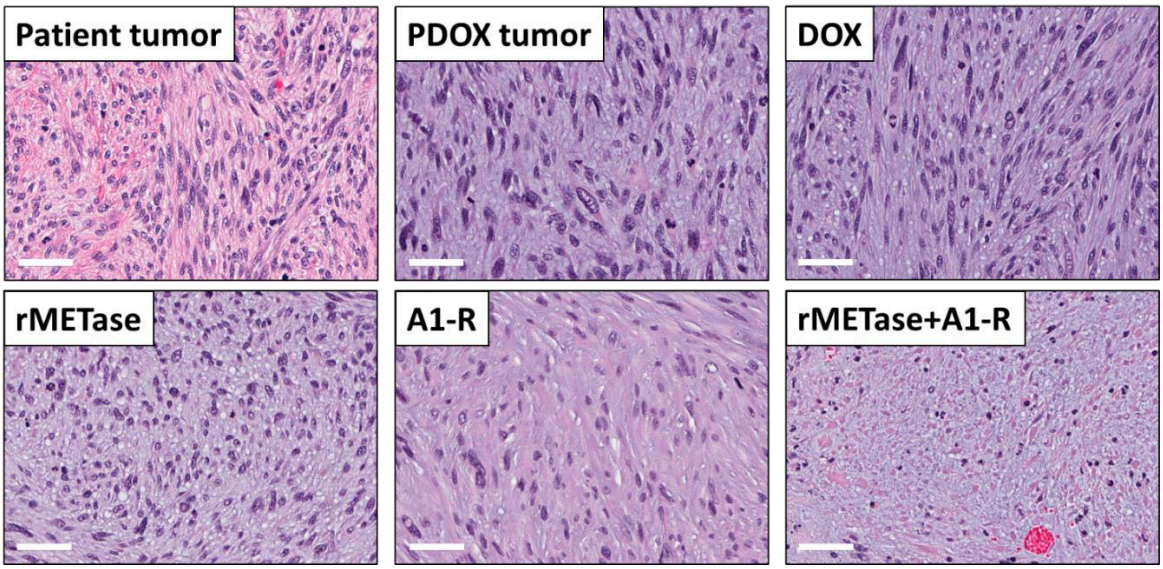
166　患者腫瘍同所移植モデルによる骨軟部肉腫の治療開発	五十嵐　健太郎

【目的】原発性悪性骨軟部腫瘍は発生頻度が低く、100 種類以上が存在しており、それぞれ全く異なる性質を持つ希少がんの集合である。市場規模の小ささから新規薬剤開発のハードルが高く、それぞれの病理型に細分化すると発生頻度が極端に少ないため新規薬剤の標準治療が定まっていない。我々はカリフォルニア大学サンディエゴ校との共同研究において、Patient derived orthotopic xenograft（患者由来組織の同所性異種移植、以下 PDOX）を用いた腫瘍モデルを確立した。本研究では PDOX モデルマウスを用い、発生頻度の低い悪性骨軟部腫瘍領域における 1. 個別化医療の追求、2. 新規治療の開発を目指した。

【方法】PDOX モデル作製：骨軟部肉腫患者の手術に際し切除した腫瘍の一部をヌードマウスの患者発生部位と同所へ移植（骨腫瘍は脛骨 or 大腿骨、四肢発生軟部腫瘍は大腿二頭筋、後腹膜発生の軟部腫瘍は後腹膜腔に移植）。作製した PDOX モデルに対し臨床上使用可能な各種薬剤を投与し治療を行い、最も効果の高い薬剤を見出した。我々が骨軟部肉腫に対する新規治療として開発した「腫瘍特異性の高いバクテリア」、「骨親和性の高い新規プラチナ製剤」、「腫瘍のメチオニン代謝をブロックするメチオニン阻害剤」の有用性についても PDOX モデルを用いて検証し臨床応用の可能性につき評価した。

