

平成 30 年 6 月 21 日現在

機関番号：32676

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2015～2017

課題番号：15K06845

研究課題名(和文) 骨肉腫転移巣における治療抵抗性獲得の分子機構解明と克服

研究課題名(英文) Investigation of the molecular mechanisms underlying therapeutic resistance in osteosarcoma metastasis

研究代表者

清水 孝恒 (SHIMIZU, TAKATSUNE)

星薬科大学・薬学部・准教授

研究者番号：40407101

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,900,000円

研究成果の概要(和文)：骨肉腫の臨床上的問題は治療抵抗性の転移巣にあり、独自の動物モデルを用いて克服に取り組んだ。治療の有無で変動する遺伝子発現変化から、マクロファージの集積や血栓形成が治療抵抗性に関与する可能性が示唆された。一方、転移巣形成に重要である足場非依存性増殖能を阻害する薬剤の探索から simvastatin と calcitriol が候補として抽出された。前者は AMPK-p38 MAPK の活性化を介して骨肉腫に apoptosis を誘導し、後者は小胞体ストレス反応を誘導することにより細胞増殖を停止させた。両薬剤は in vivo で有意な抗腫瘍効果を示し、最適化により難治性転移巣に対しても効果を発揮する可能性がある。

研究成果の概要(英文)：The elucidation of molecular mechanisms underlying therapeutic resistance in metastasis of osteosarcoma (OS) and development of novel therapies are urgently needed. The changes of gene expression caused by chemotherapy suggested that macrophages or thrombosis might be involved in the therapeutic resistance in lung metastasis. Through the screening of drugs, simvastatin and calcitriol were found to inhibit anchorage-independent growth, an important property for the establishment of metastasis. Simvastatin induced apoptosis in a manner dependent on inhibition of the mevalonate synthetic pathway. Combination of simvastatin and a fat-free diet exerted a significant antitumor effect. Calcitriol induced cell cycle arrest by activating the ER stress response. A single dose of calcitriol was sufficient to inhibit tumor growth. These findings indicated the potential of both drugs as novel therapeutic options for OS metastasis although further refinement of the optimal conditions is required.

研究分野：腫瘍生物学

キーワード：骨肉腫 転移 治療抵抗性

### 1. 研究開始当初の背景

難治性間葉系悪性腫瘍であるヒト骨肉腫は若年者に多く、未だ2割以上の罹患者で長期生存が得られない予後不良の疾患である。多くのケースで診断時よりすでに遠隔転移(主に肺転移巣)が存在する。その治療抵抗性と管理の難しさが長期予後を不良にする一番の原因であり、その状況はここ20年以上打開策が見出されていない。即ち、転移巣の分子病態の解明、病勢を管理する新規治療標的分子の発見、及び新規治療法開発が急務である(Cancer Treat Res 152:239-62,2009, Paediatr Drugs 10:315-27)。

ヒト骨肉腫を忠実に模倣する動物モデルが存在しなかったことが研究上問題であったが、申請者らは、マウス骨髄ストローマ細胞から *Ink4a/Arf*-/- 及び *c-MYC* 過剰発現の条件により骨肉腫がん幹細胞モデル (AXT 細胞) を樹立した(Oncogene 29:5687-5699,2010)。この細胞は免疫系が正常なマウス (C57BL/6) への移植により骨形成を伴う原発巣を形成し、2-3週間で遠隔転移をおこす。病理・病態像がヒト骨肉腫を極めて模倣したマウスモデルである。

モデルを用いて、担がんマウスに既存の化学療法を強力に施行しても肺転移巣には依然多くの腫瘍が残存することが明らかとなった。この所見は肺転移巣において化学療法に耐性をもたらす分子機構が存在することを示唆する。そこで、転移巣における治療抵抗性の分子機構解明とそれを克服する新規治療法開発を目標に本研究を開始した。

### 2. 研究の目的

骨肉腫の予後を不良にする転移巣における治療抵抗性分子機構の解明を目指す。独自に樹立した骨肉腫マウスモデルを用いて、以下の事項を本研究の目的とした。

- 1) 化学療法施行に伴う肺転移巣における腫瘍細胞内因性変化、微小環境変化の解明
- 2) 原発巣、転移巣における腫瘍細胞の形質相違点の解明
- 3) 治療に伴う血中循環骨肉腫細胞の評価
- 4) 転移巣に効果を示す新規治療法の開発

