

令和 3 年 6 月 16 日現在

機関番号：13501

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2018～2020

課題番号：18K09060

研究課題名(和文) 肉腫と血小板の相互作用による増殖・転移誘導とその分子機構を標的とした治療法の開発

研究課題名(英文) Development of therapeutic methods targeting proliferation / metastasis induction by interaction between sarcoma and platelets and its molecular mechanism

研究代表者

市川 二郎 (Ichikawa, Jiro)

山梨大学・大学院総合研究部・講師

研究者番号：00456469

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,300,000円

研究成果の概要(和文)：本研究では、骨肉腫による血小板の凝集・活性化においてP2Y12が持つ役割と解明し、それを治療につなげることを目的とする。具体的には、骨肉腫と血小板との凝集・活性化におけるP2Y12阻害薬(チカグレロル)の効果、血小板活性化による骨肉腫の増殖・遊走・EMTへの影響、P2Y12阻害薬による新規治療の可能性について検討した。結果として、チカグレロルによる骨肉腫の凝集阻害効果を認めた。チカグレロルを血小板に添加することで、骨肉腫と共培養を行った際のサイトカイン放出の抑制を認めた。チカグレロルによる骨肉腫の転移抑制をマウスモデルで検討したが、転移の抑制は確認できなかった。

研究成果の学術的意義や社会的意義

今回の実験では骨肉腫細胞を用いて行うが、一般に骨軟部肉腫は50種類以上の異なる疾患の総称で、各々の分子細胞学的特徴は異なる。ただ、ほとんどの症例で予後決定因子は肺転移の有無である。この点から転移における血小板の役割を解明することは肉腫治療全体への応用が可能と考えられた。更に、P2Y12阻害薬はすでに心筋梗塞や血栓症への治療薬として承認されている。すなわち、我々の仮説が証明されれば、実臨床への還元の可能性が非常に高く、停滞して肉腫治療を大きく変えられると考えていた。結果からはP2Y12はターゲットとならなかったが、それ以外にも血小板活性化機構は存在するため今後更なる検討を行って行きたい。

研究成果の概要(英文)：The purpose of this study is to elucidate the role of P2Y12 in the aggregation and activation of platelets due to osteosarcoma, and to connect it to treatment. Specifically, (1) the effect of a P2Y12 inhibitor (ticagrelor) on the aggregation and activation of osteosarcoma and platelets, (2) the effect of platelet activation on the growth, migration, and EMT of osteosarcoma, and (3) the possibility of new treatment with a P2Y12 inhibitor. Was examined. In (1), ticagrelor was found to have an inhibitory effect on osteosarcoma aggregation. (2) By adding ticagrelor to platelets. Suppression of cytokine release was observed when co-cultured with osteosarcoma. (3) The suppression of metastasis of osteosarcoma by ticagrelor was examined in a mouse model, but the suppression of metastasis could not be confirmed.

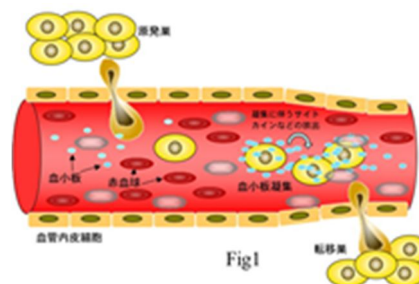
研究分野：骨軟部肉腫

キーワード：骨軟部肉腫 血小板 転移

1. 研究開始当初の背景

骨軟部肉腫は年間新規患者数が約 3000 人程度であるが、若年者の発症が比較的多く、化学療法不応例や初診時転移症例の予後は極めて不良である。骨軟部肉腫の中でも、骨肉腫は患者数も多く、10~20 代の未来ある若者の発症がほとんどであることから、新たな治療法が望まれている。しかし、新規抗がん剤や分子標的剤の登場はなく、化学療法のレジメンも変わらない。骨軟部肉腫の予後は肺転移の有無によって決まるため、腫瘍の増殖と共に肺転移を抑制できれば、大幅な予後改善が見込まれる。