【結果】横紋筋肉腫、骨肉腫、脱分化型脂肪肉腫 PDOX モデルを樹立した。骨肉腫、脱分化型脂肪肉腫は臨床上第一選択薬に対し治療抵抗性であったが PDOX モデルにおいても抵抗性であり、薬剤抵抗性が PDOX モデルに再現できていることを明らかとした。脱分化型脂肪肉腫に対し薬剤感受性試験を行い、PDOX モデルにおいて腫瘍縮小効果を示す薬剤を明らかとしたが、患者病勢の進行が早く実臨床における治療選択の指標とすることはできなかった。「骨親和性の高い新規プラチナ製剤」は骨肉腫 PDOX に対しシスプラチンを上回る抗腫瘍効果を示した。「腫瘍特異性の高いバクテリア」、「腫瘍のメチオニン代謝をブロックするメチオニン阻害剤」はいずれも脱分化型脂肪肉腫 PDOX モデルに対しドキソルビシンを上回る抗腫瘍効果を示した。本研究において PDOX モデルは、1. 悪性骨軟部腫瘍の個別化医療にむけた取り組み、2. 新規治療の悪性骨軟部腫瘍への応用として有用である可能性を示した。

ドキソルビシン抵抗性後腹膜脱分化型脂肪肉腫に対する rMETase と腫瘍特異的バクテリアの併用療法



166. 患者腫瘍同所移植モデルによる骨軟部肉腫の治療開発

五十嵐　健太郎

金沢大学 大学院医薬保健学総合研究科 先進運動器医療創成講座

Key words：軟部肉腫，骨肉腫，患者由来腫瘍同所移植モデル，個別化医療，新規治療

緒　言

原発性悪性骨軟部腫瘍は発生頻度が低く、100 種類以上の病理組織分類が存在しており、それぞれ全く異なる性質を持ついわゆる希少がんの集合である［1］。市場規模の小ささから新規薬剤開発のハードルが高く、それぞれの病理型に細分化すると発生頻度が極端に少ないため、新規薬剤の標準治療に向けた大規模臨床試験にも困難を伴っている。

近年導入された新薬は、薬剤承認に向けた多国籍多施設共同臨床試験で疾患全体に対しての有効性は明らかとなったものの、それぞれの病理組織ごとに有用性が評価できるだけの患者数が揃わず、各薬剤の病理型ごとの位置付けは全く定まっていない。

これに対し欧州や米国では希少がん患者への個別化医療としてのアプローチが進められている。患者の腫瘍をヌードマウスの皮下に移植した患者由来腫瘍移植マウスモデルを作製し、マウスモデルに対して各薬剤を投与し薬剤感受性試験を行うことで実臨床における薬剤選択の指標とし、個別化医療を進めることが提言され、マウスモデルで奏功した薬剤が実臨床でも一定の効果を示すことが明らかとなっている［2］。

我々はカリフォルニア大学サンディエゴ校（University of California、San Diego）との共同研究において、Patient derived orthotopic xenograft （患者由来組織の同所性異種移植、以下 PDOX）を用いた腫瘍モデルを確立してきた［3］。この PDOX モデルは腫瘍を患者の体内発生部位と同じ臓器に移植するため、皮下移植モデルと比べ、腫瘍周囲の微小環境の再現性が高く、移植した腫瘍組織は実際の患者の腫瘍と同様の浸潤、転移形式をとり、皮下移植モデルと比較し PDOX モデルでは腫瘍増殖速度がより速く、治療後の局所再発も来すことから、悪性骨軟部腫瘍の臨床をより反映していることを明らかとした。

本研究では、より臨床を反映した動物モデルである PDOX モデルマウスを用い、実際の患者で使用予定の抗腫瘍薬を投与し、その治療効果と実臨床における治療成績の相関を調べることにより、治療効果予測における PDOX モデルの有用性を検討した。

また、これまでに我々が新規開発を行ってきた「腫瘍特異性の高いバクテリア」［4］「腫瘍の代謝を応用した薬剤」［5］による治療や「新規プラチナ製剤」［6］を用い PDOX モデルにおいてその有用性を検討した。

