

令和 2 年 5 月 8 日現在

機関番号：17701

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2017～2019

課題番号：17K10973

研究課題名(和文) 未分化/未分類肉腫 新規分子標的治療研究

研究課題名(英文) Research for molecular target of undifferentiated sarcoma treatment

研究代表者

瀬戸口 啓夫 (Setoguchi, Takao)

鹿児島大学・医歯学総合研究科・客員研究員

研究者番号：40423727

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,600,000円

研究成果の概要(和文)：HDAC阻害剤(LBH589)Undifferentiated pleomorphic sarcoma (UPS)の増殖を抑制し、そのIC50は6-13nMと高い有効性を示し、in vivoにおいても増殖抑制効果を示した。マイクロアレイで同定したLBH589で発現変化する遺伝子の中から、FOS-like antigen 1 (FOSL1)がUPSの増殖を制御する遺伝子であることを見出した。さらに下流分子であるNeurotensin Receptor 1(NTSR1)に着目し、NTSR1の阻害薬であるSR48692はUPS治療に使用するドキソルビシンとの併用で腫瘍増殖抑制効果を示した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

未分化/未分類肉腫(Undifferentiated pleomorphic sarcoma (UPS))は最も頻度の高い軟部肉腫であるが、有効な化学療法は未だ確立していない。HDAC inhibitorであるLBH589が従来の抗がん剤と相乗的にUPSの増殖を抑制することを見出した。さらに副作用減少のために下流分子メカニズムを解析し、FOSL1とNTSR1がその下流で機能してNTSR1阻害薬のSR48692が従来の抗がん剤と相乗的にUPSの増殖抑制することを示した。これら分子が治療標的となる可能性を示し、臨床的に有用であると判断する。

研究成果の概要(英文)：Undifferentiated pleomorphic sarcoma (UPS) is the second most common soft tissue sarcoma. We investigated the effects of Histone deacetylases (HDAC) inhibitor, LBH589. LBH589 exhibits antitumor activities in UPS cell. Microarray identified the FOS-like antigen 1 (FOSL1) gene as a downregulated gene in response to LBH589. Knockdown of FOSL1 decreased UPS cell proliferation. Next, we focused on neurotensin receptor 1 (NTSR1), which expression was changed by FOSL1 knockdown. Expression of NTSR1 messenger RNA was increased in UPS cells. Expression of NTSR1 protein is upregulated in UPS cell lines. Knockdown of NTSR1 prevented UPS cell proliferation. SR48692, an inhibitor of NTSR1, exhibited antitumor activities in UPS cells. The combination index showed that SR48692 and standard chemotherapeutic drugs prevented UPS cell proliferation synergistically. Mouse models showed that SR48692 enhanced the response to standard chemotherapeutic drugs. These drugs may be a new drug for UPS therapy.

研究分野：骨軟部肉腫

キーワード：UPS 未分化多型肉腫 HDAC阻害剤 FOS-like antigen 1 Neurotensin Receptor 1 SR48692

## 様式 C-19、F-19-1、Z-19 (共通)

### 1. 研究開始当初の背景

Undifferentiated pleomorphic sarcoma (UPS)は最も頻度の高い軟部肉腫のひとつである。しかし、有効な化学療法は未だ確立していない。外科的切除が中心となるが、広範切除による機能障害が問題となる。また再発転移が多く、有効な化学療法の開発が望まれている。

