

科学研究費助成事業 研究成果報告書

令和 6 年 6 月 17 日現在

機関番号：14401

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2021～2023

課題番号：21K07241

研究課題名(和文)悪性中皮腫におけるSdc4の発現意義の解明と新規治療法の開発

研究課題名(英文)Elucidation of significance of Sdc4 in malignant mesothelioma and development of novel therapy

研究代表者

柴田 理志 (Shibata, Satoshi)

大阪大学・大学院医学系研究科・特任講師(常勤)

研究者番号：00423153

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,200,000円

研究成果の概要(和文)：悪性中皮腫55例に対して抗Sdc4抗体を用いて免疫染色を行った結果、45例(81.8%)で中皮腫の細胞膜、細胞質、あるいは間質に、Sdc4蛋白の発現がみられたことから、Sdc4は悪性中皮腫の診断マーカーとなり得ることが明らかとなった。一方、これまで研究室の様々な実験で抗腫瘍効果を示した複数の核酸を作用させて、細胞増殖活性を指標にスクリーニングを行ったところ、多くの難治性癌に効果を示してきた miR-29b-1-5pの完全相補配列であるMIRTXが悪性中皮腫にも著効することが示された。本研究によって悪性中皮腫に対する診断マーカーや新規治療法を提示できたことは医学的に意義深いといえる。

研究成果の学術的意義や社会的意義

悪性中皮腫は、増加の一途を辿っており、極めて予後不良な悪性腫瘍である。治療法は化学療法が中心であるがその効果は乏しく、分子標的薬で有効なものは未だほとんどないこと、更に有用な分子マーカーが存在せず早期診断が困難であることが問題となっている。今回の研究により、悪性中皮腫に対する診断マーカーとしてSdc4が有用であること、更に治療法としてmicroRNAを利用する方法が有効であることを見出すことができ、医学的に重要な知見といえる。さらに治療法のない悪性中皮腫に対してMIRTXが新たな治療法となる可能性があることから、今後の臨床利用が待たれる。

研究成果の概要(英文)：Immunostaining of Sdc4 in 55 malignant mesothelioma patients was performed. Of them, 45 cases (81.8%) displayed a clear staining for Sdc4 at cytoplasm or cell membrane of mesothelioma cells, or in the tumor stromal area. The latter findings may suggest the presence of secreted type of Sdc4. On the other hand, MIRTX, a completely complementary sequence of miR-29b-1-5p exhibited the best prominent anti-tumor activity when assayed by the WST8 cell viability test among various siRNAs and microRNAs which have been tested in our laboratory. In conclusion, it is suggested from the present study that Sdc4 could be a useful diagnostic tool for the malignant mesothelioma and that MIRTX may be a powerful therapeutic option against malignant mesothelioma.

研究分野：核酸医薬、分子生物学

キーワード：Sdc4 悪性中皮腫 核酸医薬

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

希少癌である悪性中皮腫は、1990年代は死亡者数が500人程度であったが、2010年代には1500人程度になり増加の一途を辿っている。悪性中皮腫の80%以上がアスベスト曝露によるものとされ、平均して40年程度経過したのちに発症することから、今後数十年は増加を続けるであろうと予想されている。全国がんセンター協議会の生存率共同調査による病期別5年生存率は、期14.6%、期4.5%、期8.0%、期0.0%、といずれも他の悪性腫瘍と比べて極めて予後不良である。悪性中皮腫の多くは進行癌として発見されるため、化学療法が治療の中心となっているが、現状はシスプラチンとペメトレキセドの併用療法が唯一の化学療法であり、分子標的薬や免疫チェックポイント阻害剤などの臨床試験も進んでいるものの未だ有効なものはなく、新規治療薬の開発が切望されている。さらに、悪性中皮腫は有用な分子マーカーがなく、早期診断が困難であるという問題も抱えているため、診断マーカーの開発も必要である。