### 3. 研究の方法

#### [in vitro の解析]

独自に樹立したマウス骨肉腫細胞 (AXT 細胞) には 10% FBS 含有 IMDM を、ヒト骨肉腫細胞 (Saos2、U2OS、SJS1) には 10% FBS 含有 McCoy 's 5A を用いて培養した。

薬剤、化合物や分子発現変化の細胞生存への影響は、細胞を 96 穴培養皿 (接着と非接着を条件に応じて使用) に 1000 個/100  $\mu$ L の密度で播種し、2 日後に Cell Titer Glo kit (Promega 社) を用いて評価した。遺伝子発現解析は各条件下で培養後細胞から RNA を回収し、網羅的遺伝子発現解析 (microarray) (Toray 社) または、real time RT-PCR 法で行った。タンパク発現解析は、ウェスタンブ

ロット法、フローサイトメトリー法を用いて行った。

#### [in vivo の解析]

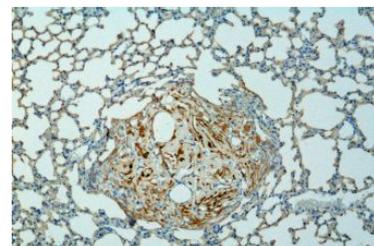
独自に樹立したマウス骨肉腫細胞 (AXT 細胞) を C57BL/6 マウス (8-10 週齢) に皮下 (側腹部) もしくは大腿骨骨髓腔内に移植した。転移巣を主に観察するときは骨髓内移植を施行し、原発巣を定量的に評価 (重量測定) する際は、皮下移植を用いた。腫瘍細胞は約 2-3 週で、原発巣、転移巣を形成する。転移巣を形成したマウスに抗腫瘍薬 (ドキソルビシン/メソトレキサート/イフォスファミド) を経尾静脈注射により投与し治療を行った。simvastatin、calcitriol は腹腔投与し治療効果を検討した。

骨肉腫マウスモデルから採取した原発巣、転移巣は、4%パラホルムアルデヒドで固定後、パラフィン包埋し、切片を作成して免疫染色を行った。RNA、タンパクを回収し、遺伝子発現解析、ウェスタンブロット法によるタンパク発現解析に用いた。治療効果判定のための転移巣の定量化は、片肺から抽出した RNA を用いた GFP 発現の定量や免疫染色によって行った。機能性血管の描出には、蛍光染色標識されたレクチンを尾静脈投与したマウスから腫瘍を摘出し、凍結切片を作成後、免疫染色を行った。血中循環がん細胞の定量化はマウスから採血を行い、全血から RNA を抽出後、GFP の定量 (real time RT-PCR 法) を行うことで評価した。

### 4. 研究成果

独自に樹立した骨肉腫マウスモデルにおいて AXT 細胞を大腿骨内に移植したところ、3 週間で原発巣及び肺転移巣の形成がみられた。骨肉腫の実臨床で使用される抗腫瘍薬のドキソルビシン、メソトレキサート、イフォスファミドを混合し計 2 回尾静注投与した。その結果、未処置群に比較して処置群では有意に大腿部原発巣、肺転移巣の縮小を認められたが、依然として肺転移巣では骨肉腫細胞は多数生存していることが確認された (図 1)。

図 1: 治療後の肺転移巣の残存 (GFP染色)



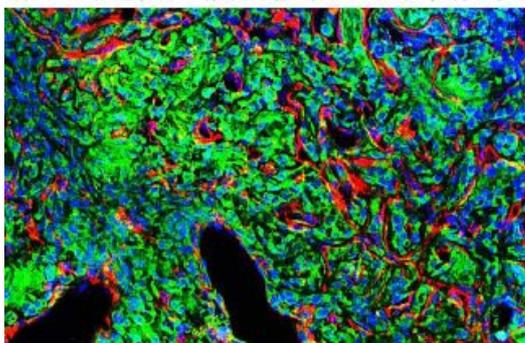
化学療法に抗して肺転移巣において腫瘍細胞生存を支持する機構を解明するため、未治療マウスと治療を施行したマウスからそれぞれ検体を採取し、網羅的遺伝子解析を施行した。転移巣全体におけるプロファイルを得る目的で、RNA はがん細胞、正常細胞を含む肺組織全体 (片肺) から採取した。さらに、正常マウスに対し上記化学療法を施行した群と治療無の群からも検体の採取を行い、解析の対象マウスは、計 4 群 (担がんマウスと正常

