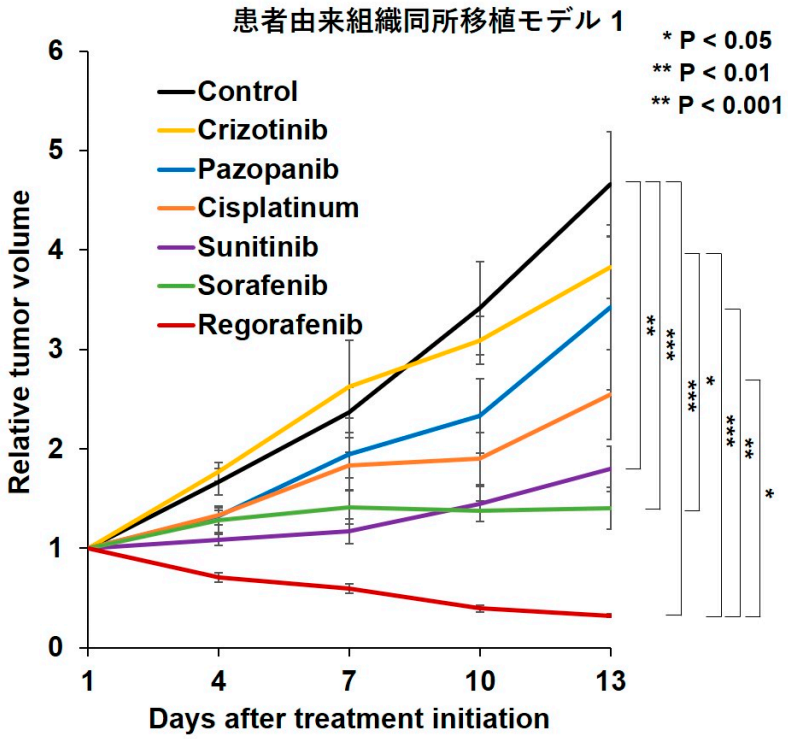
187　骨肉腫に対するマルチキナーゼ阻害薬の効果解析	樋口　貴史

【目的】我々は、患者由来組織同所移植モデルを用いて、骨肉腫に有効な薬剤を網羅的に解析し、マルチキナーゼ阻害薬（multi-kinase inhibitors：MKIs）の一部が骨肉腫に効果的である可能性を報告した。本研究では、骨肉腫の患者由来組織同所移植モデルを樹立し、MKIs の中から、骨肉腫に効果のある薬剤を見出し、その抗腫瘍効果のメカニズムを病理学的に明らかにすることである。

【方法】骨肉腫患者 2 例の腫瘍組織を用いて、骨肉腫患者由来組織同所移植モデルを 2 系統樹立し、コントロール群、cisplatinum（標準治療）群と各種 MKIs 群（pazopanib 群、crizotinib 群、sunitinib 群、sorafenib 群、regorafenib 群）にランダムに振り分け、2 週間の治療を行った。治療中は、腫瘍サイズとマウスの体重を週 2 回計測した。治療終了後に腫瘍を切除し、治療効果を組織学的に評価した。

【結果】いずれのモデルでも、cisplatin 群、crizotinib 群、pazopanib 群では有意な増殖抑制効果を認めなかった。Sunitinib 群と sorafenib 群では、片方のモデルでのみ有意な増殖抑制効果を認めた。Regorafenib 群では両モデルで有意な増殖抑制効果を認め、切除腫瘍において広範な壊死と線維化を認めた。すべての群において、治療前後の有意な体重減少を認めなかった。

骨肉腫患者由来組織同所移植モデルにおける各 MKI 治療群の腫瘍増殖曲線



187. 骨肉腫に対するマルチキナーゼ阻害薬の効果解析

樋口　貴史

金沢大学 医薬保健研究域 医学系 整形外科学

Key words：骨肉腫，マルチキナーゼ阻害薬，患者由来組織同所移植モデル，ヌードマウス，
ドラッグリポジショニング

緒　言

近年、分子標的薬や免疫療法の開発に伴い、多くの癌腫において治療成績が向上している。一方、骨肉腫の発生数は本邦において年間 200 人前後に過ぎないため、新規治療の開発が進行せず、今でも臨床使用可能な化学療法は cisplatinum、doxorubicin、ifosfamide、methotrexate に限られている。このように薬剤開発が進まない希少がんにおいて、別の疾患の治療薬を転用するドラッグリポジショニングが高い関心を集めている。