2. 研究の目的

我々はこれまで独自の「癌幹細胞研究モデル」を用いて大腸癌・膵癌の新規癌幹細胞遺伝子としてSdc4を見いだした。Public databaseでは、悪性中皮腫細胞株のSdc4 mRNA発現量は全癌種の中で3番目であり、我々が開発したSdc4標的核酸医薬・抗体医薬が悪性中皮腫細胞に対しても高い抗腫瘍効果を示すことが期待された。本研究では(1) Sdc4が悪性中皮腫の診断マーカーとなるのかを臨床サンプルを用いて検討する。(2) Sdc4を標的とした分子標的治療を行うことで治療ツールとしての有用性があるかどうかを評価する。以上2点を当初の目標としたが治療についてはSdc4のノックダウンでは不十分な可能性がみられたため、第3の目的として悪性中皮腫に効く新規治療剤の開発することを追加した。

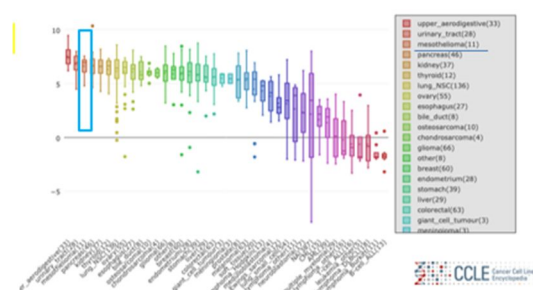
3. 研究の方法

- (1) CCLE public databaseによる悪性中皮腫の発現プロファイルを確認する。Sdc4ポリクローナル抗体(Sigma社)を用いて、悪性中皮腫の臨床サンプルにおけるSdc4の発現を免疫染色で調べる。
- (2) Sdc4に対するsiRNAを10種類作製し、最もノックダウン効率のよいものを選別する。悪性中皮腫細胞H28, MST0-211H, H2452, H2052にSdc4 siRNAを作用させ、細胞増殖活性を測定する。
- (3) 悪性中皮腫に特異的な癌幹細胞マーカーCD9, CD24, CD26の発現をFACSで調べる。
- (4) これまで教室で開発してきた核酸医薬(MIRTX, miR-23b-3p, miR-329-3p, miR-129-5p, miR-129-1-3p, miR-4711-5p, miR-136-5p)とSdc4-siRNA#6を用いて、悪性中皮腫細胞株に対する抗腫瘍効果を検討する。
- (5) ノードマウス皮下にMST0-211Hを移植し、MIRTXによるパイロット治療実験を行う。

4. 研究成果

(1) 悪性中皮腫におけるSdc4発現の検討

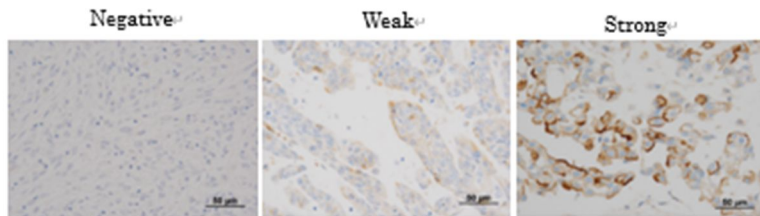
CCLE (DepMap: The Cancer Dependency Map Project at Broad Institute) によると悪性中皮腫のSdc4発現(図1)は全体の3位に位置し、RNAレベルでは高発現であることが分かる。



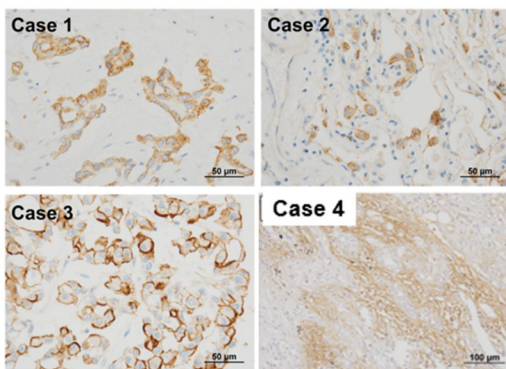
(図1) CCLEによると悪性中皮腫は全体の3位(左から3番目、青枠で囲んでいるところ)に位置した。

