

令和元年6月20日現在

機関番号：17601

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2016～2018

課題番号：16K19656

研究課題名(和文) ユーイング肉腫に対する新規チロシンキナーゼ阻害薬の有効性評価

研究課題名(英文) Effectiveness of a novel tyrosin kinase inhibitor in Ewing sarcoma

研究代表者

澤 大介 (Sawa, Daisuke)

宮崎大学・医学部・助教

研究者番号：10632721

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)：ユーイング肉腫(EWS)において focal adhesion kinase (FAK) は高発現している。PF-562,271 (FAKと Pyk2の二重阻害剤)と比較して、TAE226(FAKとIGF-1Rの二重阻害剤)は3つの細胞株の増殖を強く阻害した。また、EWS細胞株をTAE226処置することにより細胞周期停止、アポトーシス、AKT脱リン酸化抑制を誘導し、細胞浸潤も阻害した。また、マウスモデルを使用しTAE226がEWSの原発腫瘍の局所成長と転移を著しく阻害することを明らかにした。さらに、TAE226と従来の化学療法の組合せは、相乗効果を及ぼすことを明らかにした。

研究成果の学術的意義や社会的意義

再発および転移性ユーイング肉腫の予後は、非常に不良である。

従って、腫瘍特異性のターゲットを特定し治療を行うことは、予後を改善させるために重要である。今回、評価をおこなったTAE226は、単剤あるいは既存の化学療法薬との併用により再発/転移性ユーイング肉腫の予後を改善させる可能性がある。

研究成果の概要(英文)：High focal adhesion kinase (FAK) transcript expression levels in EWS cell lines are known. TAE226 is a dual inhibitor of FAK and insulin-like growth factor-1 receptor (IGF-1R), while PF-562,271 is a dual inhibitor of FAK and proline-rich tyrosine kinase 2. We compared the cytotoxicity of TAE226 and PF-562,271 toward three EWS cell lines. Furthermore, we investigated the efficacy of TAE226 as well as its mechanism of action against EWS. TAE226 strongly inhibited proliferation of three cell lines when compared with PF-562,271. TAE226 strongly inhibited proliferation of three cell lines when compared with PF-562,271. TAE226 treatment of EWS cell lines induced cell cycle arrest, apoptosis, AKT dephosphorylation, and inhibition of invasion. We demonstrated that TAE226 drastically inhibits the local growth of primary tumors and metastasis in EWS using mouse models. Furthermore, the combination of TAE226 and conventional chemotherapy proved to exert synergistic effects.

研究分野：血液腫瘍学、小児科学

キーワード：ユーイング肉腫 TAE226 FAK IGF1R 細胞内シグナル

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19、CK - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

(1) 骨原発悪性腫瘍は小児ならびに若年成人がんの約 5%を占め、ユーイング肉腫 (Ewing's sarcoma, EWS)は骨肉腫に次いで多い腫瘍である。大腿骨、脛骨、骨盤に発生しやすい腫瘍で、転移部位としては肺(50%)、骨(25%)、骨髄(20%)が知られている。

非転移例では、集学的治療により 70%前後の 5 年生存率が望めるが、肺転移例で 30 - 40%、骨・骨髄転移例では 20%程度の生存率である。転移症例に対して大量化学療法、放射線治療など様々な治療強化が試みられてきたが、現在までに予後の改善はみられていない。

(2) Focal adhesion kinase(FAK)は、125KDa の非受容体型チロシンキナーゼであり、インテグリンや成長因子シグナルから刺激を受けると自己リン酸化し細胞増殖シグナルの PI3K-AKT シグナルや SRC を活性化する。様々な腫瘍に発現し腫瘍細胞の接着、遊走、浸潤、すなわち転移メカニズムに関与していることが知られている。

我々は EWS において、FAK が過剰発現していることを見出した (Moritake et al. Cancer Genet Cytogenet: 2003)。FAK 阻害剤は TAE226, PF562,271, PF573228,PND-1186,GSK-2256098 などが開発されている。これまで乳がん、脳腫瘍、卵巣がん、扁平上皮がん、肝芽腫、神経芽腫などで FAK 阻害剤を使用した研究報告がある。

EWS においても FAK 阻害剤の 1 つである PF562,271 での有効性が報告されている。TAE226 は、FAK と IGF-1R に対する二重チロシンキナーゼ抑制薬で、EWS での報告はないが、PF562271 と同様に ES に対する効果が期待できる。

