

平成 30 年 5 月 11 日現在

機関番号：13901

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2015～2017

課題番号：15K19992

研究課題名(和文) 悪性末梢神経鞘腫瘍の新規予後予測因子および治療法の開発：ヒアルロン酸を標的として

研究課題名(英文) Antitumor effects of 4-Methylumbelliferone, a hyaluronan synthesis inhibitor, on malignant peripheral nerve sheath tumor

研究代表者

生田 国大 (Ikuta, Kunihiro)

名古屋大学・医学部附属病院・医員

研究者番号：40732657

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,000,000円

研究成果の概要(和文)：本研究の目的は、MPNSTに対するヒアルロン酸(HA)合成阻害剤 4-Methylumbelliferone (MU) の抗腫瘍効果を検討する事である。ヒトMPNST細胞株において、MUにより細胞周囲HA染色性とマトリックス形成は低下し、細胞増殖能、移動能、浸潤能は有意に抑制された。MU投与により細胞株におけるHAS2とHAS3mRNA発現は抑制され、細胞周囲、細胞内のHA濃度は有意に低下した。アポトーシス活性では有意な上昇を認めた。腫瘍皮下移植マウスモデルでは、6週間のMU投与により腫瘍体積が有意に減少した。本研究により、細胞周囲微小環境のHAを標的とした治療は新規治療法となる可能性がある。

研究成果の概要(英文)：Hyaluronan (HA) has been shown to play important roles in the growth, invasion, and metastasis of malignant tumors. Our previous study showing that high HA expression in malignant peripheral nerve sheath tumors (MPNST) is predictive of poor patient prognosis. The aim of this study was to investigate the antitumor effects of 4-Methylumbelliferone (MU), an HA synthesis inhibitor, on human MPNST cells and tissues. MU significantly inhibited cell proliferation, migration, and invasion in both MPNST cell lines. HABP staining, particle exclusion assay, and quantification of HA revealed that MU significantly decreased HA accumulation in the cytoplasm and pericellular matrices in both MPNST cell lines. MU administration significantly inhibited the tumor growth in the mouse xenograft model. Our results suggest that MU may be a promising agent with novel antitumor mechanisms for MPNST.

研究分野：骨軟部腫瘍

キーワード：MPNST ヒアルロン酸

1. 研究開始当初の背景

(1) 神経線維腫症 1 型 (NF1) は有病率の非常に高い遺伝性疾患であり、本邦の患者数は約 4 万人とされる。神経線維腫の悪性転化により生じる悪性末梢鞘腫瘍 (MPNST) は NF1 患者の主な死因であり、化学療法や通常の放射線治療に抵抗性であり、広範に切除しても高率に局所再発や遠隔転移をきたし予後不良である。予後改善のためには従来の後療法とは概念の異なる新規治療法の開発が必要である。

(2) ヒアルロン酸は悪性腫瘍自体の進展および転移のみならず悪性腫瘍周囲の間質細胞でも腫瘍浸潤に有利な環境を提供する役割を担っている¹⁾。ヒアルロン酸の発現量が乳癌、前立腺癌、大腸癌などの数多くの癌腫において悪性度や予後と強く相関することが報告されている¹⁻³⁾。また基礎実験において、ヒアルロン酸が腫瘍細胞の増殖能、移動能、浸潤能や転移形成能に強く関与している事が多くの研究で既に実証されている^{4,5)}。

2. 研究の目的

本研究の目的は、MPNST におけるヒアルロン酸の役割を調査し、ヒアルロン酸合成阻害薬である 4-Methylumbelliferone (MU) を用いたヒアルロン酸制御が MPNST における腫瘍原性に及ぼす効果を評価することで、従来の治療法とは異なるヒアルロン酸をターゲットとした新規治療法を開発することである。

3. 研究の方法

(1) In vitro 実験

神経線維腫症 1 型患者由来の MPNST 細胞株である sNF96.2 と sNF02.2 細胞を用いた。MU による HA 合成抑制はビオチン化 HA 結合タンパク (HABP) を用いて染色を行い可視化し、HA が重要な役割をはたす細胞周囲マトリックス形成について、カルセイン蛍光染色を併用

した Particle exclusion assay により評価した。細胞周囲、細胞内 HA 濃度を HA binding assay により定量し、細胞増殖能、移動能、浸潤能をそれぞれ Proliferation assay、Motility assay、Invasion assay で評価。アポトーシス活性は AnnexinV を用いたフローサイトメトリーで評価した。HA 合成酵素 (HAS1-3)、ヒアルロン酸受容体 CD44 の mRNA 発現についてリアルタイム RT-PCR 法を行い評価した。MU の溶媒である 0.1% DMSO 存在下で培養、実験を行った細胞をコントロールとした。