我々はドラッグリポジショニングにより、骨肉腫に有効な治療薬を見出すため、患者由来腫瘍をヌードマウスに同所性移植したモデル（患者由来組織同所移植モデル）を用いて、既存薬の中から骨肉腫に有効な薬剤を解析している［1、2］。近年の腫瘍領域の基礎研究において、組織学的および遺伝学的特性を移植後も保有し、継代後も安定して発現させることができる患者由来腫瘍異種移植モデル（patient-derived xenograft：PDX）が注目されている［3］。さらに、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、患者由来組織を元の腫瘍と同じ部位（臓器）に移植する患者由来組織同所移植モデルを確立した［1、2］。このモデルでは、皮下に移植する PDX モデルでは認めなかった遠隔転移を再現することを可能にした［2］。また、骨肉腫においては、組織診断に必須な腫瘍性類骨を PDX では認めることができなかったが、マウスの大腿骨に移植した同所性移植モデルにおいて、それを確認することができた［2］。このように、患者由来組織同所移植モデルは元の腫瘍をより忠実に再現できるため、前臨床段階における新薬の解析方法として大きく注目されている［4］。

我々は骨肉腫において患者由来組織同所移植モデルを初めて確立し、他癌腫に適応のある新規分子標的薬や実験段階の薬剤などの治療効果を解析する研究を行ってきた［5］。その中で、マルチキナーゼ阻害薬（multikinase inhibitors、MKIs）に分類され、腎細胞癌治療に用いられる sorafenib が骨肉腫患者由来組織同所移植モデルの腫瘍増殖を有意に抑制して、腫瘍壊死を生じることを報告し［6］、MKIs が骨肉腫に対して抗腫瘍効果を有する可能性を見出した。これまでに、sorafenib 以外にも数種類の MKIs が、一部の癌腫に対して臨床応用されているが、骨肉腫に対する MKIs の効果は十分に明らかにされていない。MKIs は血管内皮細胞増殖因子受容体（VEGFR）や血小板由来増殖因子受容体（PDGFR）、幹細胞因子受容体（c-Kit）など複数の増殖因子を阻害することで、抗腫瘍効果を発揮するが、骨肉腫においても、それらの遺伝子変異や異常発現が報告されているため、MKIs が骨肉腫に有効である可能性は高い。

本研究では、複数の骨肉腫患者由来組織同所移植モデルを用いて、MKIs の中から骨肉腫に効果的な薬剤を明らかにし、治療した腫瘍を病理学的に解析することで、見出した MKIs の骨肉腫に対する抗腫瘍効果メカニズムを明らかにする。

方　法

1.　骨肉腫患者由来組織同所移植モデルの樹立

骨肉腫患者の生検及び手術検体の一部を採取した（モデル 1：14 歳、骨盤骨肉腫の生検検体。生検前に化学療法や放射線療法は実施されていない；モデル 2：23 歳、脛骨転移性骨肉腫の手術検体。術前に cisplatin ベースの化学療法が

実施された。)。新鮮な腫瘍サンプルを氷上で実験室に運び、腫瘍ストックを作るために、ヌードマウスの背部皮下に移植し、腫瘍を増殖させた。腫瘍が 10 mm 以上に成長した後、腫瘍を切除し、2〜3 mm の腫瘍片にして、ヌードマウスの大腿骨に同所性に移植することで骨肉腫患者由来組織同所移植モデルを樹立した。同所性移植では、マウス大腿外側に 1.5 cm 程度の皮膚切開を行い、大腿骨遠位端の外側広筋と大腿二頭筋を切開し、膝蓋大腿外側靭帯を展開した。大腿骨の外顆を鋏で切除し、できたスペースに腫瘍片を 1 つ挿入した。筋肉と皮膚をそれぞれナイロン糸で縫合し、閉創した。

2. マウスの治療と観察

腫瘍径が 5 mm 程度に成長した骨肉腫患者由来組織同所移植モデルを 6 匹ずつ以下の 7 つの治療群(コントロール、標準治療薬、MKIs 5 種)にランダムに振り分けた;コントロール群:生理食塩水 100 μL/日、cisplatinum 群(標準治療薬):6 mg/kg/週、pazopanib 群:50 mg/kg/日、sunitinib 群:40 mg/kg/日、sorafenib 群:30 mg/kg/日、crizotinib 群:25 mg/kg/日、regorafenib 群:30 mg/kg/日。コントロール群と MKIs 群は経口投与を行い、cisplatinum 群は腹腔内注射を行った。治療は 2 週間継続し、腫瘍サイズ(腫瘍直径×短径×短径/2)とマウス体重を週 2 回計測した。