方　法

1.　骨軟部肉腫 PDOX モデルの作製、実臨床との比較

PDOX モデル作製：文章で本研究に同意の得られた骨軟部肉腫患者の手術に際し切除した腫瘍の一部を採取し腫瘍片に分割し、ヌードマウスの皮下に移植した（金沢大学医学倫理審査委員会にて承認；試験番号 2861、試験番号 2904、金沢大学学際実験センター動物実験施設にて承認；承認番号 AP-183997）。腫瘍が 15 mm 以上に成長した時点で切除して再度腫瘍片を作製し、ヌードマウスの患者発生部位と同所へ移植（骨腫瘍は脛骨 or 大腿骨、四肢発生軟部腫瘍は大腿二頭筋 or 大腿四頭筋、後腹膜発生の軟部腫瘍は後腹膜腔に移植）。同所移植した腫瘍が 15 mm 以上に成長した段階で PDOX の樹立と定義し、作製した PDOX モデルを継続して観察した。これらの PDOX モデルにおける腫瘍の性質と患者の腫瘍の性質を比較し、さらに患者の経過観察において腫瘍の局所再発、遠隔転移、生存期間を調査し、PDOX モデルと臨床経過の相関を調査した。

2. PDOX モデルに対する薬剤感受性試験

作製した PDOX モデルに対し臨床上使用可能な各種薬剤を投与し治療を行い、最も効果の高い薬剤を見出した。また実際の臨床における治療経過を観察し、PDOX モデルに対する薬剤感受性試験の結果が実臨床と相関するかどうかについて検討した。

3. PDOX モデルを用いた新規治療の感受性試験

我々が骨軟部肉腫に対する新規治療として開発した「腫瘍特異性の高いバクテリア：*Salmonella typhimurium* A1-R」、「骨親和性の高い新規プラチナ製剤：3Pt」、「腫瘍のメチオニン代謝をブロックするメチオニン阻害剤：rMETase」の有用性についても PDOX モデルを用いて検証し臨床応用の可能性につき評価した。

結　果

1. 骨軟部肉腫 PDOX モデルの作製、実臨床との比較

大腿部横紋筋肉腫 60 代男性の手術で得られた検体より皮下移植マウスモデルと PDOX モデルをともに作製し、両モデルの腫瘍が 20 mm に到達した段階で辺縁切除を施行した。切除後皮下移植マウスモデルからは腫瘍の再発を認めなかったが PDOX モデルにおいては 6 割以上の高確率に局所再発を認めた（図 1）。

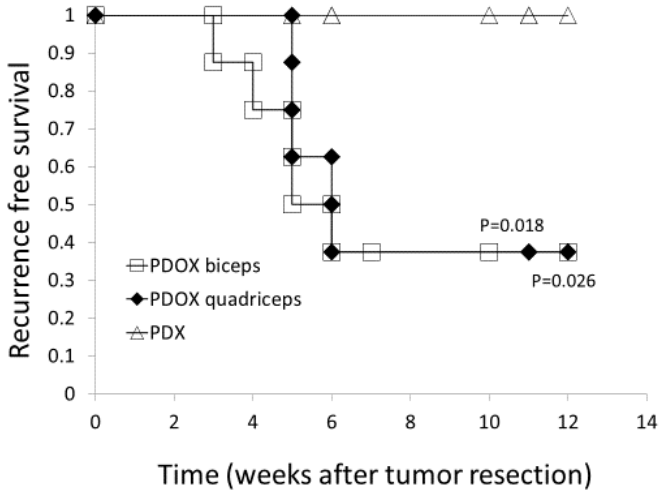


図 1. 横紋筋肉腫 PDOX モデルと PDX（皮下移植）モデルにおける腫瘍切除後の再発
皮下移植モデルは腫瘍切除後に局所再発を来さなかったが、四頭筋移植 PDOX モデルと大腿二頭筋移植 PDOX モデルでは腫瘍切除後に局所再発した。log-rank test。

大腿骨遠位骨肉腫 10 代女性の再発手術時に得られた検体を大腿骨遠位に移植し PDOX マウスモデルを作製し、シスプラチンによる加療を行った。非治療群と比較しシスプラチン加療による有意な抗腫瘍効果を認めなかった。実臨床の患者治療においてもシスプラチン治療後の再発でありシスプラチン抵抗性が PDOX モデルで再現できていることが確認された（図 2）。

