

令和元年6月25日現在

機関番号：13501

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2017～2018

課題番号：17K16684

研究課題名(和文) PAR-1をターゲットにした肉腫の新規治療開発

研究課題名(英文) Development of new treatment for sarcoma targeting PAR-1

研究代表者

齋藤 正憲 (SAITO, Masanori)

山梨大学・大学院総合研究部・医学研究員

研究者番号：90596991

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,100,000円

研究成果の概要(和文)：骨軟部肉腫の予後はこの20年で変化をみない。肺転移症例の予後は変わらず低く、新規治療の開発が必要である。我々はPAR-1をターゲットにした新規治療を検討した。骨肉腫表面にPAR-1の発現があることを確認した。PAR-1のアゴニストである、トロンビンで刺激すると細胞増殖、サイトカイン産生が上昇し、それらはPAR-1アンタゴニストであるPZ128で抑制された。最後にPZ128の原発と転移への効果を検討した。肺転移はPZ128の投与で有意に抑制を認めしたが、その一方で原発への効果が軽度縮小したが有意ではなかった。更なる検討が必要であるが、PAR-1は新規ターゲットの一つとして大きな可能性がある。

研究成果の学術的意義や社会的意義

骨軟部肉腫の予後はこの20年で変化をみない。肺転移症例の予後は変わらず低く、新規治療の開発が必要である。我々はPAR-1をターゲットにした新規治療をPAR-1アンタゴニストであるPZ128を用いて、V i t r o、V i v oで検証した。この研究の意義として、今回は骨肉腫細胞のみで検討したが、更なる検討で骨軟部肉腫全体への投与の可能性を秘めている。また、既存治療が無効な症例や、高齢や合併症により抗がん剤が投与できない症例などにも投与できる可能性もあり、実用化に向けて更なる検討を行う必要がある。

研究成果の概要(英文)：The prognosis for bone and soft tissue sarcoma has not changed in the last 20 years. The prognosis for lung metastasis cases remains unchanged, and the development of new treatments is needed. We examined new treatments targeting PAR-1. It was confirmed that expression of PAR-1 was on the surface of osteosarcoma. Stimulation with thrombin, an agonist of PAR-1, increased cell proliferation and cytokine production, and they were suppressed by PZ128, a PAR-1 antagonist. Finally, we examined the effect of PZ128 on the origin and metastasis. Lung metastasis was significantly suppressed by administration of PZ128, while the effect on the primary was slightly reduced but not significant. Although further study is required, PAR-1 has great potential as one of the new targets.

研究分野：骨軟部肉腫

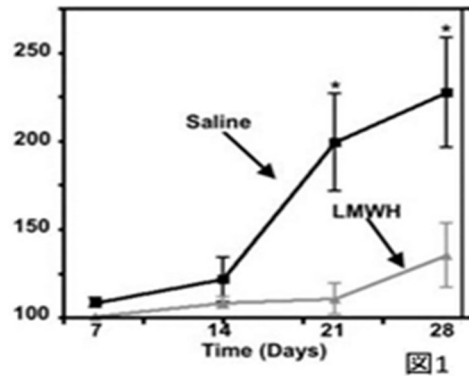
キーワード：骨軟部肉腫 分子標的治療

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

1. 研究開始当初の背景

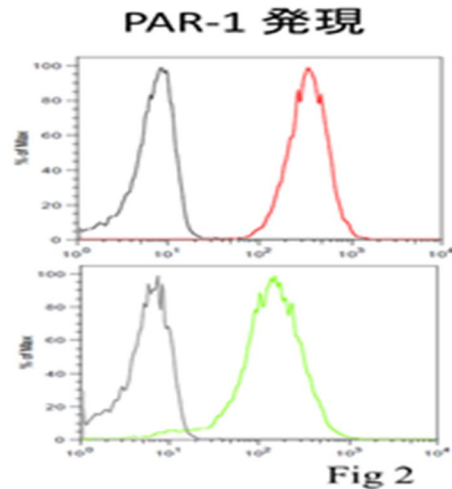
骨肉腫は日本全国でも年間 100 人程度の発生率であり、後発年齢は 10 歳代が 60%と若年層に多い。系統的化学療法 (シスプラチン、アドリアシン、イホマイド) の施行前は 5 年生存率は 15%程度であったが、その施行後は 70%までに上昇している。更に、手術療法も切断から患肢温存手術へと変遷し、現在、切除縁の縮小も試みられている。上皮系腫瘍と比較した場合、骨肉腫は発生頻度が極端に少ないという点、また発生組織が間葉系である点は大きな差異であり、新たな分子標的治療の開発が進まない理由である。