以前より他の癌腫ではその血行性転移に血小板が促進的に働くとの報告がある。その機序としては 1) 血管内で腫瘍表面に凝集した血小板が活性化され、血管内のシエアストレスや免疫細胞の攻撃から腫瘍細胞を守る、2) 粘着した血小板が、腫瘍細胞に血管外浸潤の足場を提供する、3) 血管外浸潤後、転移巣にて活性化血小板から放出された増殖因子や血管新生因子により、腫瘍の転移が促進される、と考えられている (Fig.1)。また、活性化血小板より放出された顆粒内容が、原発巣の腫瘍に



Endothelial Mesenchymal Transition (EMT)を惹起し、転移を促進するという報告もある (Cancer cell. 2011;20:576-590)。この EMT は骨肉腫でも他の癌腫と同様に転移のステップに必須である (Cancer Res. 70:9483-93:2010)。

血小板上には、PAR、P2Y、GPIIb/IIIa を始めとした様々な受容体があり、それらを介して凝集や活性化が起こる。その中でも P2Y 受容体は ATP、ADP をリガンドとしており、それらの刺激で血小板から ATP を放出し、周囲の血小板を活性化させ、Paracrine としても作用するとして研究され、その中でも P2Y₁₂ は血小板に多く発現するため、その阻害薬が開発され、心筋梗塞、血栓症などの抗凝固薬として使用されている。卵巣がんのマウスモデルにおいて、P2Y₁₂ 阻害薬による、腫瘍の増殖・転移の抑制が唯一報告されている (Blood. 130:1235-42:2017)。また、膵癌では ATP が腫瘍の増殖・転移に促進的に作用するとの報告もある (Int J Cancer. 139:2540-52:2016)。以上の背景から、血小板 P2Y₁₂ を阻害することで、ATP を Key とした、血小板・腫瘍の活性化を抑制できると推測した。この仮説を証明すべく、血小板と骨肉腫細胞 (低転移株 TE85 と高転移株 143B) との凝集、活性化に関して予備実験を行った。その結果、凝集については高肺転移株 143B のみで起こり、血小板活性化に関しては放出サイトカインとしての TGF- β を測定したが、これも 143B との共培養で多いことが分かった。本研究で、血小板と肉腫の相互作用の詳細を解明し、血小板による骨軟部肉腫の増殖・転移の仕組みを明らかにすることが、停滞した肉腫治療を前進させる一歩となる。

2. 研究の目的

本研究では、骨肉腫による血小板の凝集・活性化において P2Y₁₂ が持つ役割と解明し、それを治療につなげることを目的とする。具体的には、

- 1) 骨肉腫と血小板との凝集・活性化における P2Y₁₂ 阻害薬の効果
 - 2) 血小板活性化による骨肉腫の増殖・遊走・EMT への影響
 - 3) P2Y₁₂ 阻害薬による新規治療の可能性
- について以下の実験を行い検討する。

上記 1) では、様々な骨肉腫細胞株と血小板凝集の有無を検討し、それに対する P2Y₁₂ 阻害薬の効果を確認する。上記 2) では、肉腫細胞と血小板の共培養モデルを用いて、1) と同様に P2Y₁₂ 阻害薬による血小板活性化の有無、また活性化上清による肉腫細胞への増殖、浸潤能の変化、EMT 誘導の有無を検討する。上記 3) では、マウスモデルにおける P2Y₁₂ 阻害薬投与による原発と転移への治療効果について検討する。

3. 研究の方法

- 1) 骨肉腫と血小板との凝集・活性化における P2Y₁₂ 阻害薬の効果

P2Y₁₂ 阻害薬として ticagrelor を用い、洗浄血小板に 30 分間 Preteat し、コントロール群、DMSO 群、Ticagrelor 群と種々の骨肉腫との凝集の有無を確認する。

ヒト骨肉腫細胞高肺転移株とヒトおよびマウスからの洗浄血小板を 30 分共培養ののち、遠心して得られた上清を ELISA に用いる。血小板活性の際に血小板顆粒中に含有する Platelet Factor-4 (PF-4) が特異的に放出されるので、PF-4 の測定で血小板活性の有無を確認する。

の実験において、血小板に と同様に、バッファー、DMSO、Ticagrelor を 30 分前に添加し、それぞれに高肺転移株を加え、やはり 30 分共培養を行い、上清中の PF-4 を測定する。