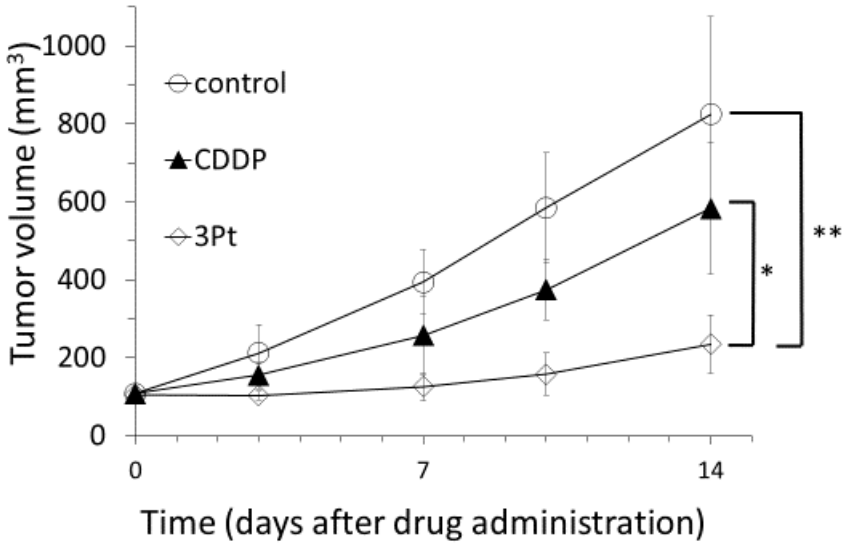


図 2. 骨肉腫 PDOX モデルにおけるシスプラチンと 3Pt の抗腫瘍効果

ヌードマウス大腿骨遠位に骨肉腫 PDOX モデルを作製しシスプラチンと 3Pt を 2 週間投与し抗腫瘍効果につき検討を行った。

CDDP：20 μ mol/kg＝6 mg/kg/week i. p. for 2 weeks、3Pt：15 μ mol/kg＝41.1 mg/kg/week i.p. for 2 weeks。N＝8 mice/group、Mann-Whitney *U* test（*p＝0.0004、**p＝0.0002）。

また、後腹膜腔脱分化型脂肪肉腫 60 代男性の再発手術時に得られた検体を後腹膜空に移植し PDOX マウスモデルを作製し、ドキソルビシンによる治療を行った。非治療群と比較しドキソルビシン加療による有意な抗腫瘍効果を認めなかった。実臨床の患者治療においてもドキソルビシンによる加療の治療効果を認めておらず、本例においてもドキソルビシン抵抗性が PDOX モデルで再現できていることが確認された（図 3）。

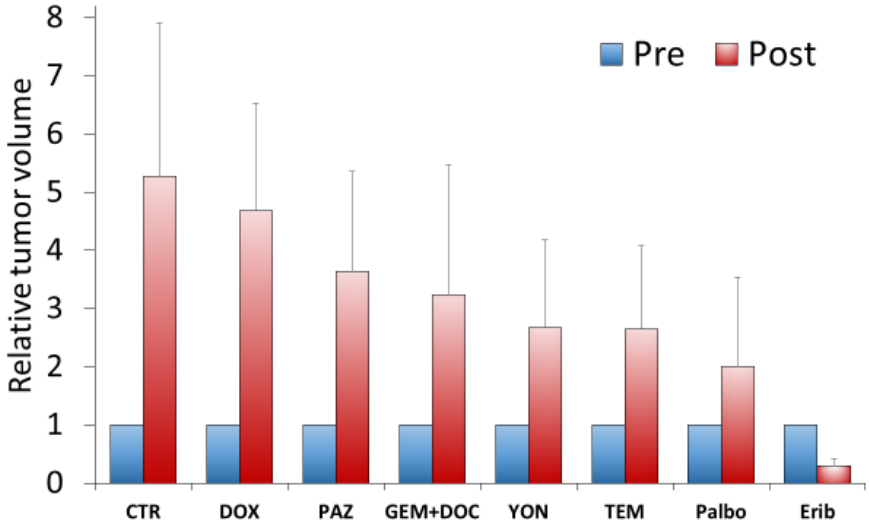


図 3. 脱分化型脂肪肉腫、後腹膜 PDOX モデルに対するドキソルビシン、パゾパニブ、ゲムシタビン＋ドセタキセル、ヨンデリス、テモゾロミド、パルボシクリブ、エリブリンの抗腫瘍効果