このような現状を打破するべく、我々は、過去に於いては、膵臓癌の適応が承認されたばかりの Gemcitabine を骨肉腫の治療へ使用できるかを検討し、報告し、(J Orthop Res 2005) 実際セカンドラインとして使用されている。ただ、副作用の軽減からは分子標的治療の開発は必須で、その候補として、我々は、腫瘍の増殖、転移と高凝固との関連性をターゲットにした新しい治療の可能性を検討した。一般に上皮系の高転移能を有する腫瘍では細胞表面に組織因子が低転移腫瘍株より過剰に発現しており、外因性凝固の過剰な活性化を認める。このように腫瘍周囲の微小環境では高凝固状態が保持されていると考え、その結果産生される Thrombin が治療のターゲットになると推測した。そこで、すでに静脈血栓症などで使用されている低分子容量ヘパリン (LMWH) を投与し、骨肉腫細胞の増殖抑制が可能な事を In vitro, In vivo で明らかにした (Cancer 2011、図 1)。



産生された Thrombin の受容体として Protease Activated Receptor (PAR)があり、その中でも PAR-1 が重要である。更に、PAR-1 のリガンドは Thrombin だけでなく、凝固因子 Xa、プラスミン、抗凝固因子の活性化 Protein C など多岐にわたり (Soh UJ et al, Br J Pharmacol 2010)、凝固系、線溶系で産生される様々なプロテアーゼからの刺激を受けることが可能と推測できる。

悪性黒色腫 (Villares GJ et al, Cancer Res 2009) や乳癌 (Yang E et al, Cancer Res 2009) では PAR-1 の発現自体が腫瘍の増殖、転移に重要であると報告されている。また、我々の予備実験においても骨肉腫細胞において、高肺転移 (Fig2 上段 143B cell) の方が親株 (Fig2 下段 TE85 cell) より PAR-1 の発現が多いことが分かっている。以上のような背景から上皮系腫瘍と同様に骨肉腫における PAR-1 のもつ増殖、転移誘導におけるメカニズムを解明することが新規肉腫治療の発展の第一歩になると考えている。



2. 研究の目的

本研究では大きく分けて、以下の 3 つを明らかにしたい。具体的には、

- (1) PAR-1 発現自体が肉腫細胞にもたらす影響
- (2) 各種 PAR-1 アゴニストによる細胞刺激性の比較
- (3) PAR-1 アンタゴニスト投与による骨肉腫細胞の増殖抑制、転移抑制について以下の実験を行い、検討する。

1) すでに我々は骨肉腫細胞に PAR-1 が発現している事を確認し、Flowcytometry (FCM) 法にて確認し、更には骨肉腫高転移株の方が低転移株に比べて発現が高いことが分かっている。例えば、高転移株 (すはなち高 PAR-1 発現株) の PAR-1 の遺伝子発現を抑制し、もとの細胞と比較することで PAR-1 自体が細胞をどのように調節しているかを明らかにする。

2) PAR-1 のアゴニストとしては Thrombin 以外にも、活性化 ProteinC、プラスミンなど多岐に渡る。ただ、これらにおいて PAR-1 の刺激部位がそれぞれ違うため、細胞応答性も違う可能性がある。これら多様なアゴニスト刺激において、細胞の増殖や様々なサイトカイン産生などを比較し、また NF- B、PI3K/AKT、MAPK に代表される細胞内伝達シグナルの違いも検討する。

3) ノードマウスを用いてヒト骨肉腫細胞を脛骨移植し、肺転移も起こすモデルをすでに確立している。また、その際の原発、転移巣に関してルシフェラーゼを用い、更に組織学的に評価を行う。