3. 腫瘍の組織学的解析

2 週間の治療が終了した後、マウスを苦痛が伴わないようにと殺し、腫瘍を摘出した。摘出した腫瘍はホルマリンで固定し、パラフィン包埋してブロックで保存した。パラフィンブロックをミクロトームで切片にし、プレパラート上で脱パラフィンを行った後に、ヘマトキシリンエオジン(hematoxylin and eosin:HE)染色を行った。HE 染色した切片を顕微鏡で観察し、治療による効果(腫瘍壊死や線維化等)を評価した。

4. 統計解析

一元配置分散分析及び対応のある t-検定を統計ソフト EZR(自治医科大学埼玉医科大学)で解析した。データは平均値±標準誤差で示した。すべての p 値は両側とし、p≦0.05 の値を有意とした。

結 果

1. MKIs の骨肉腫患者由来組織同所移植モデルにおける効果

2 つの骨肉腫患者由来組織同所移植モデルにおいて、regorafenib 群でのみ腫瘍の縮小を認め、コントロール群、crizotinib 群、pazopanib 群、cisplatinum 群と比較し、有意であった(図 1、2)。1 つのモデルにおいては、sunitinib 群と sorafenib 群においてコントロール群と比較し、有意な腫瘍の増殖抑制を認めたが、もう一方のモデルでは、有意差を認めなかった。

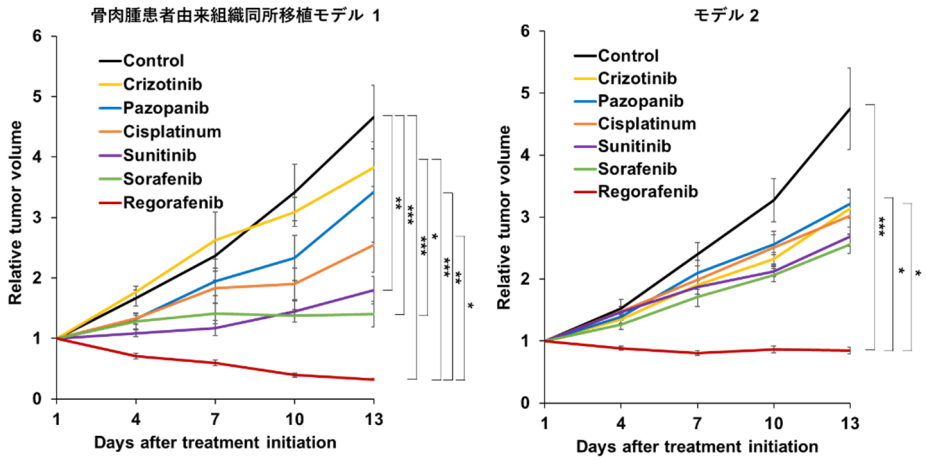


図 1. 骨肉腫患者由来組織同所移植モデルにおける腫瘍増殖曲線

折れ線グラフは、各期間における平均腫瘍サイズを治療開始時の平均腫瘍サイズで除した値。2 週間の治療期間において、両モデルで regorafenib 群において、有意な腫瘍の縮小を認めた。* p<0.05、** p<0.01、*** p<0.001。