後腹膜発生の再発脱分化型脂肪肉腫をマウスの左後腹膜に移植した PDOX モデルを作製し、各種薬剤を投与し 2 週間後に後腹膜腫瘍のサイズを再度測定、治療開始時のサイズを 1 とした際の腫瘍サイズ比を評価した。

DOX：3 mg/kg/week、i.p. for 2 weeks、PAZ：100 mg/kg/day、p.o. for 14 days、GEM：100 mg/kg、i.p.、weekly for 2 weeks combined with DOC：20 mg/kg、i.p. once、YON：0.15 mg/kg/week、i.v. for 2 weeks、TEM：25 mg/kg/day、p.o. for 14 days、Palbo：100 mg/kg/day、p.o. for 14 days and Erib：1.5 mg/kg/week、i.v. for 2 weeks。N＝8 mice/group。

2. PDOX モデルに対する薬剤感受性試験

さらに、この後腹膜腔脱分化型脂肪肉腫 PDOX マウスモデルに対しドキソルビシン、パゾパニブ、ゲムシタビン＋ドセタキセル、ヨンデリス、パルボシクリブ、テモゾロミド、エリブリンの 7 種類による加療を行った。唯一エリブリン治療群のみにおいて治療開始前と比較し有意な腫瘍縮小効果を得た（前述図 3)。しかしながら、現病の進行による全身状態悪化により、患者希望があったものの、PDOX マウスモデルによる薬剤感受性試験にて有効性を示したエリブリン（軟部肉腫の化学療法として保険適応あり）による加療を行うことはできなかった。

新規薬剤に関しては我々が開発し、細胞株において骨肉腫に対する有意な抗腫瘍効果を示した骨親和性の高い新規プラチナ製剤：3Pt を前述の骨肉腫 PDOX モデルに対し使用しその効果につきシスプラチンと比較検討した。PDOX マウスモデルより骨肉腫細胞株を樹立しシスプラチン、3Pt を用い細胞増殖抑制効果につき WST assay を施行した。両薬剤ともに濃度依存性に細胞増殖抑制効果を示し（図 4)、IC50 はシスプラチンの 4.72μM に対し 3Pt は 0.41μM と強い抗腫瘍効果を示した。PDOX マウスモデルに対してはシスプラチン治療群では有意な抗腫瘍効果は得られなかったが、3Pt 治療群で有意な腫瘍増殖抑制効果を示した（前述図 2)。

