでに適応されている分子標的薬の最適な使い方の研究に取り組んでいる。すなわち、①ゲノム情報を活用した適応拡大のための分子標的薬候補の同定、②パゾパニブの奏効性・抵抗性の分子背景の理解に向けた網羅的解析、である。多項目の研究を並行して実施するにあたり、研究班のメンバーが密接に連携をと

り協力して組織づくりを行うことができた。得られた成果を相互に活用しつつ、肉腫の適応拡大が臨床で実現するような研究成果を目指していきたい。

本研究では、肉腫の多数の培養細胞を用いて、既存の分子標的薬に反応して発現変化する mRNA のデータを網羅的に取得する。従来の比較解析の方法では膨大なデータの中から意味のあるデータ群を抽出することは困難である。そのために本研究では Connectivity Map 法を、独自のデータベースに応用できるプラットフォームを構築した。臨床検体から得られるデータとも統合させ、肉腫の適応拡大のための新しい実験系を構築していきたい。

本研究のような問題解決型の研究においては、研究班メンバーの間における相互理解と目的意識の共有が重要である。また、臨床検体の網羅的解析（クリニカルシーケンスを含む）を補完するために培養細胞を用いた実験が必要である。バイオバンクの量と質の向上のためにはネットワークの構築が求められるし、特に肉腫については臨床病理情報（診断情報）のアップデートが必要である。臨床応用に向けた取り組みとして、早期からどのように準備することが可能かを、今後検討する予定である。

#### E. 結論

肉腫の適応拡大を促進する目的で、適応拡大のための抗がん剤の同定、およ



び肉腫に適応されているパズパニブの奏効性・抵抗性の分子背景の解析を進めた。データを採取しつつ、組織づくりを進め、新しい実験プラットフォームの構築も行っている。希少がんの適応拡大のための研究の方法論の確立とその応用は、本研究班に特色的な試みであり、将来的に希少がん研究を広く促進する成果を目指している。今年度は当初の計画通り順調に研究が進められている。

F. 健康危険情報  
なし

#### G. 研究発表

##### 1. 論文発表

1. Ichikawa H, Yoshida A, Kanda T, Kosugi SI, Ishikawa T, Hanyu T, Taguchi T, Sakumoto M, Katai H, Kawai A, Wakai T, Kondo T. Prognostic significance of promyelocytic leukemia expression in gastrointestinal stromal tumor; integrated proteomic and transcriptomic analysis. *Cancer Sci.* 2015 Jan;106(1):115-24.
2. Kubota D, Yoshida A, Kawai A, Kondo T. Proteomics identified overexpression of SET oncogene product and possible therapeutic utility of protein phosphatase 2A in alveolar soft part sarcoma. *J Proteome Res.* 2014 May 2;13(5):2250-61.

3. Mukaihara K, Kubota D, Yoshida A, Asano N, Suehara Y, Kaneko K, Kawai A, Kondo T. Proteomic Profile of Epithelioid Sarcoma. *J Proteomics Bioinform* 2014, 7:7 158-165 (2014)

##### 2. 学会発表

1. 近藤格「Translational Research of Sarcoma」第1回国際がん研究シンポジウム、東京、2015年2月
2. Tadashi Kondo「Proteomics toward personalized treatment of sarcoma」10th Siena Meeting、シエナ、イタリア、2014年8月
3. Tadashi Kondo「Biomarker development for sarcoma toward personalized medicine」19th World Congress on Advances in Oncology and 17th International Symposium on Molecular Medicine、アテネ、ギリシャ、2014年10月

H. 知的財産権の出願・登録状況（予定を含む）  
特記事項なし

I. その他  
特記事項なし

## II. 委託業務成果報告（業務項目）

厚生労働科学研究委託費（革新的がん医療実用化研究事業）  
委託業務成果報告（業務項目）

「ゲノム情報を活用した適応拡大のための分子標的薬候補の同定」

担当責任者

市川仁 国立がん研究センター研究所 臨床ゲノム解析部門 部門長  
土屋直人 国立がん研究センター研究所 ゲノム生物学研究分野 ユニット長  
川井章 国立がん研究センター中央病院 骨軟部腫瘍科 医長  
近藤格 国立がん研究センター研究所 希少がん研究分野 分野長  
齊藤秀 株式会社オプト データサイエンスラボ 所長