### 2. 研究の目的

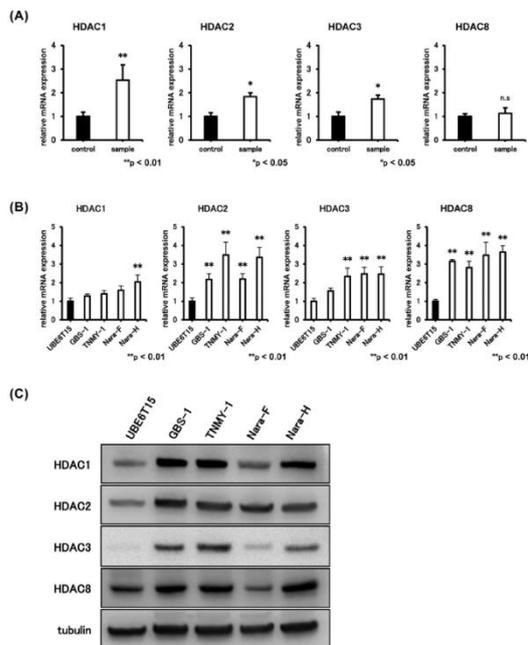
HDAC 阻害剤はヒストンの脱アセチル化を介してエピジェネティックに遺伝子発現を制御する新しいタイプの抗腫瘍薬であるがその作用機序には不明な点も多い。我々は骨髄腫の治療に日本でも承認されている Histone deacetylase inhibitor (HDAC inhibitor)である Panobinostat (LBH589) の効果を検討し、さらに副作用低下のためにさらなる標的の下流分子の同定と阻害剤の検討を行った。

### 3. 研究の方法

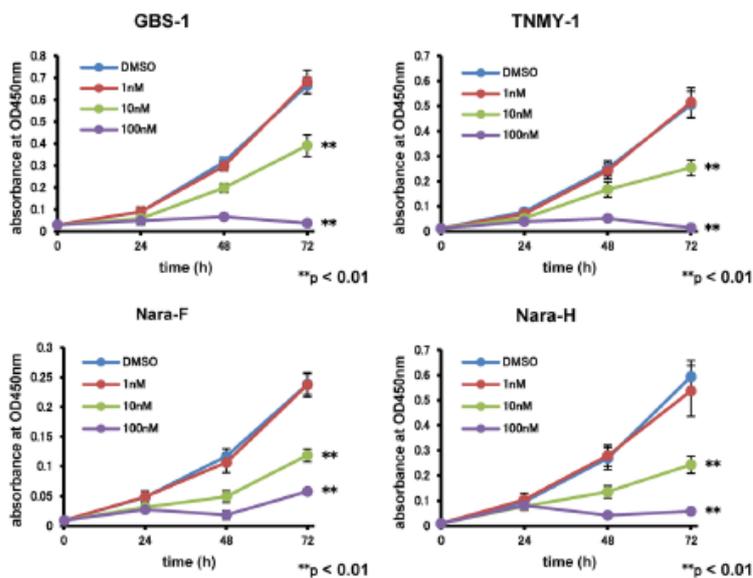
4種のUPS細胞株を使用した。細胞の増殖抑制能をWST assayで検討した。In vivoでの効果を検討するためにXenograftマウスモデルを使用した。RNA microarrayを行い、LBH589処理によって発現変化する下流分子の同定を行った。さらにその下流分子についてもRNA microarrayで検討した。combination indexを使用して他の抗がん剤との相乗効果について検討した。