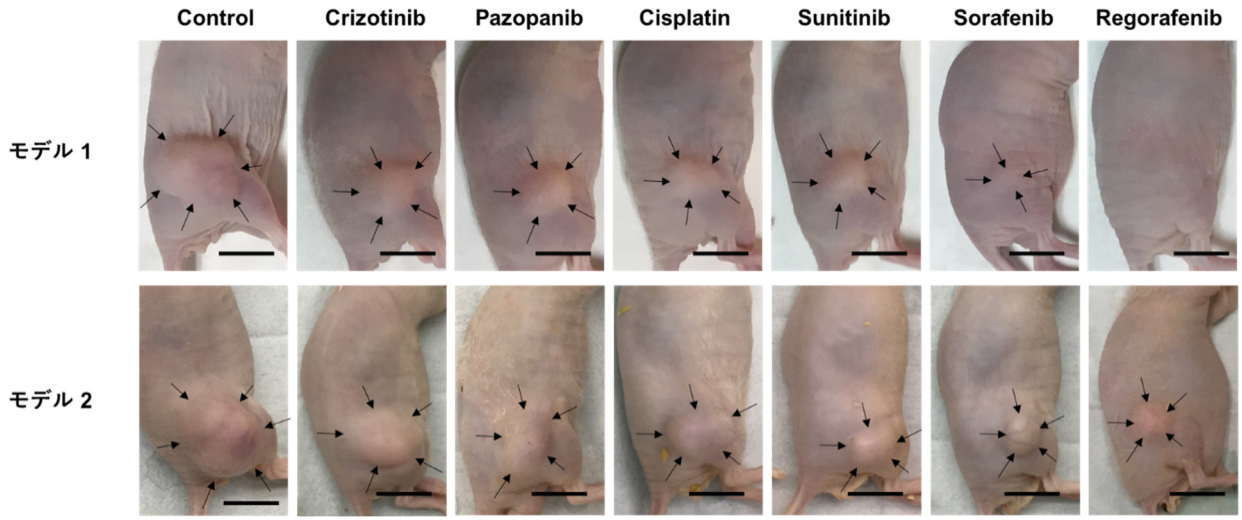


図 2. 治療終了時の両モデルの各治療群の代表写真
矢印は腫瘍の辺縁を示している。Regorafenib 群において、コントロールや各治療群と比較し、腫瘍の縮小を認めた。スケールバー：10 mm。

2. 摘出腫瘍の病理解析

2 つのモデルにおいて、regorafenib 群の摘出腫瘍で、腫瘍細胞が完全壊死し、間質の線維化を認めた。1 つのモデルにおいては、そのほかの治療群においても、腫瘍細胞の核の膨化や腫瘍密度の低下などの抗腫瘍効果を認めたが、もう一方のモデルにおいては、regorafenib 群以外では sorafenib 群においてのみ、腫瘍壊死と間質の線維化を認めた（図 3）。

3. MKI 治療の合併症やマウス体重における影響

2 つのモデルにおいて、治療前後で有意な体重減少を認めなかった。また、死亡（脆弱を含む）したマウスを認めなった。

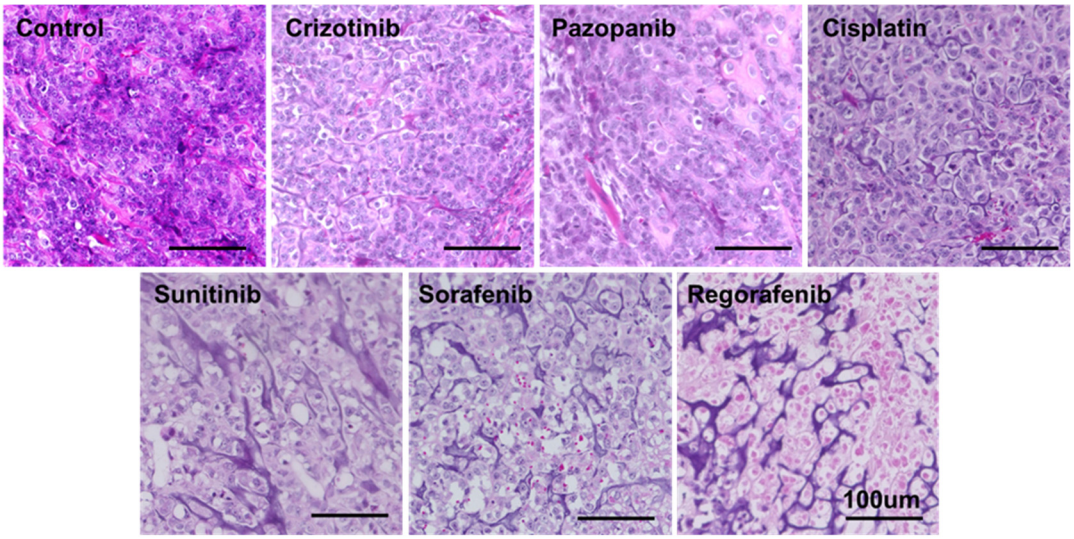


図3. 骨肉腫患者由来組織同所移植モデル2の摘出腫瘍の病理組織
Crizotinib群、pazopanib群、cisplatin群、sunitinib群、sorafenib群において、部分的な腫瘍壊死と腫瘍密度の低下、間質の線維化等を認めた。Regorafenib群においては、腫瘍の完全壊死を認めた。スケールバー：100 μm。

考　察

創薬等の研究における従来の皮下腫瘍モデルはモノクローナルな細胞の集塊になってしまうが、腫瘍組織を移植したモデルでは、ヘテロな細胞集団を再現できる。また、皮下移植では増殖が緩徐で転移を認めない場合でも、腫瘍本来の臓器に同所性移植すると、元の悪性度を反映するように増殖し、転移を観察できることから、腫瘍組織を同所性移植することで、腫瘍の微小環境も再現することができると考えられている［2～4］。患者由来組織同所移植モデルは腫瘍の組織学的および遺伝学的特性を移植後も保有し、オリジナルの微小環境を再現できるため、従来の動物モデルと比較して、薬剤の治療効果の予測能が高く、研究結果が臨床に直結しやすいと考えられている［2～4］。

