

令和元年5月8日現在

機関番号：17401

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2016～2018

課題番号：16K19728

研究課題名(和文) HSP90阻害剤による希少かつ難治な血管肉腫に対する新規治療法

研究課題名(英文) The effect of HSP 90 inhibition for angiosarcoma

研究代表者

梶原 一亨 (Kajihara, Ikko)

熊本大学・医学部附属病院 ・助教

研究者番号：90433036

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,700,000円

研究成果の概要(和文)：Heat shock protein 90 (HSP90) は多くの癌関連蛋白質を制御し、様々な悪性腫瘍で HSP90阻害剤の治験が行われている。本研究では、血管肉腫におけるHSP90阻害による抗腫瘍効果を検討した。血管肉腫培養細胞株および患者組織においてHSP90蛋白質は過剰発現していた。HSP90阻害により血管肉腫細胞株の増殖能・浸潤能・遊走能が抑制された。これらの抗腫瘍効果は、vascular endothelial growth factor (VEGF) signalingの下流の各種蛋白質が抑制されることに基づいていた。血管肉腫においてHSP90は治療標的になりうることを示唆された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

血管肉腫は、非常に希少かつ悪性度が高い肉腫である。進行例では、化学療法が主体となるが、現在でも有効性の高い治療法は未確立である。そのため、血管肉腫に対する新規治療の開発は急務である。今回、HSP90阻害剤の血管肉腫に対する抗腫瘍効果を検討した。HSP90阻害効果により血管肉腫細胞株の増殖能・浸潤能・遊走能が抑制された。またその抗腫瘍効果に関する分子メカニズムを解明した。

研究成果の概要(英文)：New therapy for angiosarcoma is urgent because there are few effective treatments. Heat shock protein 90 (HSP90) regulates cancer-associated proteins and many clinical trials of HSP90 inhibitors are on-going in several cancers. In this study, we investigated the anti-tumor effect of HSP90 inhibition. HSP90 protein are overexpressed in angiosarcoma patient's tissues and cell lines. Knockdown of HSP90 inhibited the proliferation/migration/invasion of angiosarcoma cells. These anti-tumor effect were based on the suppression target of several downstream targets of VEGF signaling. Taken together, HSP90 is a novel therapeutic target against angiosarcoma.

研究分野：皮膚科学

キーワード：血管肉腫 heat shock protein 90

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

1. 研究開始当初の背景

血管肉腫の新規治療開発が、他の悪性腫瘍と比較して進展しない理由として、高齢者に発生するため毒性の強い抗癌剤が選択しにくいこと、希少な悪性腫瘍であり大規模臨床試験が施行困難なことが考えられる。我々は、血管肉腫症例に対する biweekly gemcitabine 療法および S-1/docetaxel 療法の有効性を報告しているが、既存の抗癌剤では限界がある。そのため、有効性及び安全性の両者を備えた分子標的薬を用いた血管肉腫に対する新規治療法の開発が必要である。

HSP90 は主要な細胞内シャペロンのひとつであり、翻訳された不安定なエネルギー状態にある蛋白質をフォールディングの過程を経て安定化させる。また、種々の変性した蛋白質に作用し、生理機能活性の回復を促進させる。HSP90 は 200 種類以上のクライアント蛋白質の機能維持に必須であり、注目すべきは(1)MEK、mTOR、AKT、HER2、EGFR、BRAF など細胞増殖および生存に必要な多数の protein kinase の制御(2)VEGF signaling の下流蛋白質の調節に関与することである。また HSP90 阻害剤による治療は、単一の分子を標的とすると同時に、多数の HSP90 クライアント蛋白質を同時に抑制する。癌細胞では、HSP90 が正常組織に比べ、数倍の過剰発現を認めている。また HSP90 阻害剤による治療は、単一の分子を標的とすると同時に、多数の HSP90 クライアント蛋白質を同時に抑制する。実際、多数の悪性腫瘍にて in vitro/in vivo の有用性が報告されている。さらに近年、HSP90 阻害剤を用いた臨床試験が肺癌、乳癌、多発性骨髄腫など多数の癌で多数進行中であり、現在のところ重篤な有害事象のために治験が中止となった報告はなく、安全性に関しては担保されていると考えられる。血管肉腫は血管内皮細胞を起源とする悪性腫瘍であり、HSP90 阻害剤による治療は(1)細胞増殖抑制効果のみならず(2)血管内皮細胞の機能および増殖に必須な VEGF 経路をも抑制することで、他癌よりさらに治療効果が期待できる。本研究にて in vitro/in vivo で有用性が証明されれば、短期間での臨床応用が想定される。