### 4. 研究成果

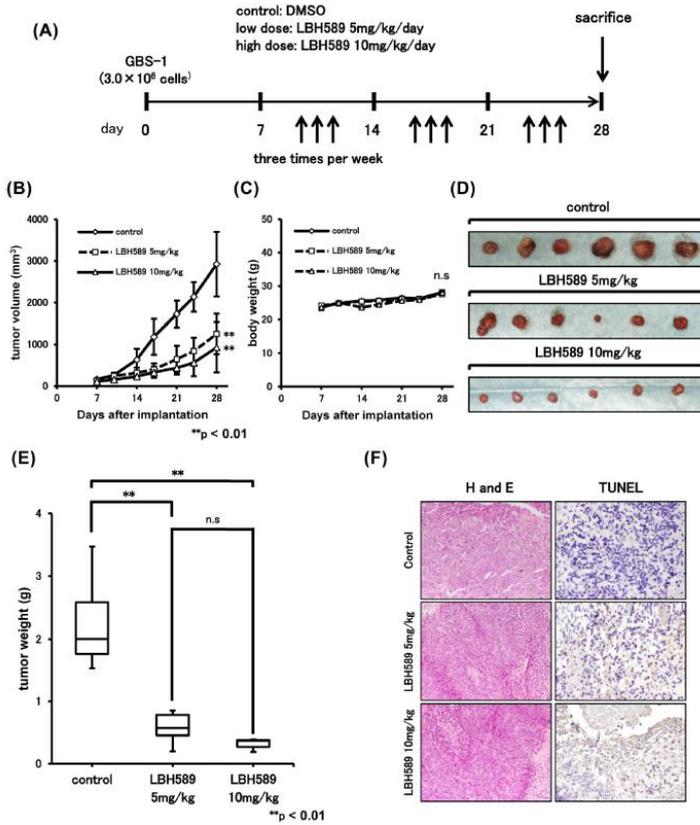
ヒトUPS細胞株ではHDACの発現が亢進していた。



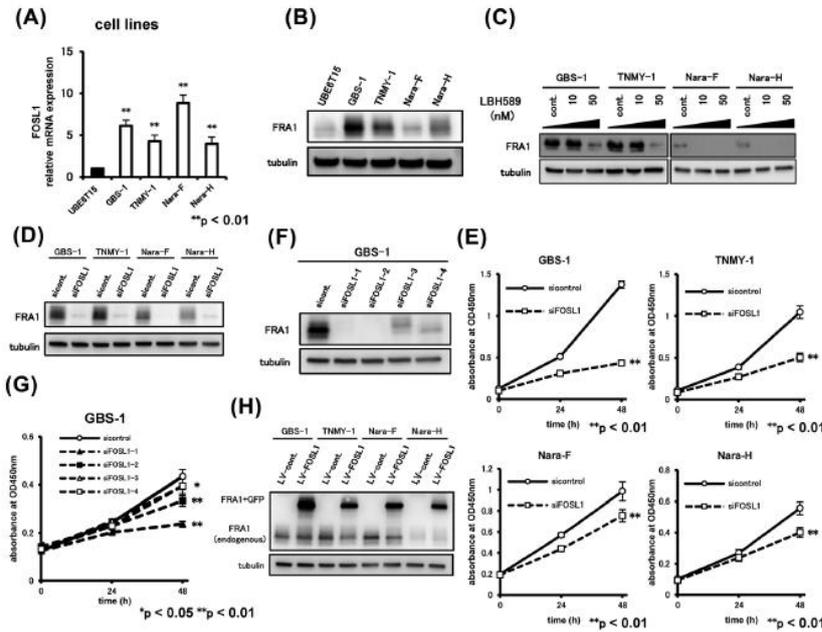
LBH589 処理で4種類のヒトUPS細胞株の増殖が抑制された。



マウス Xenograft モデルでも LBH589 は腫瘍増殖を抑制した。



マイクロアレイで LBH589 は FOS-like antigen 1 (FOSL1) の発現を制御しており、FOSL1 の発現をノックダウンすると UPS 細胞の増殖が抑制された。

