

平成 30 年 6 月 19 日現在

機関番号：17701

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2015～2017

課題番号：15K10452

研究課題名(和文) 骨軟部腫瘍の細胞外マトリックス制御による抗腫瘍薬デリバリー改善の手法開発

研究課題名(英文) New approach to improve delivery of anticancer drugs by modulating extracellular matrix in musculoskeletal tumors

研究代表者

永野 聡 (NAGANO, Satoshi)

鹿児島大学・医歯学域医学系・准教授

研究者番号：50373139

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,700,000円

研究成果の概要(和文)：骨軟部腫瘍における新たな治療戦略として、腫瘍内細胞外マトリックスを減少させる薬剤の探索を当初の目的として、骨軟部腫瘍のアンジオテンシン経路を解析した。しかし種々の肉腫細胞でアンジオテンシン経路阻害薬は細胞増殖および細胞外マトリックスに関連する分子は増強/減弱等一定の効果を認めなかった。そこで抗アレルギー薬トラニラストに着目した。トラニラストは濃度依存性に骨肉腫細胞の増殖を抑制した。トラニラストは抗癌剤との併用で相乗的に骨肉腫の増殖を抑制した。動物実験でも抗癌剤との併用で骨肉腫の腫瘍増殖を抑制した。トラニラストはすでに臨床で多くの患者において使用され安全性も高く、がん治療への応用が期待できる。

研究成果の概要(英文)：To explore a new treatment for musculoskeletal tumor (MST), we focused on drugs that reduces extracellular matrix (ECM). However, we found no significant role of angiotensin pathway drugs in ECM of MST. Therefore we next focused on anti-allergic drug tranilast, which is known to modulate ECM production by fibroblast. Tranilast inhibited proliferation of osteosarcoma cells in a dose-dependent manner. Combined treatment with tranilast and anti-cancer agents enhanced the cytotoxic effect on osteosarcoma cells. Tranilast enhanced the effect of cisplatin on growth of osteosarcoma xenograft in mice. Because tranilast has been used in clinics without severe side effects for many patients, clinical application in cancer therapy is expected.

研究分野：骨軟部腫瘍学、遺伝子治療学

キーワード：骨軟部腫瘍 細胞外マトリックス アンジオテンシン経路 Tranilast 細胞周期

#### 1. 研究開始当初の背景

骨肉腫や軟骨肉腫などの悪性骨腫瘍では I, II 型コラーゲン、軟部肉腫ではヒアルロン酸、ファイブロネクチンやラミニンなど種々の細胞外マトリックスに富んでおり、腫瘍の進展に関わる一方、治療への障壁ともなっている。多くの骨軟部腫瘍は、in vitro ではアドリアマイシンなどの主な化学療法薬に対して感受性を示すにも関わらず、in vivo では 100% の腫瘍壊死を来たすほどの高い抗腫瘍効果を示すことは少ない。その理由として、全身投与された抗癌剤が腫瘍内に行きわたっていないことが挙げられる。

腫瘍間質の線維芽細胞 (Cancer-associated fibroblast; CAF) は腫瘍内細胞外マトリックスの産生・維持に重要な役割を果たす。世界的にも最新の研究で細胞外マトリックスを制御することで抗癌剤の効率的デリバリーが可能であることが明らかにされ、一方我々も細胞外マトリックス並びに抗腫瘍薬のデリバリーの研究を行ってきた。骨軟部腫瘍における新たな治療戦略として、腫瘍内細胞外マトリックスを減少させる薬剤と、抗癌剤とのコンビネーションが有効であると期待される。

#### 2. 研究の目的

細胞外マトリックスに変化を誘導して抗癌剤の効果を高めることが報告されている薬剤 (Angiotensin receptor blocker, ARB) について、骨軟部腫瘍への効果を解析する。また、これらの結果を基にして骨軟部腫瘍への新しい治療法の開発を目指す。

