

いわゆる癌腫とよばれる胃癌、肺癌、大腸癌などの上皮由来悪性腫瘍には、CEA、CA19-9等の腫瘍マーカーが存在し、早期診断や治療効果判定等に用いられている。しかし、肉腫においては有用な腫瘍マーカーに乏しく、近年本邦で発刊された「分子腫瘍マーカーガイドライン」には肉腫の項目はみられない（日本腫瘍マーカー研究会，金原出版，2016）。肉腫の治療成績はこの20年来ほぼプラトーに達しているが、有用なバイオマーカーが存在しないことがその要因の一つであり、近年の体液診断技術の開発に大きな期待が寄せられている。

本研究の目的は、派遣先であるメモリアルスローンケタリング癌センター（Memorial Sloan Kettering Cancer Center; MSKCC）整形外科と派遣前の所属部局である岡山大学整形外科において、肉腫における体液分子診断法を共同開発することである。この報告書には、上記両機関における研究・調査実施状況について記載する。

研究方法

肉腫患者血清、肉腫細胞培養上清より以下の分子を抽出し、それぞれ健常人血清、正常細胞培養上清に対して発現が亢進している標的分子を網羅的解析により抽出する。抽出標的分子が肉腫細胞から分泌されていることを確認し、治療前後でどのように血中発現が変動するか、また、治療予後因子となり得るか解析を行う。

1. Exosome: 細胞株培養上清からは超遠心法を、人血清からはゲルろ過法を用いて抽出する。
2. Cell-free miRNA (cf-miRNA): 細胞株培養上清、人血清より RNA 抽出を行い、miRNA マイクロアレイ解析により標的分子を抽出する。
3. Cell-free exosomal miRNA (cf-ex-miRNA): 上記 1 の手法を用いて exosome を抽出し、exosome 内 miRNA マイクロアレイ解析により標的分子を抽出する。
4. Cytokine, chemokine: 肉腫細胞培養上清からアレイ解析により、分泌分子の網羅的解析を行う。分泌分子あるいはそれに基づく免疫反応に対する治療標的としての可能性を考慮し、小動物を用いた前臨床試験を念頭に宿主由来肉腫細胞を用いた解析を行う。

研究結果

1. Exosome

1-1. Ewing 肉腫

ヒト Ewing 肉腫細胞株 SKES-1、RDES、A673 における培養上清中から exosome を抽出し、透過型電子顕微鏡、Nanosight により直径 100 nm をピークとした粒子として特定されることを確認した。ヒト血清由来 exosome も含めたプロテオーム解析から多種類の機能分子が抽出され、Ewing 肉腫の免疫組織学的診断で頻用される antigen-X も特定された。Ewing 肉腫担がんマウス血清における exosome 表面に antigen-X が発現していることが確認され（図 2）、病理学的マーカーが体液中循環分子として特定可能であることが明らかになった。

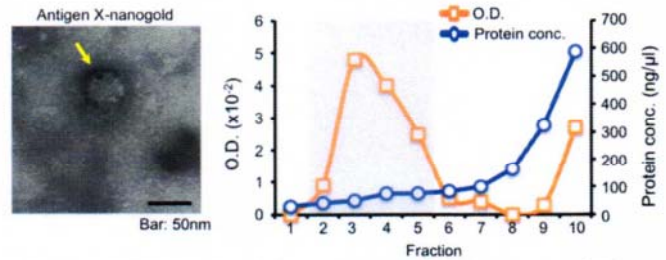


図2. Ewing肉腫担がんマウス血清におけるexosome膜表面のantigen Xの発現

1-2. 滑膜肉腫

ヒト滑膜肉腫細胞株 SYO-1、HSSYII、YaFuSS における培養上清中から exosome を抽出し、1-1 と同様に透過型電子顕微鏡、Nanosight によりその存在を確認した。術前および術後に採取された患者血清由来 exosome も含めたプロテオーム解析から、担癌状態の exosome 表面で発現する antigen-Y を特定した。Antigen-Y は腫瘍組織・細胞自身にも発現を認め、その局在により予後因子となるとが判明した。引き続き、antigen-Y/exosome を標的に腫瘍モニタリングが可能であることを患者検体を用いて解析する。

2. cf-miRNA

粘液線維肉腫患者血清、健常人血清、ヒト粘液線維肉腫細胞株 NMFH-1 培養上清由来 RNA を用いた microarray 解析より、患者血清および培養上清において発現亢進を示す 110 種類の miRNA が抽出された。そのうち粘液線維肉腫患者の術後に血清中発現が低下する 4 種類の miRNA を特定した（図 3A）。粘液線維肉腫細胞株 NMFH-1 および NMFH-2 からの細胞外分泌を検討したところ、miR-1260b の発現が細胞数依存的かつ培養時間依存的に変動することが明らかになった（図 3C; NMFH-1）。