2. 研究の目的

EWS の cell lines を用いて TAE226 と PF-562,271 の細胞毒性を比較する。

また、以下の検討を行うことにより、TAE226 の有効性と安全性の評価のみならず、ES の増殖、遊走、浸潤における関わる因子を明らかにすることを目的とする。

3. 研究の方法

(1) EWS 細胞株を用いて TAE226 と PF562,271 による増殖抑制作用を比較する。

TC71, SK-ES1, RD-ES の 3 つの EWS 細胞株を用いて、TAE226 と PF562,271 への薬剤感受性を 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyl tetrazolium bromide (MTT) assay を用いて細胞増殖阻害効果を比較する。

また、EWS の治療に用いられる抗腫瘍薬 (ビンクリスチン、ドキソルビシン、エトポシド) との併用効果についても評価する。

(2) TAE226 投与による細胞内シグナルの変化を評価する

TC71 細胞株に TAE226 を各濃度 (0, 0.1, 0.5, 1, 2.5, 5 μ M) で添付し 24 時間後に細胞内シグナルの変化をウエスタンブロット法で評価する。

(3) EWS 細胞株の浸潤能に対する TAE226 の作用

Invasion chamber を用いて、TAE226 を投与した際の各 EWS 細胞株 (TC71, SK-ES1, RD-ES) の浸潤能の変化を評価する。

(4) TAE226 投与による細胞周期及びアポトーシスの評価

EWS 細胞を低濃度 TAE226 投与下で培養を行い、細胞周期の変化を Bromodeoxyuridine (BrdU) を用いた免疫蛍光染色を行い、フローサイトメトリーで解析する。

アポトーシス解析として、TAE226 投与下に培養を行い、Annexin V と 4',6-diamidino-2-phenylindole(DAPI) で染色を行い、フローサイトメトリーで解析する。

(5) xenograft モデルを作成し、TAE226 の腫瘍増殖抑制効果、転移抑制効果を評価する

NOJ (NOD/Scid/Jak3 KO) マウスに TC71 細胞株を皮下移植し腫瘍の局所発症モデルを作成する。生着確認後、TAE226 (60mg/kg) 投与群マウスにはメチルセルロースを溶媒とし TAE226 非投与群にはメチルセルロースのみを毎日経口投与し腫瘍増殖抑制効果を腫瘍サイズ、重量の変化などを比較する。

NOJ マウスに TC71 細胞株を尾静脈投与し転移モデルを作成する。

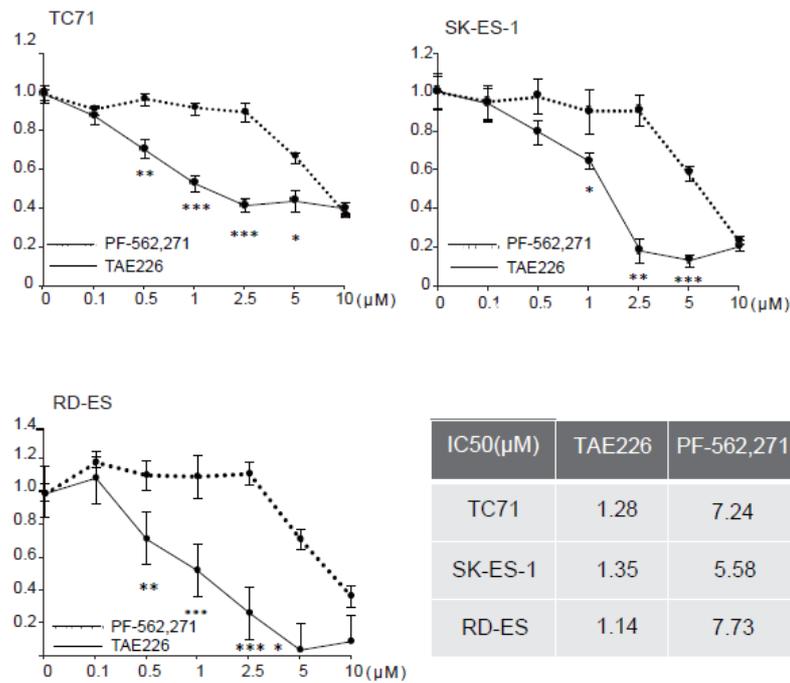
局所発症モデルと同様に TAE 投与群、非投与群 (メチルセルロースのみ) として、TAE226 の転移抑制効果を評価する。