#### 3. 研究の方法

(1) 骨軟部腫瘍に対する Angiotensin 経路の解析

Angiotensin 経路の分子 AGTR (Angiotensin receptor) -1 および Thrombospondin (TSP) -1 の発現を SW982 (滑膜肉腫) SW1353 (軟骨肉腫) HT1080 (線維肉腫) HOS-MNNG (骨肉腫) 細胞株で評価。また Angiotensin-II 刺激及び AGTR-1 のノックダウンによる TSP-1 レベルの変化を RT-PCR 及び Western blotting にて評価

(2) 骨軟部腫瘍に対する ARB の効果および抗癌剤との併用効果の解析

ARB の一つ Losartan を骨軟部腫瘍細胞に処理し、TSP-1、細胞外マトリックス関連分子 (Collagen I, PAI-1, TGF- $\beta$ ) の発現を RT-PCR にて解析

Losartan 単独及び抗癌剤との併用による骨軟部腫瘍細胞の増殖抑制効果を WST-1 assay にて解析

(3) 細胞外マトリックス分子に影響を与える薬剤、Tranilast の骨肉腫への効果解析

Angiotensin 経路が骨軟部腫瘍の細胞外マトリックス及び抗腫瘍効果に有意な影響を与えていなかったことから、別の薬剤として Tranilast を選択した。Tranilast の骨肉腫細胞における細胞外マトリックス分子の発現への影響を RT-PCR 及び Western blotting

で解析

(4) Tranilast の骨肉腫への抗腫瘍効果および抗癌剤との併用効果解析

Tranilast の骨肉腫細胞への増殖抑制効果を WST-1 アッセイにて解析。また抗癌剤 (Cisplatin, Doxorubicin) と Tranilast の併用により抗腫瘍効果の増強が得られるかを解析し、Combination index を評価。

Tranilast の抗癌剤増感作用および副作用を評価するために 143B 骨肉腫移植モデルマウスにおいて、Cisplatin と Tranilast 単独および併用治療群を解析

(5) Tranilast の抗腫瘍効果および抗癌剤増感作用のメカニズム解析

Tranilast の抗腫瘍効果のメカニズムを細胞周期の解析およびアポトーシスアッセイ (Annexin V 染色) により解析

#### 4. 研究成果

(1) 骨軟部腫瘍における Angiotensin 経路の解析

SW982, SW1353, HT1080, HOS-MNNG において、AGTR-1 および TSP-1 の発現を mRNA および蛋白レベルで認めた。Angiotensin-II 刺激により HOS-MNNG では TSP-1 レベルの上昇を認めたが他の細胞では有意な上昇は認められなかった。siAGTR-1 により AGTR mRNA レベルはノックダウンされたが、TSP-1 レベルは有意な抑制を認めなかった。

(2) 骨軟部腫瘍に対する ARB の効果および抗癌剤との併用効果

Losartan を種々の濃度で骨軟部腫瘍細胞に処理後、細胞増殖には有意な影響を与えなかった。Collagen I, PAI-1, TGF- $\beta$  などの細胞外マトリックスおよびその産生に関連する分子は増強/減弱等一定の効果を認めなかった。

(3) 抗アレルギー薬 Tranilast の骨肉腫細胞株への効果

骨肉腫細胞への Tranilast 処理は Collagen I, TGF- $\beta$  等の発現レベルに影響を与えなかった。骨肉腫細胞 (HOS, 143B, U2OS) に対して Tranilast は濃度依存性に細胞増殖抑制を認め、IC50 はそれぞれ 130.4, 329.0, 252.4  $\mu$ M であった。骨肉腫細胞 (HOS, 143B, U2OS) において Tranilast は Cisplatin および Doxorubicin の細胞増殖抑制効果を増強した。Tranilast と抗癌剤の併用における、Combination Index (CI) を CalcuSyn software を用いて解析。骨肉腫細胞株 (HOS, 143B, U2OS) において CI ED75 は HOS が 0.5, 143B が 0.37, U2OS が 0.36 であり、相乗的に細胞増殖を抑制することを明らかにした。骨肉腫細胞株 143B をヌードマウスへ移植、対象群、Tranilast 群、Cisplatin 投与群、併用群と比較すると、腫瘍サイズにおいて対照群 vs Tranilast 群、Cisplatin 群では有意差は認めなかったが、Control 群と併用群のみ統計学的に有意に増殖抑制効果を認めた。