マウスに対し上記化学療法の施行ありと無の群)とした。得られた結果からデータの差し引き(担がんマウスの変化 - 正常マウスの変化)を行い、転移巣で特異的に起こる変化の抽出を試みた。その結果、担がんマウスのみで治療あり、無しの間で、2倍以上変化する因子が約2300に絞りこまれた。さらに、化学療法を施行した正常マウスで発現の上昇する因子を除外した結果、治療に伴って転移巣で上昇する候補因子は200程度に絞り込まれた。この遺伝子の中から、血栓の形成に関するFibrinogen、転移への関連が報告されているGpnmbに注目し更なる検討を行うこととした。

Fibrinogenに関しては、レクチン注射により機能血管を描出し観察をおこなったが、治療に伴う大きな血栓の存在は認められなかった(図2)。

図2: 骨肉腫の機能血管

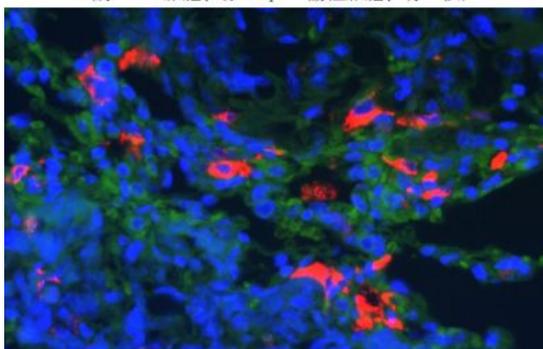
緑: AXT細胞、赤: 機能血管(レクチン)、青: 核



血栓形成の有無と抗凝固療法の併用による治療効果を解析中である。一方、Gpnmbに関しては、発現する細胞の局在を解明するため、免疫染色を施行した結果、Gpnmb陽性細胞は転移巣の周囲に集積していた(図3)。

図3: Gpnmb陽性細胞の集積(治療後肺転移巣)

Gpnmb陽性のマクロファージが腫瘍周辺を中心に集積  
(緑: AXT細胞、赤: Gpnmb陽性細胞、青: 核)

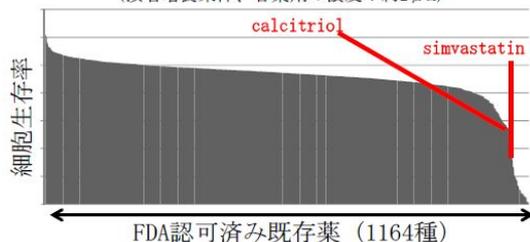


さらに、治療後の肺転移巣から single cell suspensionを準備した後、flow cytometryを施行した結果、マクロファージであることが確認された。m-Csf受容体阻害薬(Ki20227)の投与によりマクロファージの除去を試みたが、研究期間中には十分な除去効果がえられず、引き続き条件を検討し(免疫修飾薬、サイトカインを準備)治療効果を解析している。一方で、肺転移巣の腫瘍細胞に限定して、

既存の化学療法前後における分子変化を明らかにするため、骨肉腫を形成したマウス(未治療マウスと治療施行マウス)から、原発巣と肺転移巣(実体顕微鏡目視下)を採取しRNAを回収した。網羅的遺伝子解析の結果、治療後の転移巣で2倍以上発現が上昇した遺伝子は126個、4倍以上のものは1個に絞られた。原発巣では上昇せず転移巣のみで上昇するものは112個であった。また、転移巣と原発巣で伴って上昇するものは14個認められた。転移巣で特異的に変化する遺伝子変化の意義の解明を進めたが、期間中に完了せず、AXT細胞においてウィルスベクターを用いた過剰発現、ノックダウン、ノックアウト(CRISPR-CAS9使用)を行い、治療抵抗性に関する役割について解析を継続的に進めている。