(図1) CCLEによると悪性中皮腫は全体の3位(左から3番目、青枠で囲んでいるところ)に位置した。

蛋白レベルでの Sdc4 発現を確認するために、悪性中皮腫の治療を受けた患者 55 例を対象として、Sdc4 蛋白の発現を大腸癌 22 例を陽性コントロールとして免疫染色で対比して検討した。Sdc4 は癌の細胞膜や細胞質、一部の症例では癌周囲の間質で高発現していた。間質での Sdc4 発現は細胞膜付近で離断された分泌型の Sdc4 蛋白が流出した可能性が考えられる。染色強度を Negative, Weak, Strong の 3 段階に分類して評価を行うと (図 2) 大腸癌では Negative 5 例 (22.7%)、Weak 7 例 (31.8%)、Strong 10 例 (45.5%)、悪性中皮腫では Negative が 10 例 (18.2%)、Weak が 12 例 (21.8%)、Strong が 33 例 (60.0%) という結果となり、大腸癌と同等以上に悪性中皮腫では Sdc4 蛋白の高発現がみられた。



(図 2) 悪性中皮腫患者の切除標本における Sdc4 蛋白発現：染色性によって 3 段階に分類した。スケールバー：50 μm。

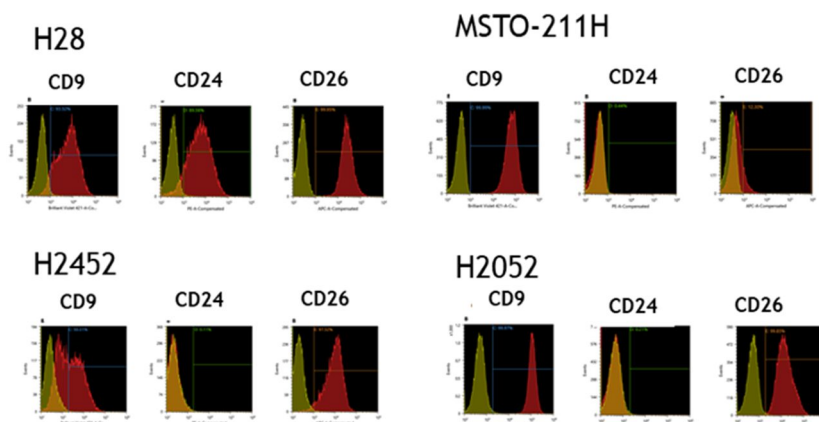


細胞膜 (Case 1-3) の他、細胞質 (Case 1,2)、間質 (Case 4) に Sdc4 蛋白の発現がみられる。スケールバー：Case 1-3: 50 μm, Case 4: 100 μm。

(2) Sdc4 ノックダウンによる悪性中皮腫細胞の増殖活性抑制効果の検討

Sdc4 に対する siRNA を 10 種類設計し、そのうち 3 つは強い遺伝子発現抑制効果を示した。最も強い遺伝子発現抑制効果を示した Sdc4 siRNA#6 を用いて 4 腫の細胞に 30nM、72 時間作用させた。MSTO-211H は実験条件によっては、増殖抑制がみられることもあったが、他の 3 株では Negative control siRNA と比べて有意な増殖抑制効果はみられなかった。

(3) 悪性中皮腫細胞の治療抵抗性に癌幹細胞性が関与しているかを検討した。4 種類の悪性中皮腫細胞はいずれも CD9 を高発現していた (図 3)。また MSTO-211H 以外の 3 株では、CD9 に加えて CD24、CD26 のいずれか、あるいは両方を高発現しており治療抵抗性が示唆された。



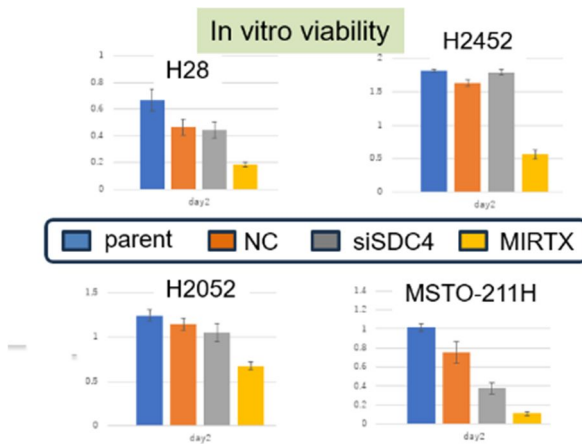
(図 3) 悪性中皮腫における癌幹細胞マーカーの発現をフローサイトメトリーで調べた。概して幹細胞性が高い細胞であることが分かった。