- 2) 血小板活性化による骨肉腫の増殖・遊走・EMT への影響

この実験では、1) で得られた上清を回収して行う。

血小板活性化ののち、放出されるサイトカインとして、PDGF、IFG、TGF- などが知られており、3群から得られた上清を用いてELISAで測定した。

血小板活性化による肉腫細胞の変化

A)細胞増殖への影響；96穴プレートに骨肉腫細胞を播き、1日待機する。FCSなしの培地に変更し、3群から得られた血小板活性化上清を添加する。培養後24時間、48時間、72時間でWSTアッセイにて細胞増殖の変化を見る。陽

B)浸潤能への影響；Boyden Chamberアッセイを用いる。上層には無血清条件で骨肉腫細胞を加え、下層には3群から得られた血小板活性化上清を加える。陽性、陰性コントロールはA)と同様にし、培養時間として6時間、12時間、24時間を設定し、膜の下側をクリスタルバイオレットで染色し、移動した細胞数を顕微鏡下に計測する。

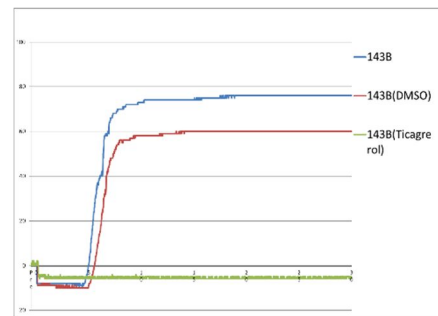
3) 血小板 P2Y12 をターゲットにした新規治療の可能性

ルシフェラーゼ遺伝子を導入した 143B を尾静注モデルを用いてその転移における Ticagrelor の効果を検討した。治療としては、Ticagrelor 群、DMSO 群の2群とする。1週、2週、3週時点でのルシフェラーゼアッセイにより治療効果判定を行う。また、治療中は血小板機能評価のため、2、4、6週で採血を行い、凝固能 (PT, APTT) 血小板数を測定する。副作用の有無に関しては毎週ごとに体重測定を行う。

4. 研究成果

1) 骨肉腫と血小板との凝集・活性化における P2Y12 阻害薬の効果

P2Y12 阻害薬として ticagrelor を用い、洗浄血小板に 30 分間 Preteat し、コントロール群、DMSO 群、Ticagrelor 群とヒト骨肉腫 143B との凝集の有無を確認した。その結果、Ticagrelor 投与により 143B により惹起された血小板との凝集が抑制された。(左図)



ヒト骨肉腫細胞高肺転移株とヒトおよびマウスからの洗浄血小板を 30 分共培養ののち、遠心して得られた上清を ELISA に用いる。血小板活性の際に血小板顆粒中に含有する Platelet Factor-4 (PF-4) が特異的に放出されるので、PF-4 の測定で血小板活性の有無を確認した。その結果、143B とヒト・マウス血小板との共培養で PF-4 の産生が上昇した。

の実験において、血小板に と同様に、バッファー、DMSO、Ticagrelor を 30 分前に添加し、それぞれに高肺転移株を加え、やはり 30 分共培養を行い、上清中の PF-4 を測定した。凝集の結果と同様に Ticagrelor 投与群で PF-4 の産生の低下を認めた。

2) 血小板活性化による骨肉腫の増殖・遊走・EMT への影響

この実験では、1) で得られた上清を回収して行う。

血小板活性化ののち、放出されるサイトカインとして、PDGF、IFG、TGF- などが知られており、3群から得られた上清を用いてELISAで測定した。PDGFを測定したが、143Bと血小板の共培養でその産生は上昇していたが、Ticagrelor投与で産生の低下を認めた。