本研究において、新規の薬剤開発の少ない骨肉腫に対し、すでに他癌腫で臨床応用されている MKIs の中から regorafenib が効果的である可能性を新たに見出した［7］。Regorafenib は結腸癌、肝癌、GIST でのみ使用可能で、多様なキナーゼを阻害することで抗腫瘍効果を発揮する。今回、2 系統の骨肉腫患者由来組織同所移植モデルにおいて、regorafenib が他のマルチキナーゼ阻害薬と比較して、腫瘍増殖を有意に抑制することを見出した。今後、さらなる解析を追加し、regorafenib が骨肉腫治療において、新しい治療薬になることを期待している。

共同研究者・謝辞

本研究の共同研究者は、University of California、San Diego（UCSD）の Robert M. Hoffman 教授である。

文　献

1） Higuchi T, Igarashi K, Yamamoto N, Hayashi K, Kimura H, Miwa S, Bouvet M, Tsuchiya H, Hoffman RM. Osteosarcoma Patient-derived Orthotopic Xenograft (PDOX) Models Used to Identify Novel and Effective Therapeutics: A Review. Anticancer Res. 2021 Dec;41(12):5865-5871. doi: 10.21873/anticanres.15406. PMID: 34848441.

2） Igarashi K, Kawaguchi K, Murakami T, Miyake K, Kiyuna T, Miyake M, Hiroshima Y, Higuchi T, Oshiro H, Nelson SD, Dry SM, Li Y, Yamamoto N, Hayashi K, Kimura H, Miwa S, Singh SR, Tsuchiya H, Hoffman RM. Patient-derived orthotopic xenograft models of sarcoma. Cancer Lett. 2020 Jan 28;469:332-339. doi: 10.1016/j.canlet.2019.10.028. Epub 2019 Oct 19. PMID: 31639427.

3） Stewart E, Federico SM, Chen X, Shelat AA, Bradley C, Gordon B, Karlstrom A, Twarog NR, Clay MR, Bahrami A, Freeman BB 3rd, Xu B, Zhou X, Wu J, Honnell V, Ocarz M, Blankenship K, Dapper J, Mardis ER, Wilson RK, Downing J, Zhang J, Easton J, Pappo A, Dyer MA. Orthotopic patient-derived xenografts of paediatric solid tumours. Nature. 2017 Sep 7;549(7670):96-100. doi: 10.1038/nature23647. Epub 2017 Aug 30. PMID: 28854174; PMCID: PMC5659286.

4） Zheng D. Orthotopic tumours, a hot topic for xenograft models? EBioMedicine. 2019 Mar;41:11-12. doi: 10.1016/j.ebiom.2019.02.052. Epub 2019 Mar 1. PMID: 30833189; PMCID: PMC6443581.

5） Higuchi T, Miyake K, Sugisawa N, Oshiro H, Zhang Z, Razmjooei S, Yamamoto N, Hayashi K, Kimura H, Miwa S, Igarashi K, Bouvet M, Singh SR, Tsuchiya H, Hoffman RM. Olaratumab combined with doxorubicin and ifosfamide overcomes individual doxorubicin and olaratumab resistance of an undifferentiated soft-tissue sarcoma in a PDOX mouse model. Cancer Lett. 2019 Jun 1;451:122-127. doi: 10.1016/j.canlet.2019.03.003. Epub 2019 Mar 10. PMID: 30867142.

6) Higuchi T, Sugisawa N, Miyake K, Oshiro H, Yamamoto N, Hayashi K, Kimura H, Miwa S, Igarashi K, Kline Z, Belt P, Chawla SP, Bouvet M, Singh SR, Tsuchiya H, Hoffman RM. Combination Treatment With Sorafenib and Everolimus Regresses a Doxorubicin-resistant Osteosarcoma in a PDOX Mouse Model. Anticancer Res. 2019 Sep;39(9):4781-4786. doi: 10.21873/anticanres.13662. PMID: 31519579.

7) Higuchi T, Igarashi K, Yamamoto N, Hayashi K, Kimura H, Miwa S, Bouvet M, Tsuchiya H, Hoffman RM. Multikinase-Inhibitor Screening in Drug-resistant Osteosarcoma Patient-derived Orthotopic Xenograft Mouse Models Identifies the Clinical Potential of Regorafenib. Cancer Genomics Proteomics. 2021 Sep-Oct;18(5):637-643. doi: 10.21873/cgp.20286. PMID: 34479916; PMCID: PMC8441758.