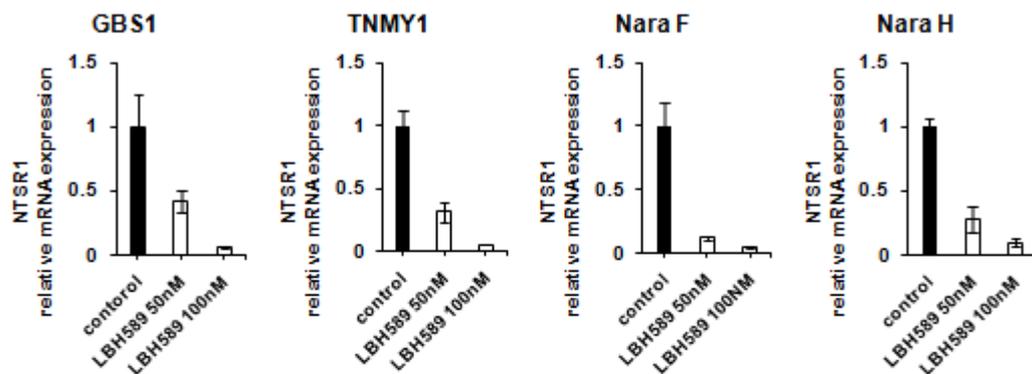


LBH589 は多発性骨髄腫の治療に対し FDA の認可を受けた薬剤である。上記結果より in vitro において LBH589 は UPS 細胞株に対して多発性骨髄腫の細胞株と比較して遜色ない抗腫瘍効果を呈した。FOSL1 は JUN ファミリーと二量体化し転写因子 AP-1 を形成する oncogene であり、その高値は肺がんや前立腺がんなどで予後不良因子となると報告されている。LBH589 処理により FOSL1 の down regulation を生じ、これが HDAC 阻害剤の抗腫瘍効果に寄与していることが示唆された。薬物治療抵抗性の腫瘍である UPS の治療に際し、FOSL1 は有用な治療標的となる可能性がある。

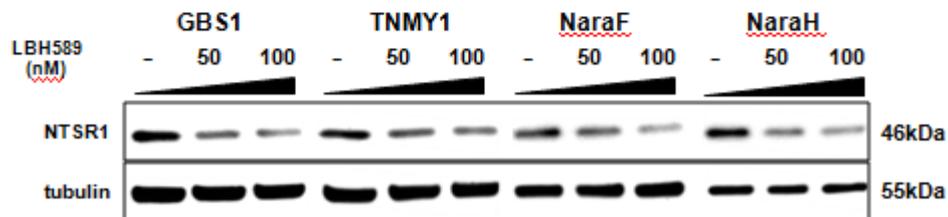
LBH589 を使用しマイクロアレイを行った結果、下記遺伝子の発現変化が見られた。

	gene symbol	gene name	control	sample	log2FC
1	EMP1	epithelial membrane protein 1	41445.96	1018.18	-5.3219281
2	C15orf52	chromosome 15 open reading frame 52	13057.07	504.05	-4.6803821
3	CLMP	CXADR-like membrane protein	9849.88	388.45	-4.6803821
4	PLAU	plasminogen activator, urokinase	13373.05	536.44	-4.6438562
5	FJX1	four jointed box 1 (Drosophila)	3618.14	200	-4.1844246
6	ITPR1PL2	inositol 1,4,5-trisphosphate receptor interacting protein-like 2	4165.92	260.34	-4.011588
7	SLC38A1	solute carrier family 38, member 1	6186.17	392.75	-3.9885044
8	FOSL1	FOS-like antigen 1	6033.4	406.13	-3.8996951
9	TM4SF1	transmembrane 4 L six family member 1	23788.78	1615.93	-3.8783214
10	ANGPT2	angiopoietin 2	4811.97	358.43	-3.7563309
11	PRRX1	paired related homeobox 1	2659.4	205.64	-3.6989977
12	FOXQ1	forkhead box Q1	2555.01	200	-3.6803821
13	IRX4	iroquois homeobox 4	10311.84	822.71	-3.6438562
14	SERPINH1	serpin peptidase inhibitor, clade H (heat shock protein 47), member 1	5731.01	461.16	-3.6438562
15	TRIM8	tripartite motif containing 8	2660.37	228.46	-3.5395195
16	LMNB1	lamin B1	2384.18	211.02	-3.4900509
17	AMIGO2	adhesion molecule with Ig-like domain 2	3052.5	273.91	-3.4739312
18	HOXB9	homeobox B9	3205.13	289.51	-3.4739312
19	BCAR3	breast cancer anti-estrogen resistance 3	3239.93	302.14	-3.4266255
20	IGF2BP1	insulin-like growth factor 2 mRNA binding protein 1	2142.2	200	-3.4266255
21	LRFN4	leucine rich repeat and fibronectin type III domain containing 4	7801.25	730.29	-3.4111954
22	NTSR1	neurotensin receptor 1	3789.61	373.52	-3.3364277
23	FOXC2-AS1	FOXC2 antisense RNA 1	2127.35	212.89	-3.3219281
24	IGF2BP3	insulin-like growth factor 2 mRNA binding protein 3	19448.3	2015.58	-3.2853446
25	CDC42EP1	CDC42 effector protein (Rho GTPase binding) 1	10239.02	1100.03	-3.2243173
26	HPDL	4-hydroxyphenylpyruvate dioxygenase-like	6804.34	736.51	-3.2108968
27	IL4R	interleukin 4 receptor	3208.35	348.4	-3.1976
28	TRIP6	thyroid hormone receptor interactor 6	2534.77	276.56	-3.1976
29	LOC100128242	uncharacterized LOC100128242	2942.5	324.19	-3.1844246
30	PHF19	PHD finger protein 19	5971.44	654.26	-3.1844246