2. 研究の目的

上記の背景をもとに、未だ有効な治療法のない血管肉腫に対して、HSP90 阻害剤を用いた新規治療の臨床応用への基盤となる研究を行う。

血管肉腫における HSP90 の発現レベル解析

患者検体およびセルラインを用いた mRNA および蛋白質レベルの発現量解析

血管肉腫に対する HSP90 阻害剤を用いた抗腫瘍効果およびそのメカニズム

1)セルラインを用いた HSP90 阻害剤単剤および既存抗癌剤との併用療法における細胞増殖・浸潤能、遊走能の抑制効果を検討する。

2)HSP90 を key regulator とするクライアント蛋白質の細胞増殖・浸潤能、遊走能への関与を明らかにし、in vitro における抗腫瘍効果のメカニズムを解明する。

3. 研究の方法

1)血管肉腫における HSP90 発現レベルの解析

検体組織より total RNA を抽出する。正常皮膚組織・良性腫瘍である老人性血管腫・悪性腫瘍である血管肉腫における HSP90 mRNA 発現量の比較検討を行う。培養細胞株を用いて正常血管内皮細胞、血管肉腫細胞株である ISOHAS・HAMON・ISOS-1 の HSP90 mRNA 発現量を検討する。さらに患者検体組織および in vitro における HSP90 蛋白質の発現レベルを検討する。

2)血管肉腫に対する HSP90 阻害剤の抗腫瘍効果の検討

血管肉腫細胞株を用いて HSP90 阻害剤の細胞増殖抑制効果を検討する。

HSP90 阻害剤(Ganestesisib、GA)を用いて各々血管肉腫細胞株に対する細胞増殖抑制効果を検討する。細胞数は Cell Count Kit-8(Dojindo)を用いて測定し、50%阻害濃度(IC50)を求める。また TUNEL assay にて apoptosis cell も測定する。さらに、血管肉腫において有効とされる Paclitaxel(PAC)、Docetaxel(DOC)、Gemcitabine(GEM)の、血管肉腫細胞株に対する IC50 は未報告なためそれぞれ求める。そのうえで、既存抗癌剤と HSP90 阻害剤の併用療法の有効性を検討する。

血管肉腫細胞株を用いて HSP90 阻害剤の浸潤能・遊走能に対する効果を検討する。

人工基底膜マトリックスを用いて GA 投与による浸潤能・遊走能への影響を検討する。

HSP90 阻害剤による抗腫瘍効果のメカニズムの解明

HSP90 は細胞増殖に関与するキナーゼのみならず、VEGF 経路に関与する各種蛋白質を制御している。HSP90 阻害剤投与による血管肉腫細胞株の各種蛋白質の変化量を検討し、抗腫瘍効果のメカニズムを解析する。検討予定の蛋白質は以下である。

VEGF signaling

Survival : Caspase-9、eNOS

Adhesion : Paxillin、FAK

Proliferation : MEK

VEGF signaling 以外 : MMP-2、MMP-9

4. 研究成果

血管肉腫患者検体組織および培養細胞株において HSP90 は過剰発現している

正常、老人性血管腫、血管肉腫組織における HSP90、HSP90 蛋白質の発現を免疫染色にて検討した。血管肉腫患者組織では正常血管や老人性血管腫と比べ、HSP90 および HSP90 が濃染された。次に血管肉腫培養細胞株 (HAMON、ISO-HAS、MO-LAS、ISOS-1) における HSP90、HSP90 蛋白質発現を免疫プロット法にて解析した。コントロール群として HDMEC、HDF、HaCaT を置いた。血管肉腫細胞株ではコントロール群と比較して HSP90、HSP90 ともに強発現を認めた。

HSP90 阻害剤 ganetespib は血管肉腫細胞の増殖を抑制する

HSP90 阻害効果を確認するために、血管肉腫細胞株 (HAMON、ISO-HAS) に対して、HSP90 阻害剤 ganetespib を異なる濃度 (10、25、50、75、100、1000 nM) で 72 時間投与し、細胞生存率を解析した。ganetespib は濃度依存性に血管肉腫細胞株 (HAMON、ISO-HAS) ともに抑制した。