(4) 7種類の核酸医薬と Sdc4-siRNA #6、30nM を4種の悪性中皮腫細胞に transfection し、72時間後に WST アッセイで細胞増殖活性を調べた。miR-129-1-3p, miR-4711, miR-136-5p は2種類の細胞株の増殖活性を抑制したが、miR-29-1-5p の完全相補鎖である人工核酸 MIRTX は4種の細胞株の全ての増殖活性を抑制した(表1)。Sdc4-siRNA#6 と MIRTX を取り上げ、48時間で増殖活性を測定したところ、同様の結果を得た(図4)。

(表1) 中皮腫細胞に対する核酸の治療効果

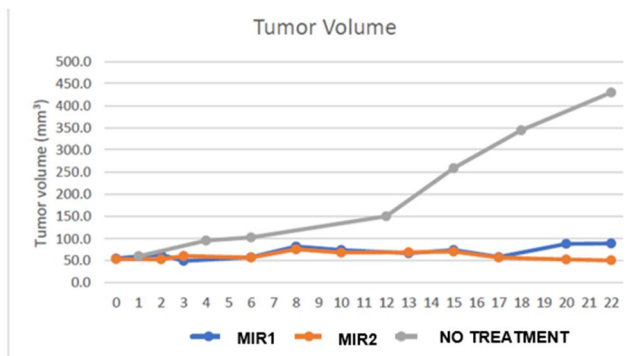
| WST-8 結果 | | Small RNA (microRNA, siRNA) | | | | | | | |
|----------|-----------|-----------------------------|--------|--------|--------|----------|---------|--------|------|
| | | MIRTX | 23b-3p | 329-3p | 129-5p | 129-1-3p | 4711-5p | 136-5p | SDC4 |
| 中皮腫細胞株 | H2452 | ◎ | ○ | × | × | × | × | × | × |
| | H2052 | ◎ | × | ○ | × | ◎ | ◎ | ◎ | × |
| | H28 | ◎ | × | × | × | × | × | ○ | × |
| | MSTO-211H | ◎ | × | × | × | ○ | ◎ | × | ○ |

30nM を作用させ、72時間後に WST アッセイで細胞増殖活性を測定した。◎ : NC と比べて増殖活性が低下し、有意差が $P < 0.01$, ○ : $P < 0.05$, × : 有意でない。



(図4)再実験。MIRTX は NC-siRNA に比べて4種の悪性中皮腫細胞株の増殖活性を低下させた。30nM を作用させ、48時間で WST アッセイを行った。Sdc4-siRNA は MSTO-211H 以外は無効であった。

(5) ノードマウス皮下に MSTO-211H を移植し、各群 50 mm³ に達してから MIRTX 50 microgram/shot を週3回静注した。無治療群に比べて、MIRTX を投与した2群では腫瘍の増大がみられなかった(図5)。



(図5) 悪性中皮腫 MSTO-211H に対するマウス治療実験。
MIR1: MIRTX 投与群
MIR2: MIRTX 投与群
No treatment: 無治療群
各群マウス4匹、1匹に2カ所腫瘍を移植した。NC-siRNA はほぼ無治療群(親株)と同程度の増殖性を示すことが分かっていることからここでは含んでいない。

(まとめ) 免疫染色による Sdc4 蛋白発現は悪性中皮腫の診断マーカーとなり得る。しかし、治療標的としては不十分であった。一方、多くの難治性癌に効果を示してきた人工核酸 MIRTX は悪性中皮腫にも著効する可能性が示唆された。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔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 | 山本 浩文 (Yamamoto Hirofumi) (30322184) | 大阪大学・大学院医学系研究科・教授 (14401) | |
| 研究分担者 | 横山 雄起 (Yokoyama Yuhki) (60615714) | 大阪大学・大学院医学系研究科・助教 (14401) | |
| 研究分担者 | 河原 邦光 (Kawahara Kunimitsu) (70755313) | 大阪大学・大学院医学系研究科・招へい教授 (14401) | |

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 |
|---------|---------|