3. 研究の方法

- 1) 骨肉腫細胞における PAR-1 の発現と患者サンプル間での発現定量
骨肉腫細胞を培養し、mRNA レベルでの PAR-1 の発現を PCR 法で定量する。
タンパクレベルでの PAR-1 の発現を FCM 法で定量する。
ヒト骨肉腫手術検体を用いて、腫瘍組織における局在を免疫染色法にて確認し、その染色性と患者予後から、PAR-1 が予後マーカーとなりうるか検討する。
- 2) PAR-1 の発現抑制に際する細胞の Character の変化
siRNA を用いて PAR-1 をノックダウンし、これを FCM にて確認。
PAR-1 ノックダウンした細胞とコントロール細胞間での細胞増殖、Migration、サイトカイン産生の比較を行う。
- 3) PAR-1 アゴニスト刺激に際する細胞内シグナルを WB で検討
PAR-1 アゴニスト刺激を行い、30 分から 2 時間程度での NF- κ B、PI3K/AKT、MAPK のリン酸化を WB 法にて確認。
また、各アゴニスト間での活性化される経路の違いを WB にて確認。
- 4) 細胞内シグナルの阻害剤を使用した際の細胞増殖、サイトカイン産生の変化
3) で行った NF- κ B、PI3K/AKT、MAPK 経路に対する WB の結果を元にそれぞれの阻害薬を使用し細胞増殖やサイトカイン産生の変化を確認。
- 5) PAR-1 アンタゴニストによる細胞増殖、サイトカイン産生の変化を in vitro で確認
PAR-1 アンタゴニスト投与による、増殖抑制を MTT assay で、サイトカイン産生は上清を回収し ELISA により測定する
- 6) 担癌マウスモデルを使用し PAR-1 アンタゴニストによる抗腫瘍効果を in vivo で確認
骨肉腫細胞をマウス脛骨に移植し、担癌モデルマウスを作製する。治療群は、コントロール群、LMWH 群、PAR-1 アンタゴニスト群の 3 群で治療期間は 6~8 週間、1 週間隔で X 線撮影を行い骨病巣に対する効果判定を、また最終観察時に肺を摘出し、表面コロニーのカウントを行い肺転移への効果判定を行う。

4. 研究成果

- 1) 骨肉腫細胞における PAR-1 の発現と患者サンプル間での発現定量

種々の骨肉腫細胞を培養し、mRNA レベルでの PAR-1 の発現を PCR 法で確認した

タンパクレベルでの PAR-1 の発現を FCM 法で確認した。Fig3(左; TE85、右 143B) のように PAR-1 は骨肉腫細胞表面に発現していたが、発現程度に関しては様々であった。

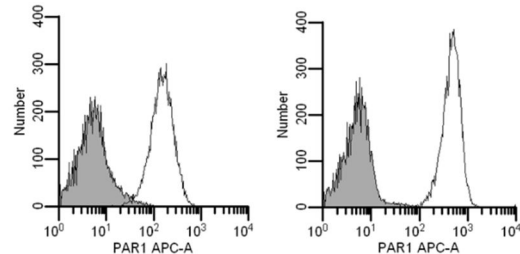


Fig3

ヒト骨肉腫手術検体を用いて、腫瘍組織における局在を免疫染色法にて確認し、その染色性と患者予後から、PAR-1 が予後マーカーとなりうるか検討した。当院で得られた骨肉腫患者サンプルを用いて、PAR-1 の発現を免疫組織学的に検討し、全例で発現を認めただものの、発現と転移などの予後の相関に関しては有意な差を認めなかった。これに関しては、今後症例数を増やすことと、同一患者での肺転移と原発での比較などを行う予定である。

- 2) PAR-1 の発現抑制に際する細胞の Character の変化

siRNA を用いて PAR-1 をノックダウンし、これを FCM にて確認する実験を行った。いくつかの会社の siRNA を購入したものの、その発現低下はあまり強くなかったため、以下の実験は PAR-1 のアンタゴニストである PZ128 を使用した。そのため 5) の部分はここで行うこととなりました。

PZ128 による細胞増殖を検討した。Fig4 のとおり、10 μ M から有意に細胞増殖が抑制された。

- 3) PAR-1 アゴニストである トロンピン 刺激に際する PZ128 の効果について細胞内シグナルの変化を WB で検討

トロンピン刺激で、10 分から NF- κ B、PI3K/AKT、MAPK のリン酸化を WB 法にて確認した。また、これらは PZ128 で抑制されることも確認した

- 4) 細胞内シグナルの阻害剤を使用した際の細胞増殖、サイトカイン産生の変化

3) で行った NF- κ B、PI3K/AKT、MAPK 経路に対する WB の結果を元にそれぞれの阻害薬を使用し細胞増殖やサイトカイン産生の変化を確認した。なお、サイトカイン産生は IL-8 を測定した。細胞増殖も IL-8 産生もそれぞれのシグナル阻害剤で抑制を認めた。また、PZ128 でも IL-8 産生は抑制されることを確認した。