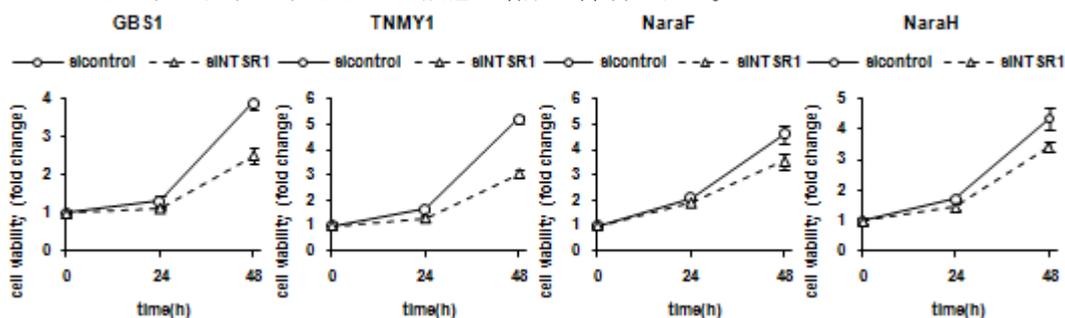
その後 RT-PCR および Western blotting にて、mRNA およびタンパクレベルで LBH589 濃度依存性に Neurotensin Receptor 1 (NTSR1) の発現が減少していた。