(5) Tranilast の抗腫瘍効果および抗癌剤増感作用のメカニズム

骨肉腫細胞(HOS、143B、U2OS)にコントロール、Cisplatin 2 $\mu$ M 単独、Tranilast 200 $\mu$ M 単独、併用でそれぞれ処理、48 時間後に、flow cytometry にて解析。Tranilast 単独では G2/M 期の増加は認めなかった。しかし Tranilast は HOS で 39.9% から 64.0%、143B で 52.5% から 75.5%、U2OS で 71.1% から 86.0% と G2/M 期の増加を認めた。また、Annexin V 染色による解析でも、早期アポトーシスと晩期アポトーシス細胞は Cisplatin 単独群よりも併用群において多く認めた。

以上の結果より、当初目的とした細胞外マトリックスを制御した治療法の開発には至らなかったが、Tranilast というすでに臨床で使用されている薬剤が骨肉腫の化学療法の効果を増強することを明らかにした。副作用も少ないこの薬剤は臨床応用が期待される。

#### 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 8 件)すべて査読あり

1) Sasaki H, Nagano S, Shimada H, Nakamura S, Setoguchi T, Komiya S.

Clinical course of the bony lesion of single-system single-site Langerhans cell histiocytosis - Is appropriate follow-up sufficient treatment?

*J Orthop Sci.* 2018 Jan;23(1):168-173.

doi: 10.1016/j.jos.2017.08.018.

2) Tominaga H, Setoguchi T, Shimada H, Nagano S, Sasaki H, Ishidou Y, Sato M, Mizuno K, Inoue H, Komiya S.

Prognostic factors in patients with skeletal-related events at non-small-cell lung cancer diagnosis.

*Mol Clin Oncol.* 2017 Nov;7(5):897-902.

doi: 10.3892/mco.2017.1394.

3) Shinohara N, Maeda S, Yahiro Y, Sakuma D, Matsuyama K, Imamura K, Kawamura I, Setoguchi T, Ishidou Y, Nagano S, Komiya S.

TGF- $\beta$  signalling and PEG10 are mutually exclusive and inhibitory in chondrosarcoma cells.

*Sci Rep.* 2017 Oct 18;7(1):13494.

doi: 10.1038/s41598-017-13994-w.

4) Sasaki H, Nagano S, Shimada H, Yokouchi M, Setoguchi T, Ishidou Y, Kunigou O, Maehara K, Komiya S.

Diagnosing and discriminating between primary and secondary aneurysmal bone

cysts.

*Oncol Lett.* 2017 Apr;13(4):2290-2296.

doi: 10.3892/ol.2017.5682.

5) Takahashi K, Setoguchi T, Tsuru A, Saitoh Y, Nagano S, Ishidou Y, Maeda S, Furukawa T, Komiya S.

Inhibition of casein kinase 2 prevents growth of human osteosarcoma.

*Oncol Rep.* 2017 Feb;37(2):1141-1147.

doi: 10.3892/or.2016.5310.

6) Nagano S, Nakamura S, Shimada H, Yokouchi M, Setoguchi T, Ishidou Y, Sasaki H, Komiya S.

Computer-assisted quantitative evaluation of bisphosphonate treatment for Paget's disease of bone using the bone scan index.

*Exp Ther Med.* 2016 Dec;12(6):3830-3836.

doi: 10.3892/etm.2016.3899.

7) Shimada H, Otero M, Tsuchimochi K, Yamasaki S, Sakakima H, Matsuda F, Sakasegawa M, Setoguchi T, Xu L, Goldring MB, Tanimoto A, Komiya S, Ijiri K.

CCAAT/enhancer binding protein (C/EBP $\beta$ ) regulates the transcription of growth arrest and DNA damage-inducible protein 45 (GADD45) in articular chondrocytes.

*Pathol Res Pract.* 2016 Apr;212(4):302-9.

doi: 10.1016/j.prp.2016.01.009.

8) Saitoh Y, Setoguchi T, Nagata M, Tsuru A, Nakamura S, Nagano S, Ishidou Y, Nagao-Kitamoto H, Yokouchi M, Maeda S, Tanimoto A, Furukawa T, Komiya S.