4. 研究成果

(1) TAE226 は PF562,271 と比較して EWS 細胞の増殖を抑制する。

TAE226 と PF562,271 の EWS 細胞に対する効果は MTT assay により評価した。3 つの細胞株 (TC71, SK-ES1, RD-ES) の IC50 は TC71:1.28 μ M, SK-ES1:1.14 μ M, RD-ES:1.14 μ M であった。PF-562,271 で最も反応性が高かった SK-ES1 の IC50 でも 5.58 μ M であり、PF562,271 と比較し TAE226 が著明に細胞増殖を抑制した (図 1)。

図1. TAE226はEWS細胞の増殖を抑制する



(1) TAE226 と抗腫瘍薬はEWS細胞に対して相乗効果を示す

3つのEWS細胞株(TC71、SK-ES-1とRD-ES)に対して、TAE226と各腫瘍薬(ビンクリスチン、ドキソルビシンとエトポシド)を同時に、48時間投与した。

F48時間後の細胞生存度をMTT分析によって測定し、ソフトウェアを用いて薬物併用効果を解析した(CI > 1:拮抗的な効果, CI = 1:相加効果, CI < 1:相乗効果)。

さまざまな比率の組み合わせで投与を行い、3つの抗腫瘍薬は、TAE226と相乗効果(< 1)を示した(表1)。

表1. TAE226と抗腫瘍薬との併用効果

Cell line	Anticancer drugs	Ratio (TAE226: each drug)	ED50	ED75	ED90
TC71	Doxorubicin	1:0.1	0.72363	0.88349	1.4976
	Vincristine	1:0.001	0.39522	0.51643	0.6931
	Etoposide	1:0.5	0.85054	17.11703	492.47009
SK-ES-1	Doxorubicin	1:0.1	0.4115	0.65838	1.05355
	Vincristine	1:0.001	0.56041	0.81403	1.18253
	Etoposide	1:0.5	0.44542	0.96267	2.08094
RD-ES	Doxorubicin	1:0.1	0.01927	56.267	1.64E+05
	Vincristine	1:0.001	0.34303	0.41376	0.49908
	Etoposide	1:0.5	0.29148	0.52327	0.93956
		1:1	0.37823	0.40577	0.4355

CI > 1:拮抗的な効果, CI = 1:相加効果, CI < 1:相乗効果(filled with green color)

(2) TC71細胞株においてTAE226は、FAK、IGF-1RとAKTのリン酸化を低下させた。

FAKとIGF-1Rに対するTAE226の効果は、TC71細胞株を用いて評価した。

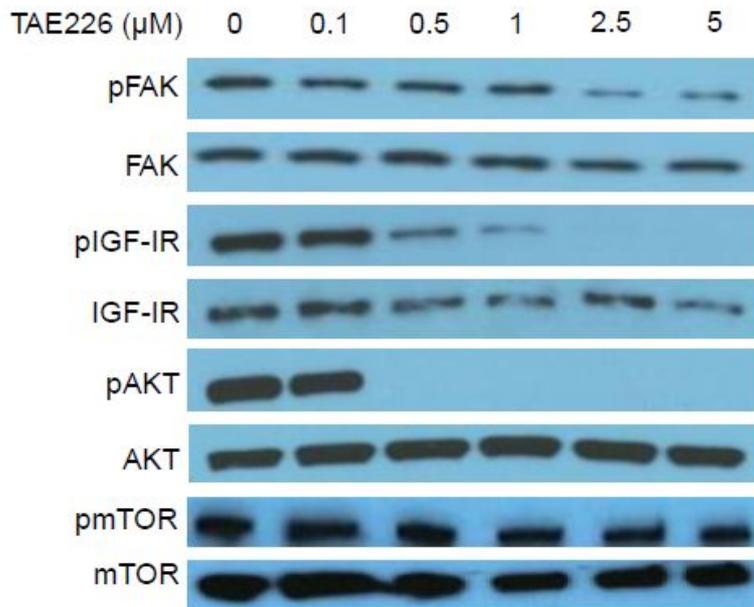
FAK(Tyr397)のリン酸化は用量依存的に阻害された。

IGF-1Rは、3時間のserum-starvedの後、各濃度のTAE226を投与し、TAE226投与後2時間後に100ng/mlのrecombinant IGF-Iで刺激し測定を行った。