研究要旨

本研究の目的は、肉腫に適応拡大可能な分子標的薬を同定することである。2種類肉腫について、臨床検体（腫瘍組織）を用いた網羅的解析を行った。脱分化型肉腫においては、40症例という比較的多数の腫瘍組織を対象としたクリニカルシーケンスを行い、他の悪性腫瘍において治療標的候補とみなされる104遺伝子の変異と増幅及び16遺伝子の融合に関するデータを取得した。また、集学的治療後の予後に関する情報が付随するEwing肉腫9症例の腫瘍組織を対象として、miRNAの網羅的発現解析を行い、臨床的な観察事象と相関するmiRNAを特定した。

A. 研究目的

本研究の目的は、肉腫に適応拡大可能な分子標的薬を同定することである。そのために、他の悪性腫瘍において治療標的候補とみなされる遺伝子の異常に注目した解析を、臨床検体（腫瘍組織）を対象として行う。また、既存の集学的治療に抵抗性を示す症例で特徴的な分子ネットワークの特定を、臨床検体・臨床情報を活用して行う。そして、そのような分子ネットワークを標的とする分子標的薬の同定を目指す。

B. 研究方法

[研究1] 国立がん研究センターのバイオバンク試料（腫瘍組織）を使用した。脱分化型脂肪肉腫の腫瘍組織を対象とした解析を行った。国立がん研究センターで独自に開発されたクリニカルシーケンスによって、治療標的候補の104遺伝子の変異と増幅及び16遺伝子の融合に関するデータを取得した。[研究2] 国立がん研究センターのバイオバンク試料（腫瘍組織）を使用した。集学的治療後の予後の異なるEwing肉腫症例の腫瘍組織を対象とした解析を行った。miRNAマイクロ

アレイを用いてmiRNAの発現を網羅的に調べた。臨床的事象に発現が関連するmiRNAについては定量的PCRで結果を検証した。

#### (倫理面への配慮)

手術検体などの臨床検体を用いる研究の実施について国立がん研究センターの倫理委員会で承認を得てから実施した。また、診療の過程で得られた残余の臨床検体を医学研究に用いることについて説明を受け同意を証明した症例の検体を使用した。検体は匿名化され個人が特定されることがなく、提供者に不利益がおよばないように配慮した状態で研究は実施された。

### C. 研究結果

[研究1] 脱分化型肉腫において治療標的候補の104遺伝子の変異と増幅及び16遺伝子の融合に関するデータを取得した。データの解析を平成27年度に実施する計画である。[研究2] 集学的治療後の予後の異なるEwing肉腫9症例においてmiRNAの網羅的発現解析を行い、臨床的事象に対応するmiRNAを同定した。定量的RT-PCRによって結果を検証し、アレイのデータが検証できたmiRNAについては、肉腫細胞に与える効果を調べる目的でEwing肉腫の培養細胞を用いた機能解析に着手した。

### D. 考察

肉腫の適応拡大を促進することを目

的として、分子標的薬の同定に取り組んだ。他の悪性腫瘍において治療標的候補とみなされる104遺伝子の変異と増幅及び16遺伝子の融合に解析対象を絞ることで、適応拡大のための効率のよい研究アプローチをとろうとしている。この手法の有効性すなわち得られた成果の実用性をいかに証明するかが、来年度以降の課題である。

1種類のmiRNAが複数の遺伝子の発現制御が可能であることから、単一のmiRNAの発現異常が細胞ネットワークを大きく変化させることがある。本年度に同定した、治療抵抗性と関連して発現変動するmiRNAを解析することで、がん細胞の治療抵抗性の獲得に寄与する分子ネットワークの同定が期待できる。予後不良なEwing肉腫の治療法の開発へ向けて、当該ネットワークの阻害に有効な既存の分子標的薬のスクリーニングと効果検証が来年度以降の課題である。

並行して行うConnectivity Map法を用いた培養細胞の解析から得られるデータの応用あるいは臨床検体と培養細胞とから得られるデータの統合を、挑戦的な課題として今後は検討したい。

### E. 結論

肉腫の適応拡大を促進する目的で、適応拡大のための抗がん剤の同定を進めた。適応拡大のための有力なアプローチの確立も視野に入れつつ研究を行っている。今年度は当初の計画通り順調に研究が進められている。