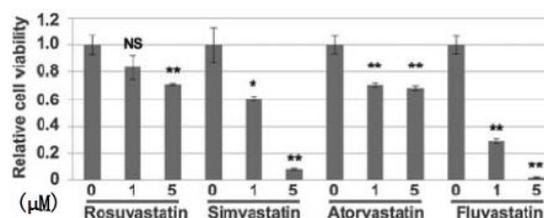
転移巣克服に対する invitro の解析からのアプローチとして、非接着培養を用いた薬剤スクリーニングの結果を応用した。足場非依存性増殖は、転移成立に重要な悪性形質の一つである(Biochim Biophys Acta 1833;3481-98, 2013)。非接着条件下で抗腫瘍効果を示す既存薬剤(約1200種)をスクリーニングした結果、スタチン系薬剤の simvastatin、calcitriol は接着・非接着培養条件の両方で細胞増殖抑制効果を示すことが明らかとなり、更なる解析を施行し、骨肉腫における臨床応用に関し考察した(図4)。

図4: 既存薬を用いた抗骨肉腫効果の検証  
(接着培養条件、各薬剤の濃度: 約2 μM)



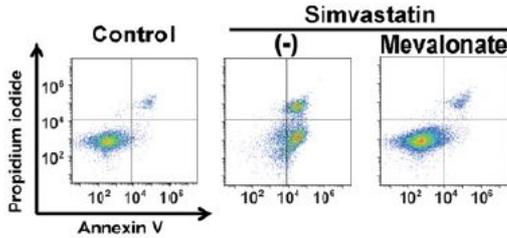
以下に詳細を記載する。また、スクリーニングシステムとしてロボットを用いたハイスループットの解析システムを樹立している。このロボットシステムの概略を海外誌に共同研究として発表した(Nat Biotechnol, 2017)。  
[simvastatinの抗骨肉腫効果]  
スタチン系薬剤4種の骨肉腫AXT細胞に対する細胞増殖抑制効果を検討した結果、simvastatin、fluvastatinは強い効果を示し、rosuvastatin、atorvastatinの効果はそれらより弱かった(図5)。

図5: スタチン系薬剤の増殖抑制効果



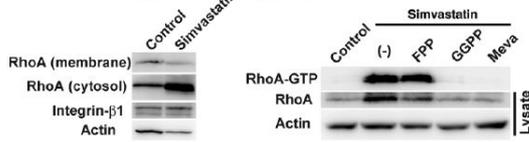
スタチン系薬剤でも抗腫瘍効果が異なることが示唆された。simvastatin は AXT 細胞に apoptosis を誘導し、その効果はメバロン酸合成経路の中間代謝産物である mevalonate の添加で阻害された (図 6)。

図 6 : simvastatinによるapoptosisの誘導



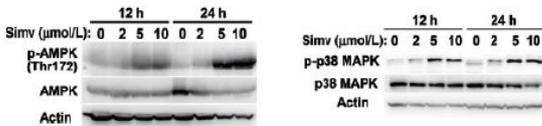
このため simvastatin の抗骨肉腫効果はメバロン酸合成経路阻害によるものであることが明らかとなった。simvastatin 添加は RhoA の局在を膜から細胞質へと変化させ、Rho-GDI との結合を阻害することが明らかとなった。このため、活性化 RhoA (RhoA-GTP) が細胞内に蓄積しても機能が阻害されている可能性が示唆された (図 7)。

図 7 : simvastatinのRhoAに与える影響 (左: 細胞内局在, 右: RhoA-GTPの発現)



さらに、simvastatin は AMPK、p38MAPK を活性化し (図 8)、その活性化阻害により apoptosis 誘導は減少した。さらに、AMPK は p38MAPK の上流に位置づけられることが阻害剤を用いた検討から明らかとなった。