IGF-1R(Tyr1135/1136)のリン酸化もFAK同様に用量依存的に阻害された。

更に、AKTとmTORのリン酸化についても、TC71細胞へのTAE226投与により評価を行った。0.5 μMのTAE226でAKTのリン酸化が完全に阻害される一方、mTORは5 μMのTAE226においても変化は認められなかった(図2)。

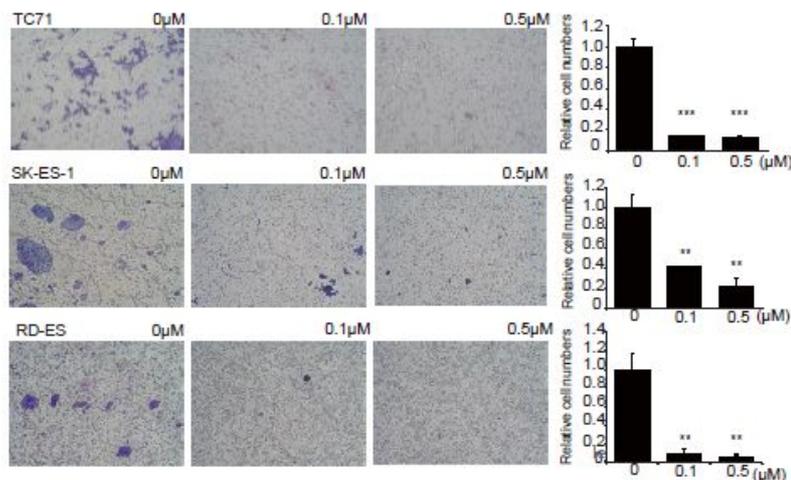
図2. FAK、IGF-IR、AKTのリン酸化を低下させた



(3) TAE226 は EWS 細胞株の浸潤能を阻害する

TC71、SK-ES-1 と RD-ES 細胞によるマトリゲル浸潤は、0.1 または 0.5 μM の TAE226 で、投与により減少した(図 3)。

図3. TAE226はEWS細胞株の浸潤能を阻害する



(4) 低濃度 TAE226 は EWS 細胞株の S 期の減少を介して細胞周期停止を認めた。

高濃度 TAE226 では細胞死誘発されたので、細胞周期の解析は低濃度の TAE226 で行った。

低濃度であっても 3 つの細胞株(TC71, SK-ES1, RD-ES)の sub-G1 集団(アポトーシス分画)は、濃度依存的に有意に増加した。

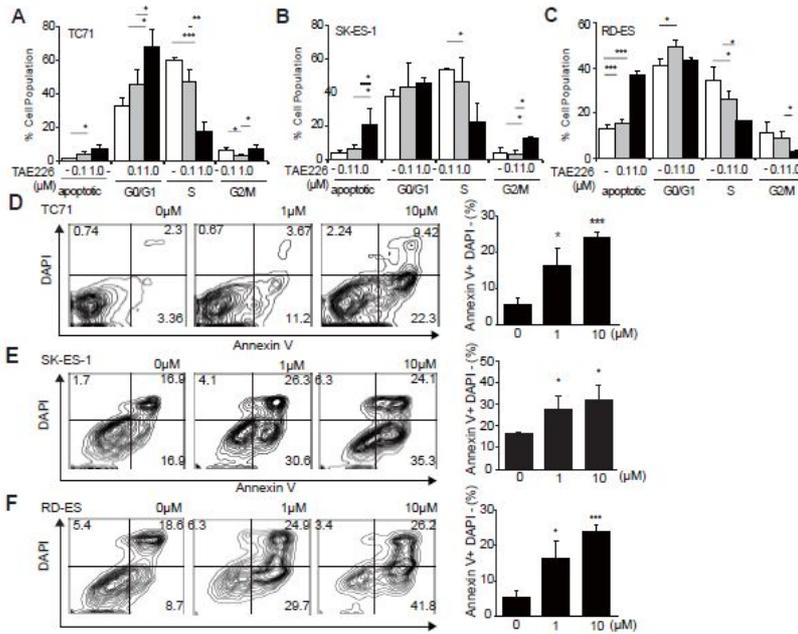
結果は、3 つの細胞株全てにおいて、S 期細胞の割合が低下し、TC71 では G0/G1-期細胞の増加、SK-ES1 では G2/M期細胞の増加、RD-ES においてはアポトーシス細胞(RD-ES: 図 4C)の集団の急激な増加と共に減少することを示した。