HSP90 siRNA は血管肉腫細胞の増殖能・遊走能・浸潤能を抑制する

HSP90 siRNA を用いて血管肉腫細胞株に対する HSP90 阻害効果を検討した。HSP90 siRNA により血管肉腫細胞株において細胞数の減少を認めた。遊走/浸潤アッセイでは、遊走能・浸潤能ともに低下させた。

血管肉腫における HSP90 阻害は、VEGF シグナリングの下流を抑制する

HSP90 阻害による血管肉腫への抗腫瘍効果のメカニズムを検討した。HSP90 siRNA による VEGFR2 のリン酸化への影響を検討したが、明らかな変化を認めなかった。次に、VEGF シグナリングの下流への効果を探した。HSP90 siRNA により、ERK のリン酸化は抑制され、一方で MEK のリン酸化は変わらなかった。このことは血管肉腫において HSP90 阻害作用は、MEK を介さずに ERK のリン酸化が直接抑制されることを示唆した。また FAK および paxillin、VE cadherin のリン酸化も抑制された。さらに survivin の発現量、caspase-3/7 活性も抑制された。以上のことから、血管肉腫において HSP90 阻害は、直接 VEGFR2 に作用するのではなく、VEGF シグナリングの各種下流蛋白質を抑制することで抗腫瘍効果をもたらすと考えられた。

本研究では、血管肉腫において HSP90 が過剰発現していること、HSP90 阻害により血管肉腫細胞の増殖能・遊走能・浸潤能が抑制されること、さらに HSP90 阻害は VEGF シグナリングの下流を抑制することで抗腫瘍効果をもたらすことを示した。

HSP90 は悪性腫瘍の生命維持に欠かせない分子シャペロンであり、複数の悪性腫瘍で HSP90 の過剰発現を認め、予後不良因子とされている。本研究においても、HSP90 は血管肉腫患者検体組織および培養細胞株において過剰発現を認めた。HSP90 阻害剤 ganetespib は、様々な癌モデルで増殖抑制しアポトーシスを誘導することが示されており、臨床試験において副作用がほとんどなく抗腫瘍効果を認めている。本研究でも HSP90 阻害剤および HSP90 siRNA による増殖抑制効果を認めた。

VEGF は血管新生において重要な役割を果たし、血管肉腫は VEGF シグナリングに依存的であるとされる。しかし、抗 VEGF モノクローナル抗体であるベバシズマブ、VEGF 受容体を含むマルチキナーゼ阻害剤であるスニチニブ、ソラフェニブは血管肉腫患者には、奏功しなかった。またベバシズマブは in vitro・in vivo における検討でも効果が不十分と報告されている。これらのことは、血管肉腫の治療において VEGF や VEGFR を標的とするよりも、VEGF シグナリングの下流をターゲットとする方が重要である可能性が示唆される。本研究結果では、血管肉腫において HSP90 を阻害すると、直接 VEGFR2 に作用するのではなく、VEGF シグナリングの下流タンパクを抑制することが分かった。MAPK 経路は細胞増殖に重要とされており、HSP90 siRNA は MEK を介さずに ERK のリン酸化を抑制した。また FAK や paxillin は癌細胞の遊走・浸潤を制御しており、FAK は VE cadherin のリン酸化を促し血管内皮細胞接着を减弱させる。今回の結果では HSP90 siRNA は FAK・paxillin・VE cadherin のリン酸化を抑制しており、HSP90 阻害により転移が抑制されることが示唆された。さらに HSP90 siRNA はアポトーシスを抑制する survivin の発現を低下させ、細胞死に必要な caspase-3/7 活性を増強させた。このことは HSP90 阻害によるアポトーシス効果を示唆した。以上より、血管肉腫における HSP90 阻害は VEGF 経路の様々な下流蛋白質を抑制することにより、抗腫瘍効果を発揮すると考えられた。

5. 主な発表論文等

[雑誌論文](計 18 件)

Urata K, [Kajihara I](#) et al. Overexpression of cyclin-dependent kinase 4 protein in extramammary Paget's disease. 査読有 J Dermatol. 2019 [Epub]

Yamada-Kanazawa S, Tasaki Y, [Kajihara I](#) et al. The expression of EpCAM in extramammary Paget's disease. 査読有 Intractable Rare Dis Res. 2019 8: 20-23.