F. 健康危険情報

特記事項なし

G. 研究発表

1. 論文発表

1. Amornwichee N, Oike T, Shibata A, Ogiwara H, Tsuchiya N, Yamauchi M, Saitoh Y, Sekine R, Isono M, Yoshida Y, Ohno T, Kohno T, Nakano T . Carbon-ion beam irradiation kills X-ray-resistant p53-null cancer cells by inducing mitotic catastrophe. PLoS One. 2014 Dec 22;9(12):e115121.
2. Saito M., Shiraishi K., Matsumoto K., Schetter AJ., Ogata-Kawata H., Tsuchiya N., Kunitoh H., Nokihara H., Watanabe S., Tsuta K., Kumamoto K., Takenoshita S., Yokota J., Harris CC., Kohno T . A three-microRNA signature predicts responses to platinum-based doublet chemotherapy in patients with lung adenocarcinoma. Clin. Can. Res. 2014 15:4784-93.
3. Kurioka D., Takeshita F., Tsuta K., Sakamoto H., Watanabe S., Matsumoto K., Watanabe M., Nakagama H., Ochiya T., Yokota J., Kohno T., Tsuchiya N . NEK9-dependent proliferation of cancer cells lacking functional p53. Sci Rep. 4, 6111. 2014
4. Ogata-Kawata H, Izumiya M, Kurioka D, Honma Y, Yamada Y, Furuta K, Gunji T, Ohta H, Okamoto H, Sonoda H, Watanabe M, Nakagama H, Yokota J, Kohno T, Tsuchiya N Circulating Exosomal microRNAs as Biomarkers of Colon Cancer. PLoS ONE 9: e92921. 2014
5. Miyamoto S, Kayano S, Kamizono K, Fukunaga Y, Nakao J, Nakatani F, Kobayashi E, Sakuraba M . Pedicled superficial femoral artery perforator flaps for reconstruction of large groin defects. Microsurgery. 2014 Sep;34(6):470-4.
6. Nishida Y, Kobayashi E, Kubota D, Setsu N, Ogura K, Tanzawa Y, Nakatani F, Kato Y, Chuman H, Kawai A. Chronic expanding hematoma with a significantly high fluorodeoxyglucose uptake on 18F -fluorodeoxyglucose positron emission tomography, mimicking a malignant soft tissue tumor: a case report. J Med Case Rep. 2014 Oct 21;8(1):349
7. Asano N, Yoshida A, Kobayashi E, Yamaguchi T, Kawai A. Multiple Metastases from Histologically Benign Intraarticular Diffuse -type Tenosynovial Giant Cell Tumor: A

- Case Report. Human Pathology. 2014 Nov;45(11):2355-8.
8. Fukunaga Y, Miyamoto S, Kobayashi E, M Sakuraba. Venous-supercharged free -style posterior thigh flap without a descending branch of the inferior gluteal artery for reconstruction in the infragluteal region. J Plast Reconstr Aes. 2014 Dec;67(12):1740-3
  9. Carbon-ion beam irradiation kills X-ray-resistant p53-null cancer cells by inducing mitotic catastrophe. Amornwichee N, Oike T, Shibata A, Ogiwara H, Tsuchiya N, Yamauchi M, Saitoh Y, Sekine R, Isono M, Yoshida Y, Ohno T, Kohno T, Nakano T. PLoS One. 2014 Dec 22;9(12):e115121.
  10. Ueda T, Kakunaga S, Ando M, Yonemori K, Sugiura H, Yamada K, Kawai A. Phase I a nd pharmacokinetic study of trabectedin, a DNA minor groove binder, administered as a 24 -h continuous infusion in Japanese patients with soft tissue Sarcoma. Invest New Drugs. 2014 Aug;32(4):691-9.
  11. Yoshida A, Tsuta K, Ohno M, Yoshida M, Narita Y, Kawai A, Asamura H, Kushima R. STAT6 immunohistochemistry is helpful in the diagnosis of solitary fibrous tumors. Am J Surg Pathol. 2014 Apr;38(4):552-9.
  12. Blay JY, Sleijfer S, Schöffski P, Kawai A, Brodowicz T, Demetri GD, Maki RG. International expert opinion on patient -tailored management of soft tissue sarcomas. Eur J Cancer. 2014 Mar;50(4):679-89.
  13. Trautmann M, Sievers E, Aretz S, Kindler D, Michels S, Friedrichs N, Renner M, Kirfel J, Steiner S, Huss S, Koch A, Penzel R, Larsson O, Kawai A. SS18-SSX fusion protein-induced Wnt/  $\beta$ -catenin signaling is a therapeutic target in synovial sarcoma. Oncogene. 2014 Oct 16;33(42):5006-16.
  14. Totoki Y, Yoshida A, Hosoda F, Nakamura H, Hama N, Ogura K, Yoshida A, Fujiwara T, Arai Y, Toguchida J, Tsuda H, Miyano S, Kawai A, Shibata T. Unique mutation portraits and frequent COL2A1 gene alteration in chondrosarcoma. Genome Res. 2014 Sep;24(9):1411-20.
2. 学会発表
    1. 土屋直人「マイクロRNA～発がん機構の理解と Translational Research～」RNA 科学総合研究センター公開シンポジウム 2014 年 12 月
    2. Yuko Fujiwara, Takashi Kohno,