(4) 高濃度 TAE226 は、EWS 細胞株でアポトーシスを誘発した。

TAE226 によるアポトーシス誘導を確認するために、1 または 10 μM の TAE226 を投与した EWS

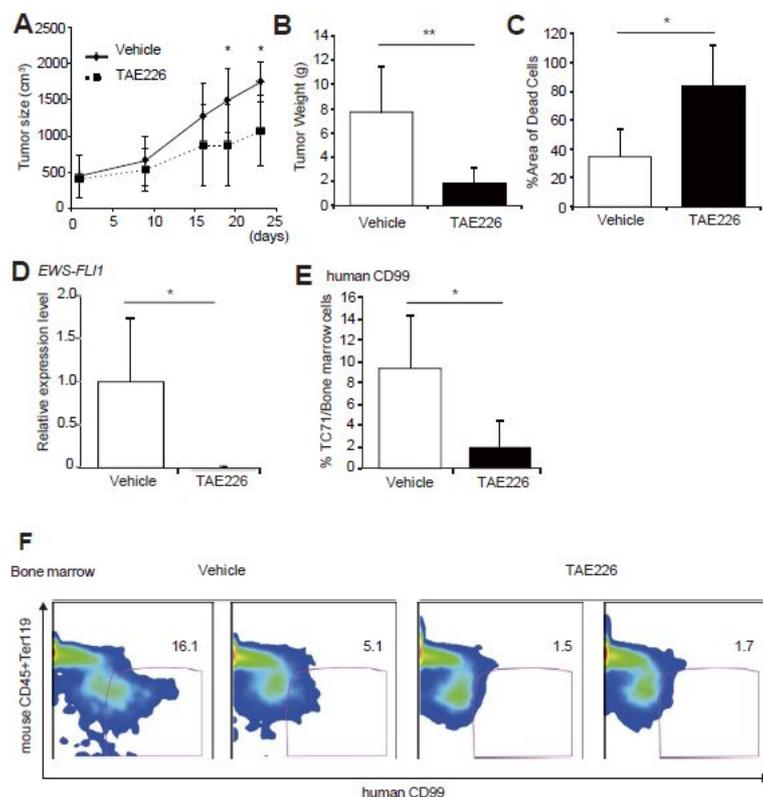
細胞を Annexin V と DAPI 染色のフローサイトメトリーによって分析した。
 アポトーシスを起こした細胞集団は、濃度依存的に有意に増加した (図 4D-F)。

図4. TAE226投与による細胞周期/アポトーシスの評価



(5) TAE226 は生体内で EWS 細胞の局所増大と同様に転移を著しく抑制させる
 EWS 細胞の増殖と転移に対する TAE226 の抑制性効果は、TC71 細胞の皮下および静脈注入したマウスモデルにより分析した。
 局所発症モデルにおいて、TC71 細胞の皮下注からの 1 週間後からの 3 週間の TAE226 治療は、明らかに腫瘍の大きさと重さを減らした (図 5A,B)。
 TAE226 で治療されるマウスの皮下腫瘍の死細胞の割合は、未治療のコントロールマウスにおいて有意に高かった (図 5C)。
 転移モデルにおいて、TC71 細胞の静注からの 1 週間後からの 3 週間の TAE226 治療において、マウス骨髄の EWS-FLI-1 コピー数はコントロールマウスと比較し、TAE226 治療マウスで有意に減少した (図 5D)。
 また、骨髄での、EWS に特有の抗ヒト CD99 陽性の細胞集団の著しい減少を確認した (図 5E,F)。
 これらのデータは、TAE226 が生体内で EWS 細胞の局所増大と同様に転移を著しく抑制させることを示した。

図5. TAE226の生体内での効果



5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計 0 件)

〔学会発表〕(計 1 件)

ユーイング肉腫に対する FAK と IGF-1R の二重チロシンキナーゼ阻害薬 TAE226 の有効性評価

盛武浩、小原めぐみ、澤大介、齋藤祐介、鮫島直樹、此元隆雄、布井博幸
第 58 回日本小児血液・がん学会, 2016 年

〔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

科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属されます。