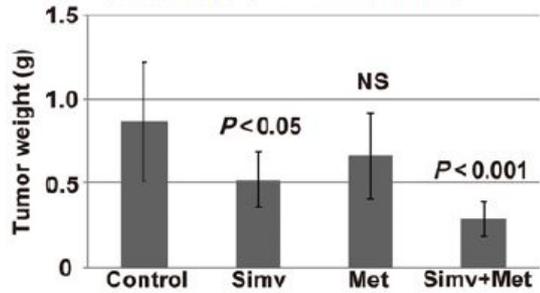
図 8 : simvastatinによるAMPK、p38 MAPKの活性化



また、AMPK を活性化させる metformin の併用は simvastatin の抗骨肉腫活性を増加させた。以上の結果をもとに、AXT 細胞を C57BL/6 マウスに移植し、骨肉腫を形成させた担がんマウスに simvastatin を投与し、in vivo の抗腫瘍効果を検討した。腫瘍は縮小する傾向にあったが、有意な効果は得られなかった。一方、simvastatin は AMPK の活性化を介して、acetyl CoA carboxylase (ACC) をリン酸化し、機能を阻害する可能性が示唆された。ACC は acetyl CoA にカルボキシ基を導入し、de novo の脂肪酸合成を仲介する酵素である。この知見をもとに、マウスに無脂肪食を与え、simvastatin の作用が増強するか検討をおこなった。その結果、simvastatin は単独投与

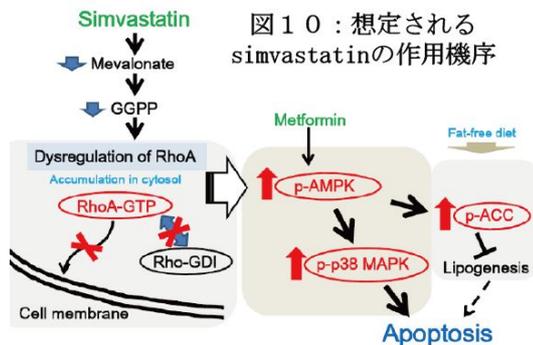
で骨肉腫形成を有意に抑制し、その効果は metformin との併用で増強された (図 9)。

図 9 : simvastatinの抗骨肉腫効果 (原発巣の腫瘍重量を示す) (無脂肪食下、Met: metformin)



原発巣では有意な効果が得られたが、治療群マウスの肺転移巣を調べた結果、転移巣は依然として残存しており、増殖の指標である Ki67 も強陽性であった(データの記載なし)。以上から、simvastatin は (図 10) の経路で骨肉腫に対して抗腫瘍効果を示すが、転移巣に対しては更なる検討が必要であった。これらの simvastatin による抗骨肉腫効果は海外誌に発表した (Mol Cancer Ther, 2017)。

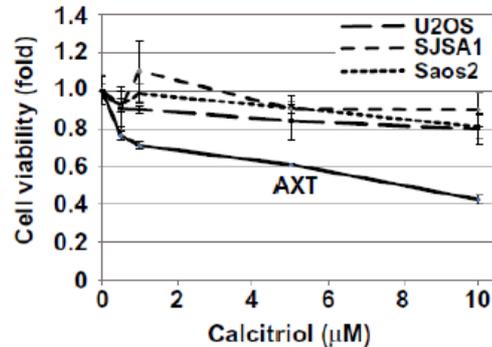
図 10 : 想定される simvastatinの作用機序



[calcitriol の抗骨肉腫効果]

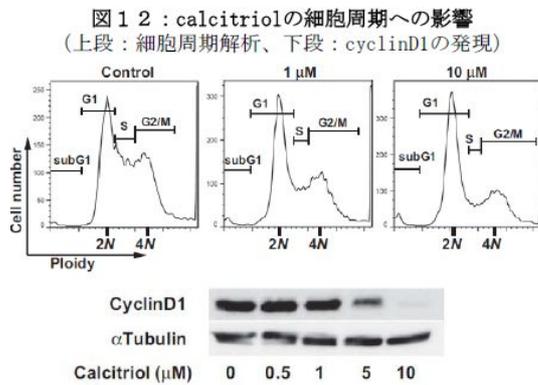
calcitriol は AXT 細胞では容量依存的に増殖を抑制したが、ヒト細胞株における効果は弱かった (図 11)。

図 11 : calcitriolの増殖抑制効果



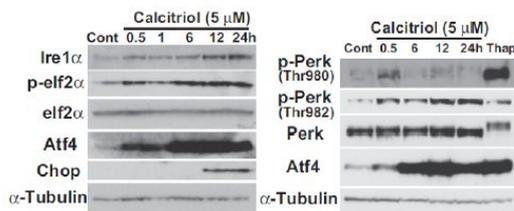
細胞周期解析から、calcitriol 添加により S、G2/M 期は減少することが明らかとなり、

cyclin D1 はタンパクレベルで低下した (図 1 2 )