- Naoto Tsuchiya 「Regulation of p53-dependent G2 arrest and apoptosis by miR101 through the regulation of EG5- p53 pathway」第 37 回日本分子生物学会年会、2014 年 11 月
3. Naoto Tsuchiya 「NEK9-dependent cell cycle progression of cancer cells inactivated p53」第 37 回日本分子生物学会年会、2014 年 11 月
  4. 土屋直人「大腸がん診断マーカーとしてのエクソソームマイクロRNA の有用性」第 69 回大腸肛門病学会学術集会、2014 年 11 月
  5. Daisuke Kurioka, Masatoshi Watanabe, Takashi Kohno, Naoto Tsuchiya 「MicroRNA target screen identifies NEK9 as a crucial component of cell cycle network in p53-inactivated cancer cells」第 73 回日本癌学会学術総会、2014 年 9 月
  6. Naoto Tsuchiya 「EG5-p53 axis, a novel pathway to control cell cycle and apoptosis, is regulated by miR-101」第 73 回日本癌学会学術総会、2014 年 9 月
  7. 川井章「骨盤腫瘍手術-解剖学的アプローチ」第 1 回日本骨盤手術手技研究会、2014 年 2 月
  8. 川井章「Ewing Sarcoma (ESFT)」8th SIOP Asia Congress、2014 年 4 月
  9. 川井章「骨盤腫瘍の診断と治療-主に外科的治療」第 20 回倉敷駅前会、2014 年 5 月
  10. 川井章「骨盤腫瘍の診断と治療-主に外科的治療」第 6 階自由が丘整形医会、2014 年 6 月
  11. 川井章「肉腫 (サルコーマ)」AKIBA Cancer Forum 2014、2014 年 8 月
  12. 川井章「骨・軟部腫瘍 (肉腫)」第 52 回日本癌治療学会学術集会、2014 年 8 月
  13. 川井章、中谷文彦、小林英介、丹澤義一、窪田大介、薛 宇孝、山家健作、三浪友輔、清水光樹、中馬広一「AYA 世代軟部肉腫の外科治療」第 52 回日本癌治療学会学術集会、2014 年 8 月
  14. 川井章「骨腫瘍の診断と治療」第 63 回東日本整形災害外科学会、2014 年 9 月
  15. 川井章「腫瘍用人工関節-現状と今後の課題」第 15 回徳島整形外科フォーラム 2014 年 11 月
  16. 川井章「小児四肢悪性骨腫瘍に対する患肢・機能温存の試みと課題」第 56 回日本小児血液・がん学会学術集会、2014 年 11 月
- H. 知的財産権の出願・登録状況 (予定を含む)  
特記事項なし
- I. その他  
特記事項なし

厚生労働科学研究委託費（革新的がん医療実用化研究事業）  
委託業務成果報告（業務項目）

「パゾパニブの奏効性・抵抗性の分子背景に向けたプロテオーム解析」

担当責任者

近藤格 国立がん研究センター研究所 希少がん研究分野 分野長  
小林英介 国立がん研究センター中央病院 骨軟部腫瘍科 医員

研究要旨

本研究の目的は、肉腫で唯一承認されている分子標的薬であるパゾパニブの治療法を最適化するために有用な知見を得ることである。臨床検体（腫瘍組織）を用いた網羅的解析によって、パゾパニブが標的とするタンパク質の解析を行った。放射線治療や化学療法に抵抗性を示す胞巣状軟部肉腫において、12症例の腫瘍組織および近傍の正常組織を対象としたプロテオームを行い、パゾパニブの標的を含む膜型チロシンリン酸化酵素の自己リン酸化に関するデータを取得した。