血清 cf-miR-1260b による病勢モニタリングの評価のため術前後ペア血清を得られた粘液線維肉腫患者でその発現を解析すると、8 例全例で術後発現低下が明らかとなり（図 3D）、非侵襲的モニタリングマーカーとしての可能性が示された。さらに、病理学的浸潤性発育を示唆する tail-like sign を術前 MRI 上で示す症例は血清 cf-miR-1260b が有意に高値を示すことが明らかになった（図 3E・F）。

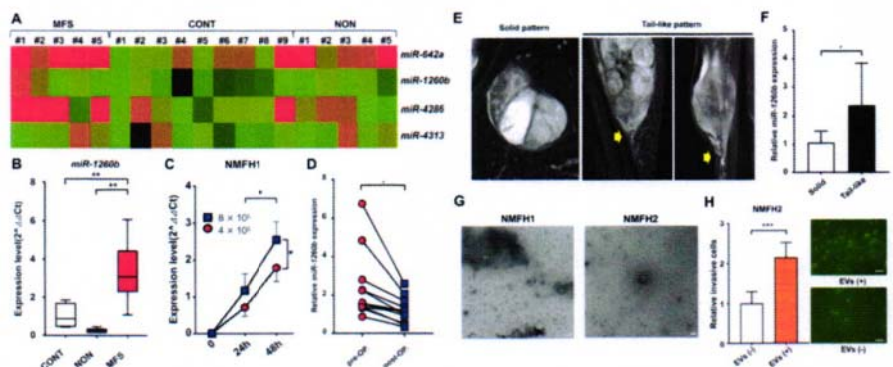


図3. 粘液線維肉腫患者におけるcf-miR-1260bを用いた腫瘍モニタリングおよび腫瘍微小環境を介した浸潤性発育の解析

粘液線維肉腫細胞から分泌される miR-1260b はエクソソーム分画に包埋されており (図 3G)、周囲の正常間葉系細胞に取り込まれ PCDH9 を silencing することにより粘液線維肉腫の浸潤性を高めていることが明らかになった (図 3H)。

3. cf-exo-miRNA

ヒト骨肉腫低転移細胞株 HOS および高転移細胞株 143B からの exosome 分泌を透過型電子顕微鏡、Nanosight によりその粒子の存在を確認した。また、western blotting により exosome マーカーの一つである CD63 の発現を確認した。

低転移株 HOS 由来 exosome と比較し高転移株 143B 由来 exosome で発現高値を示す miRNA を microarray 解析により抽出したところ、18 種類の miRNA が高値を示した。そのうち、143B 株細胞内および分泌エクソソーム内で共通して発現の高い miR-Z を特定した。

患者血清で解析したところ、cf-exo-miR-Z は健康人と比較し、治療前骨肉腫患者で血清内発現が亢進していた。また、治療経過中に肺転移を示した患者群は非肺転移群に比較し肉腫組織における発現が亢進しており、予後因子としての可能性が示された。

4. Cytokine, chemokine

骨肉腫細胞株 LM8 および線維肉腫細胞株 NFSa から分泌される cytokine, chemokine の profile をアレイ

解析により評価したところ、colony stimulating factor (CSF)-1, interferon (IFN)- γ , chemokine (CXC) ligand (CXCL)-1, CXCL-2, CXCL-9, CXCL-12, chemokine (CC motif) ligand (CCL)-2, CCL-5, tissue inhibitor of the metalloproteinase (TIMP)-1, Inducible Protein (IP)-10 が細胞毎に様々な量分泌されていることが判明した。