- 6) 担癌マウスモデルを使用し PAR-1 アンタゴニストによる抗腫瘍効果を in vivo で確認

骨肉腫細胞をマウス脛骨に移植し、担癌モデルマウスを作製しました。ただ、肺転移に時間がかかりすぎたため、転移の有無は尾静脈投与により

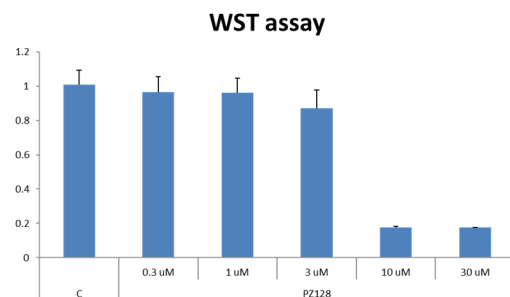


Fig4

効果判定を行い、また、原発もモデルは皮下に移植し、腫瘍計を測定しました。治療群は、コントロール群、PAR-1 アンタゴニスト (PZ128) 群の 2 群で治療期間は尾静注モデルは 3 週間、皮下モデルは 4 週間とした。この結果、3 週間の時点、肺転移の有意な抑制が確認された (Fig 5)。また、摘出した肺の重量を測定したが、これも PZ128 群で低下していた。その一方で、皮下移植により原発への効果を検討したが、有意な差は認められなかった。

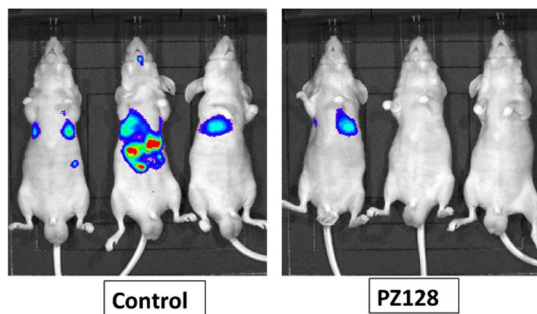


Fig5

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計 1 件)

1. Saito M, Ichikawa J, Ando T, Schoenecker JG, Ohba T, Koyama K, Suzuki-Inoue K, Haro H. Platelet-Derived TGF- β Induces Tissue Factor Expression via the Smad3 Pathway in Osteosarcoma Cells. *J Bone Miner Res.* (査読有) 2018 Nov;33(11):2048-2058. doi: 10.1002/jbmr.3537.

〔学会発表〕(計 7 件)

1. Saito M, Ichikawa J, et al. Platelet-derived TGF- β induces tissue factor expression via the Smad3 pathway in osteosarcoma cells. 65th Annual Meeting of Orthopaedic Research Society. 2019
2. 齋藤 正憲, 市川 二郎ら 血小板由来 TGF- β は smad3 を介して骨肉腫細胞の組織因子発現を誘導する. 第 33 回日本整形外科学会基礎学術集会. 2018
3. 市川 二郎, 齋藤 正憲ら 骨肉腫細胞における Smad3 を介した TGF- β による凝固、線溶系の調節. 第 91 回日本整形外科学会学術総会. 2018
4. 安藤 隆, 齋藤 正憲ら サルコペニア患者における筋芽細胞増加に向けた TSLP によるサイトカイン治療の開発. 第 91 回日本整形外科学会学術総会. 2018
5. 安藤 隆, 高山 義裕, 市川 二郎, 齋藤正憲ら TNF- α 刺激にてマウス筋芽細胞から産生される TSLP は TGF- β が NF- κ B 経路を抑制することにより減少する. 第 32 回日本整形外科学会基礎学術集会. 2017
6. 市川二郎, 安藤 隆, 佐藤 信隆, 大場 哲郎, 齋藤 正憲ら 骨肉腫ポドプラニンによる血小板凝集と活性化. 第 32 回日本整形外科学会基礎学術集会. 2017
7. 安藤 隆, 齋藤 正憲, 市川 二郎ら. 骨肉腫細胞の組織因子発現における TGF- β を介する血小板との相互作用. 第 32 回日本整形外科学会基礎学術集会. 2017

〔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：
 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：

国内外の別：

〔その他〕

ホームページ等

<https://yamanashi-orthop.com/>

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。