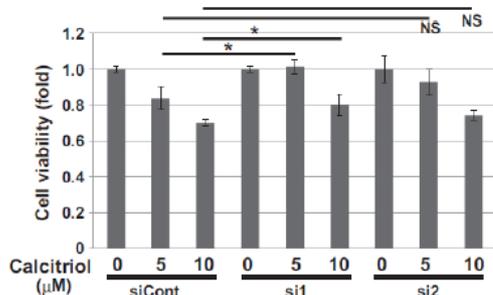
一方で apoptosis の誘導はみられなかった。網羅的遺伝子発現解析の結果から、calcitriolはAXT細胞に小胞体ストレスを誘導する可能性が示唆された。ウェスタンブロット法を用いた解析から、小胞体ストレス反応でみられる分子の活性化が認められた (図 1 3 )

図 1 3 : calcitriolによる小胞体ストレス関連分子の活性化



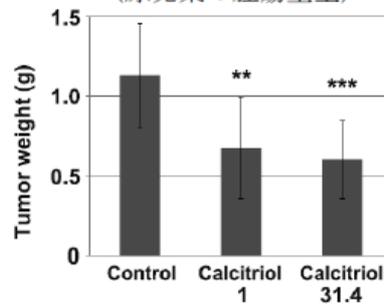
ヒト骨肉腫細胞では、AXT細胞と異なり、小胞体ストレス応答はみられなかった。そして小胞体ストレス応答にかかわる分子であるAtf4、ChopをsiRNAを用いてノックダウンしたところ、calcitriolによる細胞増殖抑制効果は減弱した (図 1 4 )

図 1 4 : Atf4のノックダウンによるcalcitriolの増殖抑制効果の軽減



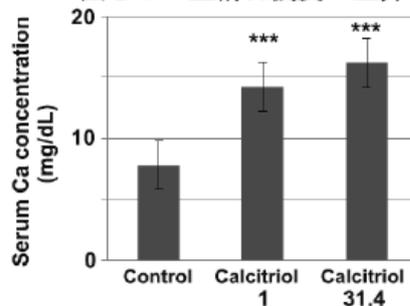
AXT細胞をC57BL/6マウスに移植し、骨肉腫を形成させた担がんマウスにcalcitriolを1mg/kgと31.4mg/kgで投与し、in vivoの抗腫瘍効果を検討したところ、原発巣の腫瘍増殖は抑制された (図 1 5 )

図 1 5 : calcitriolの抗骨肉腫効果  
(原発巣の腫瘍重量)



しかし、血清カルシウム濃度の上昇を認め (図 1 6 ) 臨床応用には副作用の軽減など最適化が必要である可能性が示唆された。さらに、治療後のマウスを解析した結果、血中循環がん細胞、転移巣は依然として残存しており、増殖の指標であるKi67も強陽性であった (データの記載なし)。転移巣の数もcalcitriol投与群、非投与群で差が認められなかった。これらのcalcitriolによる抗骨肉腫効果は英文誌に発表した (Cancer Sci, 2017)。

図 1 6 : 血清Ca濃度の上昇



## 5 . 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文](計 5 件)

Watanabe M, Narita M, Hamada Y, Yamashita A, Tamura H, Ikegami D, Kondo T, Shinzato T, Shimizu T, Fukuchi Y, Muto A, Okano H, Yamanaka A, Tawfik VL, Kuzumaki N, Navratilova E, Porreca F, Narita M. Activation of ventral tegmental area dopaminergic neurons reverses pathological allodynia resulting from nerve injury or bone cancer. *Molecular Pain* 査読有 14: 1-11, 2018

Shimizu T, Kamel WA, Yamaguchi-Iwai S, Fukuchi Y, Muto A, Saya H. Calcitriol exerts an anti-tumor effect in osteosarcoma by inducing the endoplasmic reticulum stress response. *Cancer Science* 査読有 108:1793-1802, 2017

Yachie N, Robotic Biology Consortium

(Shimizu T 含め 49 名), Natsume T. Robotic crowd biology with Maholo LabDroids. Nature Biotechnology 査読有 35:310-312,2017

Kamel WA, Sugihara E, Nobusue H, Yamaguchi-Iwai S, Onishi N, Maki K, Fukuchi Y, Matsuo K, Muto A, Saya H, Shimizu T. Simvastatin-Induced Apoptosis in Osteosarcoma Cells: A Key Role of RhoA-AMPK/p38 MAPK Signaling in Antitumor Activity. Molecular Cancer Therapeutics 査読有 16:182-192,2017