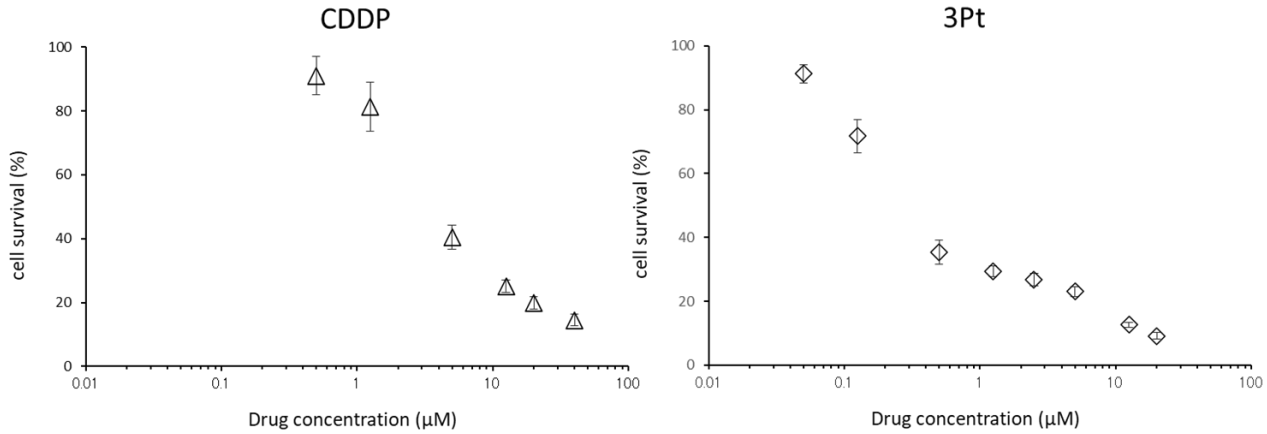


図 4. WST-8 を用いた患者由来骨肉腫細胞株に対するシスプラチンと新規プラチナ製剤：3Pt の腫瘍増殖抑制試験

骨肉腫 PDOX モデルより細胞株を作製し、各薬剤投与後 72 時間で WST-8 にて細胞増殖抑制効果につき検討を行った。

3. PDOX モデルを用いた新規治療の感受性試験

また、腫瘍特異性の高いバクテリア：Salmonella typhimurium A1-R と腫瘍のメチオニン代謝をブロックするメチオニン阻害剤：rMETase を用い後腹膜腔脱分化型脂肪肉腫に対し使用しその効果につきドキソルビシンと比較検討した。ドキソルビシン治療では PDOX マウスモデルに対して有意な抗腫瘍効果は得られなかったが Salmonella typhimurium A1-R 治療群、rMETase 治療群でともに有意な腫瘍増殖抑制効果を示し、Salmonella typhimurium A1-R と rMETase の併用群において有意な腫瘍縮小効果を示した（図 5)。

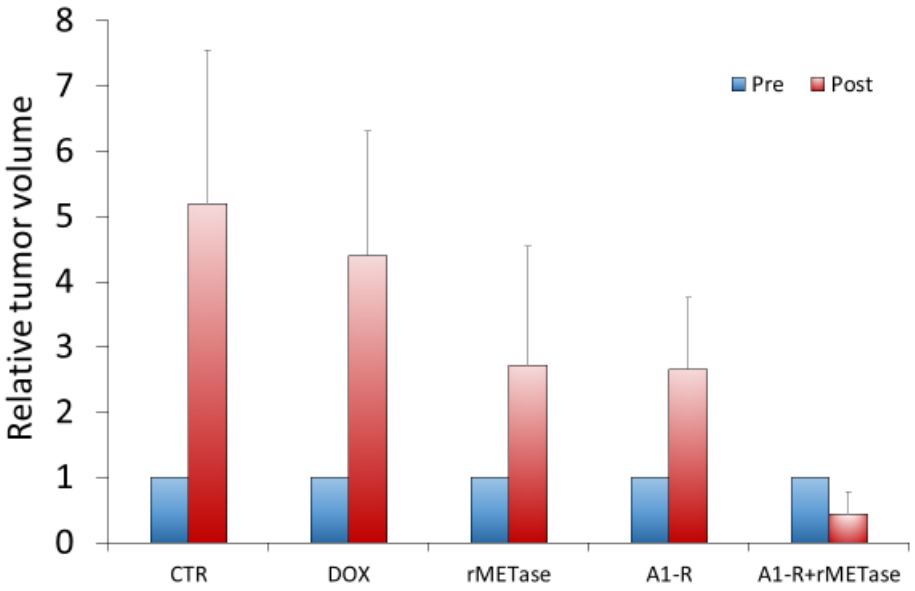


図 5. 後腹膜脱分化型脂肪肉腫に対するドキソルビシン（DOX）、rMETase、S. typhimurium A1-R（A1-R）、A1-R と rMETase の併用療法の効果

後腹膜発生の再発脱分化型脂肪肉腫をマウスの左後腹膜に移植した PDOX モデルを作製し、各種薬剤を投与し 2 週間後に後腹膜腫瘍のサイズを再度測定、治療開始時のサイズを 1 とした際の腫瘍サイズ比を評価した。

DOX：3 mg/kg/week i.p. for 2 weeks、rMETase：100 U/mouse/day、i.p. for 14 days、S. typhimurium A1-R：5×10^7CFU/week for 2 weeks、i.v.。N＝8 mice/group。