Combination of Hedgehog inhibitors and standard anticancer agents synergistically prevent osteosarcoma growth.

*Int J Oncol.* 2016 Jan;48(1):235-42.

doi: 10.3892/ijo.2015.3236.

[学会発表](計 9 件)

1) 中島 隆之, 永野 聡, 齋藤 嘉信, 瀬戸口 啓夫, 前田真吾, 佐々木裕美, 小宮 節郎

抗アレルギー薬 tranilast は骨肉腫細胞株の細胞増殖を抑制し抗癌剤の効果を増強する  
第 34 回日本ヒト細胞学会学術集会 (2017)

2) 篠原 直弘, 前田 真吾, 永野 聡, 瀬戸口 啓夫, 石堂 康弘, 小宮 節郎

TGF- $\beta$  により活性化される SMAD と PEG10 は互いに抑制しあい二層性の役割を持つ

第 76 回日本癌学会総会 (2017)

3) 齋藤 嘉信, 瀬戸口 啓夫, 中島 隆之, 永野 聡, 小宮 節郎

HDAC 阻害剤である LBH589 は FOSL1 の down regulation を介して未分化多型肉腫細胞の増殖を抑制する(英語)

第 76 回日本癌学会総会記事(2017)

4) 篠原 直弘, 前田 真吾, 八尋 雄平, 河村 一郎, 永野 聡, 石堂 康弘, 小宮 節郎

PEG10 と TGF- $\beta$  シグナルの軟骨肉腫表現型における役割

第 90 回日本整形外科学会学術総会(2017)

5) 佐々木 裕美, 永野 聡, 瀬戸口 啓夫, 中島 隆之, 天辰 愛弓, 藤元 祐介, 小宮 節郎

当科における悪性軟部腫瘍再発転移症例の治療経過と予後因子の解析

第 50 回日本整形外科学会 骨・軟部腫瘍学術集会(2017)

6) 齋藤 嘉信, 瀬戸口 啓夫, 高橋 建吾, 小宮 節郎

pan-HDAC 阻害剤である panobinostat の undifferentiated pleomorphic sarcoma(UPS)に対する抗腫瘍効果の検討

第 75 回日本癌学会総会記事(2016)

7) 篠原 直弘, 前田 真吾, 永野 聡, 瀬戸口 啓夫, 石堂 康弘, 小宮 節郎

TGF- $\beta$  シグナルと PEG10 は軟骨肉腫において相反する発現パターンと細胞浸潤能への役割を呈する

第 75 回日本癌学会総会記事(2016)

8) 永野 聡, 佐々木 裕美, 瀬戸口 啓夫, 天辰 愛弓, 堀之内 駿, 小宮 節郎

当科における悪性軟部腫瘍再発転移症例の検討

第 132 回西日本整形・災害外科学術集会(2016)

9) 齋藤 嘉信, 瀬戸口 啓夫, 永田 政仁, 永野 聡, 小宮 節郎

Hedgehog pathway 阻害剤である三酸化ヒ素と vismodegib は骨肉腫細胞増殖を相乗的に抑制する

第 38 回日本分子生物学会(2015)

〔図書〕(計 0 件)

〔産業財産権〕

出願状況(計 0 件)

名称：  
発明者：  
権利者：  
種類：  
番号：

出願年月日：

国内外の別：

取得状況(計 0 件)

名称：  
発明者：  
権利者：  
種類：  
番号：  
取得年月日：  
国内外の別：

〔その他〕  
ホームページ等  
<http://www.orthop-kagoshima-u.com/>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

永野 聡 (NAGANO SATOSHI)  
鹿児島大学・医歯学域医学系・准教授  
研究者番号：50373139

(2) 研究分担者

小宮 節郎 (KOMIYA SETSURO)  
鹿児島大学・医歯学域医学系・教授  
研究者番号：30178371

瀬戸口 啓夫 (SETOGUCHI TAKAO)  
鹿児島大学・医歯学総合研究科・特任准教授  
研究者番号：40423727

研究者番号：

(3) 連携研究者

( )

研究者番号：

(4) 研究協力者

( )