A. 研究目的

本研究の目的は、肉腫で唯一承認されているパゾパニブの奏効性・抵抗性に関わる分子背景を調べ、パゾパニブを用いた治療法の最適化に資する知見を得ることである。

B. 研究方法

国立がん研究センターのバイオバンク試料（腫瘍組織）を使用した。胞巣状軟部肉腫 12 症例を対象とした解析を行った。50 種類の膜型チロシンリン酸化酵素について、それらの自己リン酸化を認識する抗体を 2 点ずつアレイした抗体アレイを使用した。

（倫理面への配慮）

手術検体などの臨床検体を用いる研

究の実施について国立がん研究センターの倫理委員会で承認を得てから実施した。また、診療の過程で得られた残余の臨床検体を医学研究に用いることについて説明を受け同意を表明した症例の検体を使用した。検体は匿名化され個人が特定されることがなく、提供者に不利益がおよばないように配慮した状態で研究は実施された。

C. 研究結果

胞巣状軟部肉腫におけるパゾパニブの標的分子の発現・自己リン酸化を抗体アレイを用いて調べた。今までの実験から、胞巣状軟部肉腫においては、パゾパニブが標的とする PDGFR が過剰発現していることがわかっていた。し



かし、今回の実験では PDGFR の自己リン酸化は認められなかった。培養細胞を用いた実験では胞巣状軟部肉腫はパゾパニブに抵抗性を示していたことの原因なのかもしれない。網羅的に調べた結果、自己リン酸化が亢進している膜型チロシンリン酸化酵素を特定した。

#### D. 考察

分子標的薬が標的とするタンパク質の活性についてのデータは、DNA や RNA レベルの解析では得ることが難しい。プロテオーム解析でタンパク質そのものの状態を調べる必要がある。プロテオームを網羅的に活性レベルで調べることは技術的に未だできないが、分子標的薬が標的とするタンパク質のある状態に解析対象を限定すれば実施可能である。本研究では、50 種類の膜型チロシンリン酸化酵素の自己リン酸化に対象を限定して、抗体アレイを用いて網羅的に調べた。このような限定的な網羅的手法は目的がはっきりしている研究においては有効であると考えられる。ゲノム研究を補完する意味で、対象を限定するプロテオーム解析が必要とされていくだろう。本研究では自己リン酸化が亢進している膜型チロシンリン酸化酵素を多数同定することができた。同定された酵素に対応する分子標的薬の有効性を調べるのが、次年度以降の課題である。

#### E. 結論

パゾパニブの奏効性・抵抗性の分子背景を明らかにする目的で、膜型チロシンリン酸化酵素の自己リン酸化を網羅的に調べた。得られた結果の機能的な解釈が今後の課題である。ゲノム研究を補完するためのプロテオーム解析として、このような手法を確立することも本研究の成果になるかもしれない。今年度は当初の計画通り順調に研究が進められている。

#### F. 健康危険情報

特記事項なし

#### G. 研究発表

##### 1. 論文発表

1. Kobayashi E, Koyama T, Kobayashi K, Setsu N, Kawashima M, Kawai A. Reversible hair depigmentation in a Japanese female treated with pazopanib. *Dermatol.* 2014 Nov;41(11):1021-2.
2. Fukunaga Y, Miyamoto S, Kobayashi E, Sakuraba M. Venous-supercharged free-style posterior thigh flap without a descending branch of the inferior gluteal artery for reconstruction in the infragluteal region. *J Plast Reconstr Aes.* 2014 Dec;67(12):1740-3.
3. Kobayashi E, Setsu N. Osteosclerosis Induced by

Denosumab. *ancet*. 2015 Feb  
7;385(9967):539.