Yamaguchi SI, Ueki A, Sugihara E, Onishi N, Yaguchi T, Kawakami Y, Horiuchi K, Morioka H, Matsumoto M, Nakamura M, Muto A, Toyama Y, Saya H, Shimizu T. Synergistic antiproliferative effect of imatinib and adriamycin in platelet-derived growth factor receptor-expressing osteosarcoma cells. Cancer Science 査読有 106:875-882,2015

〔学会発表〕(計 9 件)

清水孝恒、マウス骨肉腫幹細胞と疾患克服への挑戦、日本薬学会東海支部 特別講演会 2017年1月31日、名古屋

清水孝恒、山口さやか、武藤章弘、佐谷秀行、カルシトリオールは小胞体ストレス反応を誘導することにより骨肉腫に抗腫瘍効果を示す、第76回日本癌学会学術総会、2017年9月28-30日、横浜

杉原英志、橋本典論、大須賀覚、植野さやか、清水孝恒、佐谷秀行、LivinはFas発現回復によるリンパ腫抑制バリアに対する抵抗性を付与する、第76回日本癌学会学術総会、2017年9月28-30日、横浜

槇健太、清水孝恒、福地由美、武藤章弘、Novel therapeutic approach with statins for lethal osteosarcoma、第89回日本薬理学会年会、2016年3月9-11日、横浜

A.W. Kamel, E. Sugihara, S. Yamaguchi, H. Nobusue, K. Maki, A. Muto, H. Saya, T. Shimizu、Statins induce apoptosis in osteosarcoma cells by activation of Ampk and p38 via suppression of mevalonate pathway、American Association for Cancer Research Annual Meeting 2016、2016年4月16日~20日、New Orleans, USA

カメルワリード、杉原英志、山口さやか、信末博行、大西伸幸、武藤章弘、佐谷秀行、清水孝恒、スタチン系薬剤はメバロン酸合成経路を阻害し、AMPK、p38MAPKの活性化を介して骨肉腫に抗腫瘍効果を発揮する、第75回日本癌学会学術総会、2016年10月6-8日、横浜

信末博行、大西伸幸、清水孝恒、杉原英志、沖嘉尚、千代田達幸、高橋信博、赤司浩一、加野浩一郎、佐谷秀行、アクチン細胞骨格動態に基づく脂肪分化制御による骨肉腫幹細胞

の治療戦略、第74回日本癌学会学術総会、2015年10月8-10日、名古屋

山口さやか、杉原英志、大西伸幸、菊田一貴、堀内圭輔、森岡秀夫、佐谷秀行、清水孝恒、イマチニブとアドリアマイシンの併用はPDGFRを発現する骨肉腫に対し相乗的な抗腫瘍効果を呈する、第74回日本癌学会学術総会、2015年10月8-10日、名古屋

杉原英志、橋本典論、植野さやか、清水孝恒、佐谷秀行、新規B細胞リンパ腫モデルを用いたリンパ腫発症及び維持におけるFasの抑制制御、第74回日本癌学会学術総会、2015年10月8-10日、名古屋

〔図書〕(計1件)

成田年、加藤良規、清水孝恒、鳥越一宏、分子病態薬理学、京都廣川書店、2017、326

〔産業財産権〕

出願状況(計0件)

取得状況(計0件)

〔その他〕

ホームページ等

清水孝恒 - 研究者 - researchmap

<https://researchmap.jp/shimizutakatsune/>

清水孝恒 - 慶應義塾大学 医学部 先端医科学研究所

<http://www.genereg.jp/html2/html/staff/NIInst/Shimizu/>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

清水孝恒 (SHIMIZU, Takatsune)

星薬科大学・薬学部・准教授

研究者番号：40407101

(2) 研究分担者

なし

(3) 連携研究者

なし

(4) 研究協力者

佐谷 秀行教授 (SAYA, Hideyuki)

慶應義塾大学・医学部・先端医科学研究所・遺伝子制御研究部門・教授

曾我 朋義教授 (SOGA, Tomoyoshi)

慶應義塾大学・先端生命科学研究所・教授