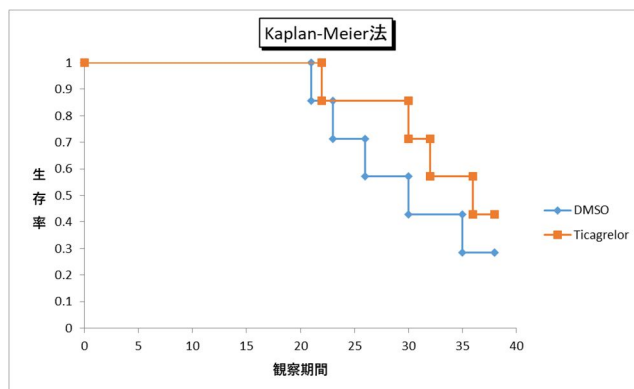
血小板活性化による肉腫細胞の変化

A)細胞増殖への影響；96穴プレートに骨肉腫細胞を播き、1日待機する。FCSなしの培地に変更し、3群から得られた血小板活性化上清を添加する。培養後24時間、48時間、72時間でWSTアッセイにて細胞増殖の変化を確認したが、Ticagrelorを加えた上清では加えない群と比較して細胞増殖が抑制されていた。

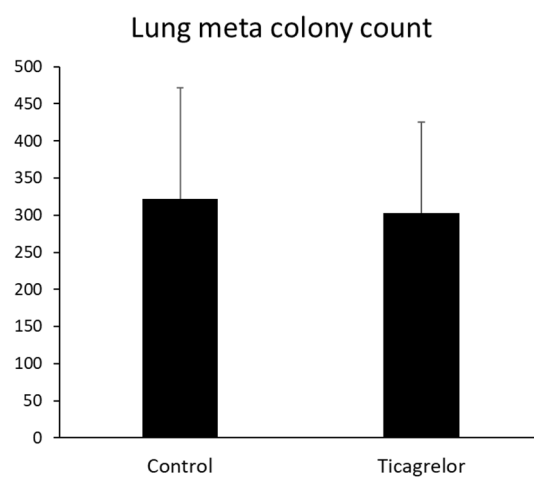
B)浸潤能への影響；Boyden Chamberアッセイを用いる。上層には無血清条件で骨肉腫細胞を加え、下層には3群から得られた血小板活性化上清を加える。その結果、細胞増殖と同様に、Ticagrelorを加えた上清では加えない上清と比較し移動した細胞数は低下していた。

3) 血小板 P2Y12 をターゲットにした新規治療の可能性

ルシフェラーゼ遺伝子を導入した 143B を尾静脈から注射するモデルを使用した。治療としては、Ticagrelor 群、DMSO 群の2群とする。ルシフェラーゼでの測定が不安定であったため、カプランマイヤーと、3週でと殺し肺のコロニーをカウントする方法の2つを用いて行った。まず、カプランマイヤーでの検討であるが、Ticagrelor 投与群の方が延長する感じであったが、有意差は認められな



った。次に3週時点での肺組織を摘出し、H&E染色を行い、顕微鏡下にコロニー数をカウントした。この結果も、Ticagrelor投与、DMSO投与の2群でコロニー数に有意差は認められなかった。また、この他にもTicagrelorにアスピリンを加えた群なども同様に行ったがやはり有意な差は認められなかった。



5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計2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 Jiro Ichikawa, Takashi Ando, Tomonori Kawasaki, Tomoyuki Sasaki, Toshiaki Shirai, Nagaharu Tsukiji, Yujiro Kimura, Kaoru Aoki, Keiko Hayakawa, Katsue Suzuki-Inoue, Masao Saitoh, Hiroataka Haro	4. 巻 35
2. 論文標題 Role of Platelet C-Type Lectin-Like Receptor 2 in Promoting Lung Metastasis in Osteosarcoma	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 J Bone Miner Res .	6. 最初と最後の頁 1738-1750
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1002/jbmr.4045	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 Tomonori Kawasaki, Takahiro Hasebe, Mikinao Oiwa, Keiji Sugiyama, Chisako Muramatsu, Shigeto Ueda, Akihiko Osaki, Jiro Ichikawa, Norihiro Teramoto, Yoshihiko Hoshida	4. 巻 69
2. 論文標題 Invasive carcinoma with neuroendocrine differentiation of the breast showing triple negative, large and basal cell-like features	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Pathol Int .	6. 最初と最後の頁 502-504
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1111/pin.12832	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	波呂 浩孝 (Haro Hiroataka) (10313264)	山梨大学・大学院総合研究部・教授 (13501)	

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------