考　察

本研究において「大腿に発生した横紋筋肉腫」、「大腿骨遠位に発生した骨肉腫」、「後腹膜腔に発生した脱分化型脂肪肉腫症例」の手術で得られた検体より PDOX モデルを作製し、実臨床上の経過との相関につき検討を行った。横紋筋肉腫 PDOX モデルは切除後に再発を来しており、臨床における経過と一致していた。

また、いずれの PDOX モデルも臨床上の第一選択薬が無効の症例であったが、PDOX モデルにおける薬剤感受性試験においても第一選択薬に抵抗性であり臨床との相関を認めた。しかしながら、本研究で使用し、効果を認めた新規治療薬に関しては臨床上保険適応となっていたものの、病勢の進行により化学療法遂行不可能となったため、患者希望にも関わらず使用できないという経過であった。このことは難治性稀少がんである骨軟部肉腫において個別化医療を考えるうえで時間的制約が存在し、PDOX モデル作製と薬剤感受性試験にかかる時間を可能な限り短縮する工夫が必要であると考えられた。具体的には、本研究のように再発時の腫瘍を用いた PDOX 作製では患者に残された時間が限られているため、初診時の診断目的の生検検体を用い PDOX 作製しておくことが有用であると考えられた。

また、我々がこれまでに開発し細胞株レベルでその治療効果を明らかとしていた「腫瘍特異性の高いバクテリア：*Salmonella typhimurium* A1-R」、「骨親和性の高い新規プラチナ製剤：3Pt」、「腫瘍のメチオニン代謝をブロックするメチオニン阻害剤：rMETase」はいずれも本研究において標準治療抵抗性の悪性骨軟部肉腫 PDOX に対し有効性を示し、臨床応用への期待は大きいものとなった。今後は本研究で使用した骨肉腫、脱分化型脂肪肉腫以外の悪性骨軟部腫瘍に対する効果を検討し、臨床応用へ向けた研究を継続したい。

共同研究者・謝辞

本研究の共同研究者は、金沢大学大学院整形外科学研究室教授の土屋弘行先生、金沢大学大学院医薬保健学総合研究科先進運動器医療創成講座の山本憲男先生である。

文　献

1) Fletcher CD, Hogendoorn P, Mertens F, Bridge J. WHO Classification of Tumours of Soft Tissue and Bone. 5th ed. Lyon, France: IARC Press; 2020.

2) Stebbing J, Paz K, Schwartz GK, Wexler LH, Maki R, Pollock RE, Morris R, Cohen R, Shankar A, Blackman G, Harding V, Vasquez D, Krell J, Zacharoulis S, Ciznadija D, Katz A, Sidransky D. Patient-derived xenografts for individualized care in advanced sarcoma. Cancer. 2014 Jul 1;120(13):2006-15. PMID: 24705963 DOI: 10.1002/cncr.28696

3) Russell TA, Eckardt MA, Murakami T, Elliott IA, Kawaguchi K, Kiyuna T, Igarashi K, Li Y, Crompton JG, Graham DS, Dry SM, Bernthal N, Yanagawa J, Kalbasi A, Federman N, Chmielowski B, Singh AS, Hoffman RM, Eilber FC. Clinical Factors That Affect the Establishment of Soft Tissue Sarcoma Patient-Derived Orthotopic Xenografts: A University of California, Los Angeles, Sarcoma Program Prospective Clinical Trial. JCO Precis Oncol. 2017;2017:10.1200/PO.17.00071. doi: 10.1200/PO.17.00071.

4) Hoffman RM. Tumor-Targeting Salmonella Typhimurium A1-R: An Overview Methods Mol Biol. 2016;1409:1-8. doi: 10.1007/978-1-4939-3515-4_1.

5) Hoffman RM. Development of recombinant methioninase to target the general cancer-specific metabolic defect of methionine dependence: a 40-year odyssey. Expert Opin Biol Ther. 2015 Jan;15(1):21-31. doi: 10.1517/14712598.2015.963050.

6) Igarashi K, Yamamoto N, Hayashi K, Takeuchi A, Miwa S, Odani A, Tsuchiya H. Effectiveness of two novel anionic and cationic platinum complexes in the treatment of osteosarcoma. Anticancer Agents Med Chem. 2015;15(3):390-9. doi: 10.2174/1871520615666141216151547.