そのうち、腫瘍関連マクロ

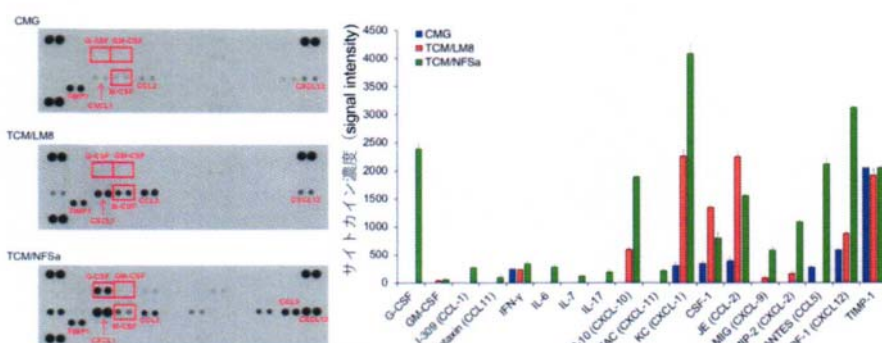


図4. 骨肉腫および線維肉腫からの分泌されるcytokine/chemokineのプロファイリング

ファージの分化に関与する CSF-1, CCL-2 は両細胞株より共通して強く分泌されていた (図 4)。

これまでに肉腫における腫瘍関連マクロファージの CSF-1 の役割についてはほとんど知られていないことから、LM8 発生宿主である C3H マウスの四肢長管骨から骨髓細胞を分取し、CSF-1 ならびに LM8, NFSa を 48 時間培養した上清 (tumor conditioned media; TCM) を用いて腫瘍関連マクロファージの分化に寄与するかを評価した。その結果、CSF-1 および両株 TCM を投与しない場合には骨髓細胞の大半は死滅したが、CSF-1 および両株 TCM を投与した場合には、いずれも M2 型表現形である CD45⁺CD11b⁺CD206⁺細胞が生成され、CCL2, CD206 の mRNA 発現亢進も確認された。すなわち、腫瘍関連マクロファージの特徴とされる M2 型への分化が確認された。

この CSF-1-TAM, LM8-TAM, NFSa-TAM に対して CSF-1 阻害剤である PLX3397 (pexidartinib) を暴露すると、マクロファージの M2 分化に必要なリン酸化 ERK の発現は抑えられ、CD45⁺CD11b⁺CD206⁺分画の減少が確認された (図 5A)。また、CSF-1 および両株 TCM 下におけるマクロファージの増殖は抑えられ (図 5B)、CSF-1 および両株 TCM に対するマクロファージの遊走も抑制された (図 5C)。

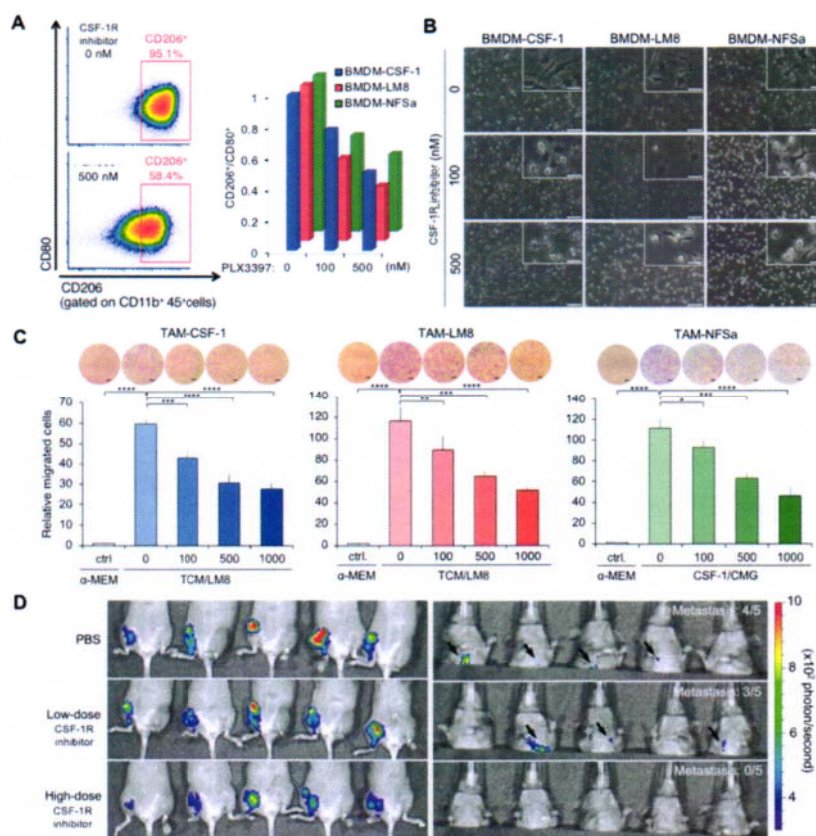


図5. 肉腫細胞由来TAMモデルおよび骨肉腫マウスモデルにおける抗CSF-1阻害の効果

In vitro におけるこれらの現象を、マウス骨肉腫同種移植モデルを用いて確認したところ、PLX3397 の全身投与により、原発巣の腫瘍増大だけでなく肺転移形成も有意に抑制されることが明らかになった (図 5D)。

これらの知見より、肉腫細胞から分泌される cytokine/chemokine は肉腫の増大および進展に密接に関与していることが確認された。種々の cytokine/chemokine のうち特に CSF-1 を阻害することによる新たな治療法確立の可能性も示された。今後、これらの分子の肉腫患者における発現を解析し、治療効果判定等の腫瘍モニタリングにも応用できるか検討していく。