2. 学会発表

1. 小林英介 「18F-FDG PET/CT assessment for lymph node metastases from bone and soft tissue sarcomas」 10th Asia Pacific Musculoskeletal Tumour Society、2014年4月
2. 小林英介 「Reversible hair depigmentation in Japanese woman treated with pazopanib」 8th World Congress for Hair Research、2014年5月
3. 小林英介 「四肢発生骨肉腫における FDG-PET による化学療法効果判定および予後予測に関する検討」第 87 回日本整形外科学会学術総会、2014年5月
4. 小林英介 「悪性軟部腫瘍における Pazopanib 使用経験」第 47 回日本整形外科学会骨軟部腫瘍学術集会、2014年7月
5. 小林英介 「Denosumab 療法が有効であった小児発生仙骨骨巨細胞腫の 1 治験例」第 48 回日本整形外科学会骨軟部腫瘍学術集会、2014年7月
6. 小林英介 「メタボリックエラーを利用した骨・軟部肉腫の新規治療開発」2014年骨軟部腫瘍基礎を語る会、2014年10月
7. 小林英介 「メタボリックエラーを利用した骨軟部肉腫の新規治療開発」第 29 回日本整形外科学

会基礎学術集会、2014年10月

8. 小林英介 「Denosumab Treatment for Sacral Giant Cell Tumor of Bone in a 10-Year-Old Boy」 19th Connective Tissue Oncology Society、2014年10月

H. 知的財産権の出願・登録状況（予定を含む）

特記事項なし

I. その他

特記事項なし

厚生労働科学研究委託費（革新的がん医療実用化研究事業）  
委託業務成果報告（業務項目）

「病理標本を用いた解析」

担当責任者

吉田朗彦 国立がん研究センター中央病院 病理科 医員

研究要旨

①ゲノム情報を活用した適応拡大のための分子標的薬候補の同定、および②パゾパニブの奏効性・抵抗性の分子背景に向けたプロテオーム解析、におけるオミクス解析の対象となる肉腫や、それらの肉腫と病理診断上鑑別が問題となる腫瘍に関して、それぞれのオミクス解析に資する検体の病理診断の妥当性や検体の質について検討し、解析の質を向上させる。また病理診断の見直し過程やオミクス解析の結果得られた知見を利用し、病理診断や予後予測に有用なバイオマーカーの開発を目指す。

A. 研究目的

本研究で得られる網羅的解析データと臨床病理情報および文献情報などを活用し、分子標的薬のコンパニオン診断薬の開発に資する病理診断や予後予測に有用なバイオマーカーを開発する。

B. 研究方法

今年度は、オミクス解析の結果がでていないため、バイオマーカー開発は行わなかった。対象となる亜型については現在のWHO分類に準じ、診断の見直しを行った。見直しに際し、必要と考えられる免疫組織学的、遺伝子的検索を追加した。

（倫理面への配慮）

手術検体などの臨床検体を用いる研究の実施について国立がん研究センターの倫理委員会で承認を得てから実施した。また、診療の過程で得られた残余の臨床検体を医学研究に用いることについて説明を受け同意を表明した症例の検体を使用した。検体は匿名化され個人が特定されることがなく、提供者に不利益がおよばないように配慮した状態で研究は実施された。

C. 研究結果

この研究課題の対象となる肉腫亜型について、オミクス研究に用いる病理検体の診断見直しを行った。診断に問

題のある症例や、生存細胞が殆ど含まれていない症例が存在し、そうした症例はほかの研究者と情報を共有し、今後の解析から除外することとした。診断変更となった症例や確定診断困難とされた症例については、さらに検討を加え、適切な分類を試みた。

定を含む)  
特記事項なし

I. その他  
特記事項なし

#### D. 考察

病理アーカイブやバイオバンクに蓄積されている検体は、貴重な研究資源であるが、そのすべてがそのままに研究に適するわけではない。特に肉腫の分類は変遷が著しいので、高価なオミクス解析にあたっては特に、事前に病理診断を再確認することで、解析の質を向上することが重要であると考えられた。

#### E. 結論

本年度は、オミクス解析の結果が未着であったため、検体選択への診断的貢献とそれに付随する分類学的な検討を行った。来年度以降は、オミクス解析結果から示唆されるバイオマーカーの検討や、遺伝子と臨床病理学的特徴の対応づけをとおして、この研究をサポートしていきたい。

#### F. 健康危険情報

特記事項なし

#### G. 研究発表

特記事項なし

#### H. 知的財産権の出願・登録状況（予