(2) MPNST 腫瘍モデルの作製 (in vivo)

4-MU により腫瘍の進展、転移が抑制できるかを調べるため、6 週齢メス BALB/c athymic マウス背部にヒト MPNST 細胞株 (sNF96.2) を皮下注射し、マウス皮下腫瘍モデルを作製した。MU 投与群、コントロール群 (vehicle 群) に分け、腫瘍サイズが 100mm³ に達した時点から MU 投与群に対して MU (10mg) を 1 日 1 回 6 週間腹腔内投与した。

4. 研究成果

(1) HABP 細胞染色

MPNST 細胞株 (sNF96.2、sNF02.2) において、細胞および細胞周囲の HABP 染色性は 1.0mM MU 投与 24 時間後にコントロールと比べ低下した。特に sNF02.2 細胞では MU 投与により filopodia 様突起が減少し、形態変化していた。

(2) Particle exclusion assay

MPNST 細胞株 (sNF96.2、sNF02.2) において、コントロールでは豊富な細胞外マトリックスを認め、1.0mM MU 投与により 48 時間後に細胞外マトリックス形成は有意に低下した (P = 0.001、P = 0.002)。

(3) 細胞周囲ヒアルロン酸の定量

MPNST 細胞株 (sNF96.2、sNF02.2) において、1.0mM MU 投与により細胞内および細胞周囲ヒアルロン酸は投与 12、24 時間後にそれぞれ有意な低下を認めた。

(4) 細胞増殖能

0.1mM および 1.0mM MU 投与 24 時間後より、MPNST 細胞株 (sNF96.2、sNF02.2) の増殖能は濃度、時間依存性に有意に抑制された (sNF96.2, 0.1mM; $P < 0.001$ 、1.0mM; $P < 0.001$, sNF02.2)。外因性ヒアルロン酸を添加しても、MU による細胞増殖阻害はキャンセルされなかった。

(5) 細胞移動能、浸潤能

1.0mM MU 投与 24 時間後より、MPNST 細胞株 (sNF96.2、sNF02.2) の移動能 ($P < 0.001$, $P < 0.001$)、浸潤能 ($P < 0.001$, $P < 0.001$) は有意に抑制された。これら MU による細胞移動能、浸潤能阻害作用は外因性ヒアルロン酸を添加しても、キャンセルされなかった。

(6) アポトーシス活性

MU の MPNST 細胞株 (sNF96.2、sNF02.2) に与えるアポトーシス活性について Annexin V を用いたフローサイトメトリーにより評価した。1.0mM MU 投与 48 時間後に sNF96.2 細胞ではアポトーシスが有意に上昇した ($P < 0.001$)。一方、sNF02.2 細胞では、アポトーシスの有意な増加を認めず、細胞株間での MU によるアポトーシス活性に違いを認めた。Tunnel 染色によるアポトーシス評価では、sNF02.2 細胞のアポトーシスは 1.0mM MU 投与 48 時間後までは有意な増加を示さず、72 時間後から有意に増加していた。

(7) リアルタイム RT-PCR

MPNST 細胞株 (sNF96.2、sNF02.2) において、ともに HAS1mRNA 発現を認めなかった。HAS2mRNA 発現は 1.0mM MU 投与 12 時間後に s

NF96.2、sNF02.2 細胞でそれぞれ有意に低下した ($P < 0.001$, $P = 0.009$)。HAS3mRNA 発現は sNF96.2 細胞において 0.1mM および 1.0mM MU 投与により 12 時間後に有意に抑制されたが ($P < 0.001$, $P < 0.001$) sNF02.2 細胞では 1.0mM MU 投与 12 時間後に統計学的に有意な減少を認めなかった。

(8) siRNA による CD44 のノックダウン

ヒアルロン酸受容体である CD44 が MU の抗腫瘍効果に影響しているかを調査した。MPNST 細胞株 (sNF96.2、sNF02.2) において、CD44 をノックダウンするとそれぞれの移動能、浸潤能は阻害された。