考察

本研究では肉腫における体液分子診断技術の開発を組織別および分子別に行い、各手法の実用可能性を検討した。Exosome 自体をマーカーとする体液診断法は、近年膀胱癌において驚くべき成績が報告されている。膀胱癌細胞由来 exosome 表面に発現する glypican-1 (GPC1) を標的とする検出手法で早期膀胱癌を感度・特異度共に 100%鑑別可能であったと報告したものであり、本手法による他の悪性腫瘍における臨床応用に期待が寄せられる。本研究では Ewing 肉腫および滑膜肉腫において腫瘍由来 exosome 表面に発現する標的候補蛋白を特定可能であった。Ewing 肉腫においては病理学的診断で頻用される antigen X が exosome 表面にも搭載されていることを特定し、免疫組織学的マーカーが体液診断法にも有用である可能性が示された。滑膜肉腫における antigen-Y などの候補分子も含め、化学療法奏効性や早期再発・転移のモニタリングが可能であるか臨床的検討を進めていく。

cf-miRNA は無細胞の血液分子として発見当初から様々な疾患のバイオマーカーとしての有用性を検討されてきた。筆者が以前に報告した骨肉腫における有用性と併せて³、不均一な遺伝子変異を有する粘液線維肉腫においても体液診断の標的としての可能性が示された。さらなる症例の集積と臨床病理学的相関性の解析が必要である。cf-exo-miRNA は exosome による miRNA の血中安定性から近年体液診断法における有用性を検討され始め、大腸癌をはじめとする癌腫でその成績が報告されている。本研究では骨肉腫における検討を行い、担癌状態だけでなく転移の予測マーカーとしての cf-exo-miRNA を特定した。筆者が以前特定した cf-miRNA と比較し、どちらが鋭敏なバイオマーカーとなり得るかを評価するため、さらなる症例の集積と臨床病理学的相関解析が必要である。

様々な癌種において免疫療法の開発が進んでいる近年、その治療効果をモニター可能なツールの開発も期待されている。このようなニーズに体液中 cytokine/chemokine がツールの一つとして注目されている。本検討では骨肉腫および線維肉腫から様々な cytokine/chemokine 分泌を確認し、特に CSF-1 の肉腫形成における役割を腫瘍関連マクロファージとの関係を軸に特定できた。この知見により新しいモニタリングツールとして応用できるだけでなく、治療標的としての可能性も見出された。PLX3397 (pexidartinib) は、米国で進行性 Tenosynovial giant-cell tumor (TGCT) に対して既に臨床応用されており⁴、悪性腫瘍に対する治験も進んでいる。本邦における肉腫を含む悪性腫瘍に対する早急な承認が期待される。

このように様々な手法による体液診断法確立の可能性が示されたが、解決すべき課題も多い。まず、肉腫各組織型においてどの手法が最も臨床的に有用かという検討が必要である。これは感度・特異度だけでなく、採血時期や採血後遠心までの保存状態等による誤差が最も少ない標的分子を腫瘍組織型毎に検討することが求められる。また、cf-miRNA および cf-exo-miRNA を用いた手法では適切な内在性コントロールによる定量や異なるコホートにおける再現性が課題である。さらに、各手法の早期再発・転移診断が画像診断に現れる前に可能となった場合、その治療をいつどのように行うかについても多数例をもとにした臨床的側面からの解析が求められる。このような基礎的・臨床的見地からの課題を解決し、腫瘍マーカーに極めて乏しい肉腫における新しい診療ツールとしての実用化を目指す。

結語

肉腫各組織型において、腫瘍由来 exosome、cf-miRNA、cf-exo-miRNA、cytokine/chemokine 等の体液中標的分子を特定した。特定分子の中には臨床病理学的に強く相関するものも存在し、治療標的となる可能性も見出された。このような分子の実用化を目標に、派遣先で構築された研究者ネットワークを基盤としてさらに大きな臨床コホートでの検証を継続していく。

参考文献

- 1 Schwarzenbach, H., Nishida, N., Calin, G. A. & Pantel, K. Clinical relevance of circulating cell-free microRNAs in cancer. *Nature reviews. Clinical oncology* **11**, 145-156, doi:10.1038/nrclinonc.2014.5 (2014).
- 2 Lambeck, A. J. *et al.* Serum cytokine profiling as a diagnostic and prognostic tool in ovarian cancer: a potential role for interleukin 7. *Clinical Cancer Research* **13**, 2385-2391 (2007).
- 3 Fujiwara, T. *et al.* Clinical significance of circulating miR-25-3p as a novel diagnostic and prognostic biomarker in osteosarcoma. *Oncotarget* **8**, 33375 (2017).
- 4 Tap, W. D. *et al.* Structure-Guided Blockade of CSF1R Kinase in Tenosynovial Giant-Cell Tumor. *The New England journal of medicine* **373**, 428-437, doi:10.1056/NEJMoa1411366 (2015).