**B**



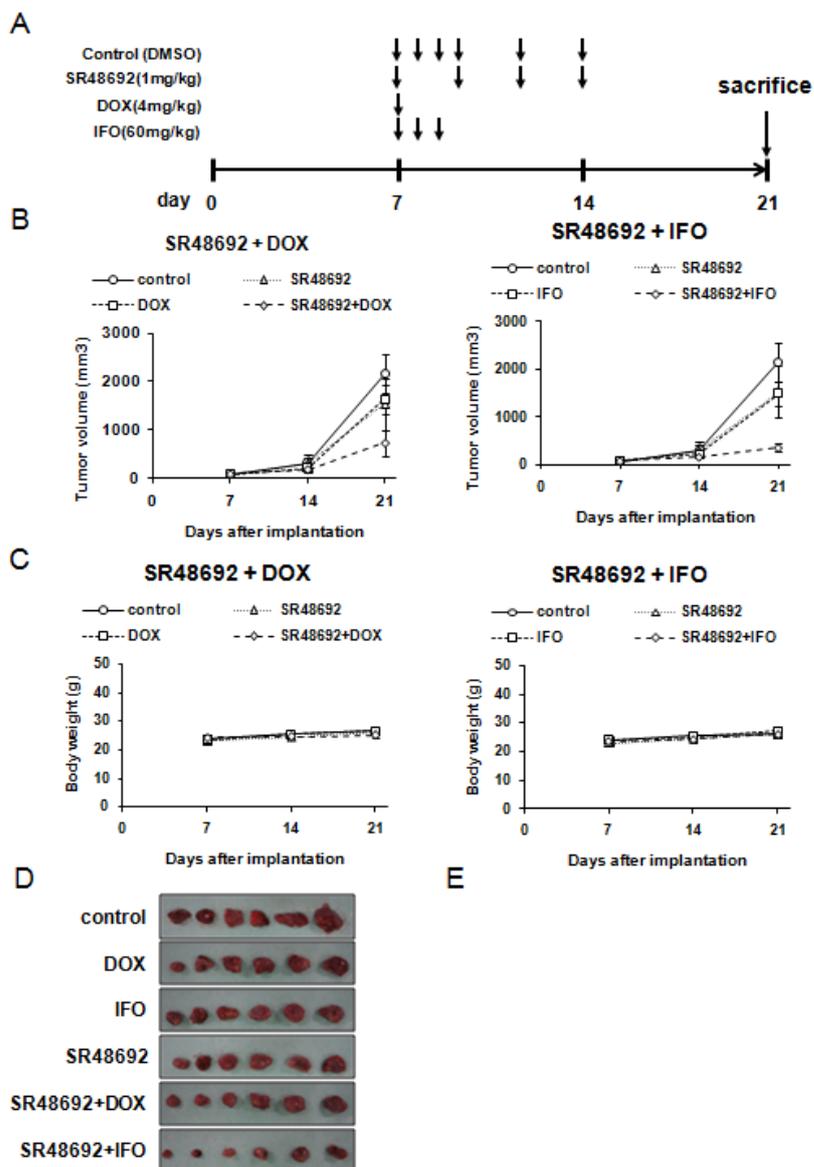
NTSR1 をノックダウンすると UPS 細胞の増殖が抑制された。



NTSR1 の選択的治療薬である SR48692 は UPS 治療に標準使用されるドキソルビシンとイフォスファミドと併用することで相乗的に UPS 細胞増殖を抑制した。

GBS-1			
	ED50	ED75	ED90
SR+DOX	1.53918	0.98927	0.65649
SR+IFO	0.92822	0.70288	0.53270
TNMY-1			
	ED50	ED75	ED90
SR+DOX	1.36926	0.98075	0.72138
SR+IFO	0.96622	0.71640	0.53510
Nara-F			
	ED50	ED75	ED90
SR+DOX	0.94350	0.89310	0.86640
SR+IFO	0.74421	0.59166	0.47063
Nara-H			
	ED50	ED75	ED90
SR+DOX	0.96631	0.84309	0.81393
SR+IFO	0.72199	0.55866	0.43391

マウス Xenograft モデルを用いた解析では、ドキソルビシンとイフォスファミドと併用することで相乗的に腫瘍増大を抑制した。



5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計3件（うち査読付論文 2件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 0件）

1. 著者名 Saito Y, Setoguchi T, Komiya S.	4. 巻 44 (3)
2. 論文標題 Targeting Epigenetics in Treatment of Cancer and Sarcoma	5. 発行年 2017年
3. 雑誌名 Gan To Kagaku Ryoho	6. 最初と最後の頁 217-221
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.jos.2018.10.027.	査読の有無 無
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Saitoh Y, Bureta C, Sasaki H, Nagano S, Maeda S, Furukawa T, Taniguchi N, Setoguchi T.	4. 巻 58 (2)
2. 論文標題 The histone deacetylase inhibitor LBH589 inhibits undifferentiated pleomorphic sarcoma growth via downregulation of FOS-like antigen 1.	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Molecular carcinogenesis	6. 最初と最後の頁 234-246
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1002/mc.22922.	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Tokumoto H, Setoguchi T, Saitoh Y, Sasaki H, Nagano S, Maeda S, Tanimoto A, Taniguchi N.	4. 巻 58(12)
2. 論文標題 Neurotensin receptor 1 is a new therapeutic target for human undifferentiated pleomorphic sarcoma growth.	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Molecular carcinogenesis	6. 最初と最後の頁 2230-2240
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1002/mc.23111.	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

〔学会発表〕 計0件

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
研究分担者	小宮 節郎 (Komiya Setsuro)  (30178371)	鹿児島大学・医歯学域医学系・教授  (17701)	