(9) 異種移植マウスモデル

sNF96.2 細胞による xenograft model を作製した。sNF02.2 細胞による腫瘍形成はみられなかった。sNF96.2 腫瘍異種移植モデルにおいて、6 週間の MU 腹腔内注射によりコントロール群と比較して腫瘍体積、重量ともに有意に抑制された ($P = 0.007$, $P = 0.047$)。6 週でサクリファイスした腫瘍組織の免疫染色では、MU 投与群において HABP 染色性が低下し、Ki67 陽性率がコントロール群と比べ有意に低下していた ($P = 0.002$)。MU 投与によるマウス体重の有意な減少は見られなかった。

< 引用文献 >

- Toole BP.
Hyaluronan: from extracellular glue to pericellular cue.
Nature reviews Cancer.
2004 Jul;4(7):528-39.
- Auvinen P, Tammi R, Parkkinen J, et al.
Hyaluronan in peritumoral stroma and malignant cells associates with breast cancer spreading and predicts survival.
Am J Pathol. 2000 Feb;156(2):529-36.

生田 国大, 浦川 浩, 西田 佳弘, 他
細胞および細胞周囲ヒアルロン酸発現は悪性
末梢神経鞘腫瘍の予後と関連する
日本レックリングハウゼン病学会雑誌
3 巻 1 号 Page69-72(2012.10)

Futamura N, Urakawa H, Arai E, et al.
Hyaluronan synthesis inhibitor
supplements the inhibitory effects of
zoledronic acid on bone metastasis of lung
cancer.
Clin Exp Metastasis.
2013 Jun;30(5):595-606.

Arai E, Nishida Y, Urakawa H, et al.
Inhibition of hyaluronan retention by
4-methylumbelliferone suppresses
osteosarcoma cells in vitro and lung
metastasis in vivo.
Br J Cancer.
2011 Dec 6;105(12):1839-49.

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1件)

Antitumor effects of
4-methylumbelliferone, a hyaluronan
synthesis inhibitor, on malignant
peripheral nerve sheath tumor.
Ikuta K, Ota T, Zhuo L, Urakawa H, Kozawa
E, Hamada S, Kimata K, Ishiguro N, Nishida
Y.
Int J Cancer. 2017 Jan 15;140(2):469-479.
doi: 10.1002/ijc.30460. 査読有

[学会発表](計6件)

第9回日本レックリングハウゼン病学会学
術大会 2018.2.25 東京

生田 国大, 西田 佳弘, 筑紫 聡, 浦川 浩,
新井 英介, 濱田 俊介, 大田 剛広, 石黒
直樹
前医切除後に受信した悪性末梢神経鞘腫瘍
の臨床的特徴

22nd Annual Meeting Connective Tissue
Oncology Society,
Maui, (Hawaii) 2017.11.8-12

Ikuta K, Nishida Y, Urakawa H, Arai E,
Hamada S, Ishiguro N, Tsukushi S.
Clinical outcomes of surgical treatment in
patients with malignant peripheral nerve
sheath tumors.

11th International Conference on
Hyaluronan, Cleveland (USA) 2017.6.11-15
Higuchi Y, Nishida Y, Zhuo L, Kozawa E,
Arai E, Hamada S, Morita D, Ikuta K, Kimata
K, Ushida T, Ishiguro N.
Inhibition of hyaluronidase 2 in articular
cartilage stimulates osteoarthritic
progression In a mice model.

第90回日本整形外科学会学術総会
2017.5.18-21(Day2) 仙台

生田 国大, 西田 佳弘, 浦川 浩, 筑紫 聡,
新井 英介, 濱田 俊介, 石黒 直樹
悪性末梢神経鞘腫瘍患者の手術成績(ポスタ
ー)

The 2016 NF Conference, Austin (USA)
2016.6.18-21(Day2)

Ikuta K, Urakawa H, Kozawa E, Hamada S,
Ishiguro N, Nishida Y.
Antitumor Effects of 4-Methylumbelliferone,
a Hyaluronan Synthesis Inhibitor, on
Malignant Peripheral Nerve Sheath Tumor.

第48回日本整形外科学会骨・軟部腫瘍学

術集会 2015.7.9-10(Day1) 高松
生田 国大, 浦川 浩, 小澤 英史, 濱田 俊
介, 大田 剛広, 石黒 直樹, 西田 佳弘
悪性末梢神経鞘腫瘍に対するヒアルロン酸
合成阻害剤による抗腫瘍効果の検討

〔図書〕(計0件)

〔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

なし

6. 研究組織

(1) 研究代表者

生田 国大 (IKUTA, Kunihiro)

名古屋大学・医学部附属病院・医員

研究者番号: 40732657

(2) 研究分担者

なし

(3) 連携研究者

なし

(4) 研究協力者

なし