Yamada-Kanazawa S, [Kajihara I](#) et al. Infliximab improved the refractory cutaneous involvement in a patient with dermatomyositis. 査読有 Dermatol Ther. 2019 [Epub]

Mijiddorj T, [Kajihara I](#) et al. Serum cell-free DNA levels are a useful marker for extramammary Paget disease. 査読有 Br J Dermatol. 2019 [Epub]

Maeda-Otsuka S, [Kajihara I](#) et al. Hypoxia accelerates the progression of angiosarcoma through the regulation of angiosarcoma cells and tumor microenvironment. 査読有 J Dermatol Sci. 2019 93: 123-132.

Aoi J, [Kajihara I](#) et al. Simple and effective modification of the axial frontonasal

flap to prevent flap distortion. 査読有 J Dermatol. 2019 46: e46-e47.

Miyamura T, Kajihara I et al. Sweet's syndrome with laryngoparalysis due to laryngitis. 査読有 J Dermatol. 2018 45: e295-e296.

Kanamori S, Kajihara I et al. Expression of aurora kinase A expression in dermatofibrosarcoma protuberans. 査読有 J Dermatol. 2018 45: 507-508.

Sonoda-Shimada K, Kajihara I et al. Case of pigmented lipofibromatosis in a 27-year-old woman. 査読有 J Dermatol. 2018 45: e128-e129.

Kajihara I et al. Secukinumab-induced interstitial pneumonia in a patient with psoriasis vulgaris. 査読有 J Dermatol. 2017 44: e322-e323.

Sato Y, Kajihara I et al. S100A7 expression levels in coordination with interleukin-8 indicate the clinical response to infliximab for psoriasis patients. 査読有 J Dermatol. 2017 44: 838-839.

Nakamura Y, Kajihara I et al. Intratumor dihydropyrimidine dehydrogenase mRNA expression levels are decreased in extramammary Paget's disease. 査読有 Drug Discov Ther. 2017 11: 152-155.

Sawamura S, Kajihara I et al. Cutaneous spindle cell adenolipoma on the nose: A rare variant of lipoma. 査読有 J Dermatol. 2017 44: e156-e157.

Yamada-Kanazawa S, Kajihara I et al. Inhibition of heat shock protein 90 exerts an antitumour effect in angiosarcoma: involvement of the vascular endothelial growth factor signalling pathway. 査読有 Br J Dermatol. 2017 177: 456-469.

Egashira S, Kajihara I et al. Achieved good response of S-1 and docetaxel combination chemotherapy in two patients with metastatic extramammary Paget's disease. 査読有 J Dermatol. 2017 44: e103-e104.

Maeda S, Kajihara I et al. Bromoderma in a pituitary adenoma patient treated with bromocriptine. 査読有 J Dermatol. 2017 44: e95-e96.

Sawamura S, Kajihara I et al. Systemic lupus erythematosus associated with myasthenia gravis, pemphigus foliaceus and chronic thyroiditis after thymectomy. 査読有 Australas J Dermatol. 2017 58: e120-e122.

Yamada S, Kajihara I et al. Symptomless Pulmonary Cryptococcosis in a Psoriatic Arthritis Patient during Infliximab Therapy. 査読有 Ann Dermatol. 2016 28:269-70.

〔学会発表〕(計7件)

梶原一亨。乳房外パジェット病における CDK4 発現の検討。第 77 回日本癌学会学術総会。2018 年。

梶原一亨、金澤早織、尹浩信。Heat shock protein 90 は血管肉腫の治療標的になりうる。第 26 回血管生物医学会学術集会。2018 年。

梶原一亨。高齢者の予後改善を目指す頭部血管肉腫に対する新規治療法の開発。第 13 回加齢皮膚医学研究会。2017 年。

梶原一亨。稀少かつ難治な血管肉腫に対する標準治療をどう計画すべきか?。第 69 回日本皮膚科学会西部支部学術大会。2017 年。

梶原一亨。乳房外パジェット病では DPD mRNA 発現が亢進している。第 76 回日本癌学会学術総会。2017 年。

梶原一亨。隆起性皮膚線維肉腫におけるオーロラキナーゼ A の発現。第 75 回日本癌学会学術総会。2016 年。

梶原一亨、古賀愛子、山田早織、福島聡、神人正寿、尹浩信。CCR9 expression levels in psoriatic skin negatively correlates with clinical outcome to infliximab. 日本研究皮膚科学会第 41 回年次学術大会。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：なし

6. 研究組織

(1)研究分担者：なし

(2)研究協力者：なし

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。