

令和 6 年 5 月 28 日現在

機関番号：32666

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2021～2023

課題番号：21K09244

研究課題名(和文)肉腫微小環境を標的とした新規肉腫治療指針の開発

研究課題名(英文)Development of novel sarcoma treatment guidelines targeting the sarcoma microenvironment

研究代表者

菊地 克史(Katsushi, Kikuchi)

日本医科大学・大学院医学研究科・研究生

研究者番号：00602062

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)：プラスミノジェン活性化因子インヒビター1(PAI-1)は様々な悪性腫瘍患者の血液中あるいは腫瘍自体に高発現しており、その発現は腫瘍の悪性度と正の相関があることから、PAI-1はがん治療のターゲットとなりうる。本研究では、骨肉腫細胞様細胞であるU2OS細胞を用いて、細胞代謝に対する、低分子のPAI-1阻害剤TM5614の投与効果を解析した。我々は、TM5614処理によって、U2OS細胞においてG2-M arrestが誘導され増殖が抑制されること、p53とp21Waf1/Cip1の発現が増加すること、これらの効果は非腫瘍細胞であるヒト滑膜間葉系幹細胞では認められないことなどを明らかとした。

研究成果の学術的意義や社会的意義

我々は、PAI-1阻害剤TM5614がU2OS細胞のG2-M arrestを誘導することを示した。本研究の結果により、TM5614が骨肉腫治療の臨床転帰を改善する可能性が期待される。

研究成果の概要(英文)：Plasminogen activator inhibitor 1 (PAI-1) is highly expressed in the blood of patients with various malignant tumors or in the tumors themselves, and its expression is positively correlated with tumor grade. Therefore, PAI-1 is a potential target for cancer therapy. In this study, a small-molecule PAI-1 inhibitor, TM-5614, was tested on U2OS cells, which are osteosarcoma cell-like cells, to examine its effect on cell metabolism. The MTT assays and cell count analysis showed that TM5614 inhibited U2OS cell proliferation. We also tested the apoptotic activity of U2OS cells by multiple assays, and no induction of apoptosis by TM5614 was observed. In contrast, cell cycle analysis revealed that TM5614 induced U2OS cells in G2-M arrest. This study revealed that TM5614 treatment increased p53 and p21 Waf1/Cip1 expression in U2OS cells. In conclusion, we showed that the PAI-1 inhibitor TM5614 induced G2-M arrest in U2OS cells.

研究分野：薬理学

キーワード：U2OS osteosarcoma PAI-1 G2-M arrest

様式 C - 19、F - 19 - 1 (共通)

## 1. 研究開始当初の背景

### <背景>

骨肉腫は組織学的に腫瘍様の骨または類骨を形成する悪性腫瘍である。化学療法は骨肉腫の寛解を誘導するために不可欠であるが、正常細胞に対する毒性および腫瘍細胞による薬剤耐性の獲得のために、骨肉腫に対する化学療法が完全に有効であるとは言い難い。化学療法の導入により、初診時に遠隔転移のない患者の予後は劇的に改善したが、初診時に遠隔転移のある患者や治療後に再発・転移を起こした患者の予後は依然として不良である。そのため、毒性が低く、腫瘍細胞の薬剤耐性を回避できる抗がん剤や、抗がん剤の効果を増強する薬剤の開発が望まれている。

プラスミノゲン活性化因子インヒビター-1 (PAI-1) は、種々の悪性腫瘍患者の血中あるいは腫瘍自体に高発現しており、その発現は腫瘍の悪性度と正の相関がある。PAI-1 を欠損させた宿主マウスに悪性ケラチノサイトを移植すると、腫瘍の栄養血管新生と局所的な腫瘍浸潤が抑制される。PAI-1 はまた、線維肉腫の PI3K/AKT を活性化し、抗がん剤による攻撃から細胞を守る。以上より、PAI-1 は骨肉腫治療においても、治療標的となる可能性が考えられる。

## 2. 研究の目的

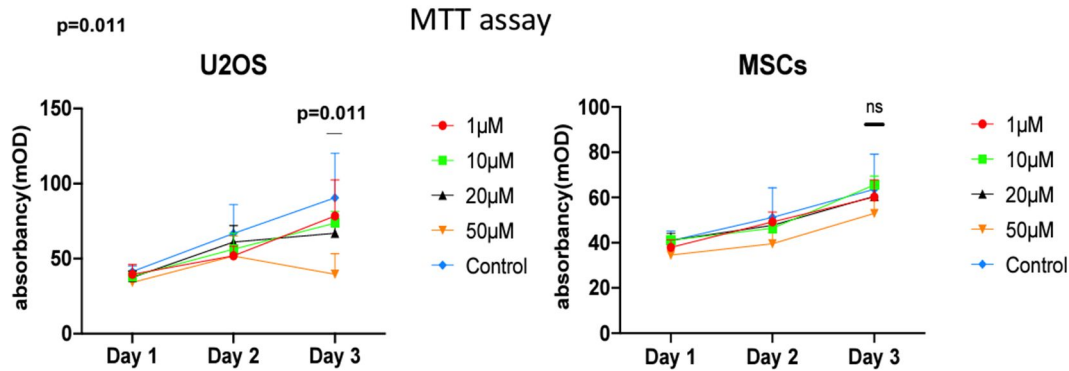
本研究は、これまでの成果を踏まえて、PAI-1 阻害剤 TM5614 が、肉腫細胞の増殖を阻害し、なおかつ抗がん剤の感受性を高め、肉腫の増殖や転移を抑制する新たな肉腫治療薬として応用できる可能性を検証した。ヒト骨肉腫細胞様細胞である U2OS 細胞を用いて、低分子製剤で経口投与可能な TM5614 の細胞代謝に対する影響を解析した。また、腫瘍細胞と非腫瘍細胞に対する効果を比較するために、ヒト滑膜間葉系幹細胞 (MSC) に対する TM5614 の効果も評価した。

## 3. 研究の方法

TM5614 は凍結乾燥粉末として琥珀色のガラスバイアルに入れ、4℃ で暗所に保存した。化合物は 50mM のストック濃度でジメチルスルホキシド (DMSO) に溶解し、-20℃ で保存し、in vitro 実験用に培地で希釈した。U2OS 細胞、およびヒト滑膜間葉系幹細胞 (MSC) を用い、TM5614 の投与効果を以下の方法により検証した。MTT アッセイと細胞数分析により、細胞増殖活性を評価した。TUNEL アッセイとカスパーゼ3 アッセイにより、アポトーシス活性を評価した。フローサイトメトリー法により、細胞周期を評価した。qPCR 法により、p53 と p21<sup>Waf1/Cip1</sup> の発現を解析した。

## 4. 研究成果

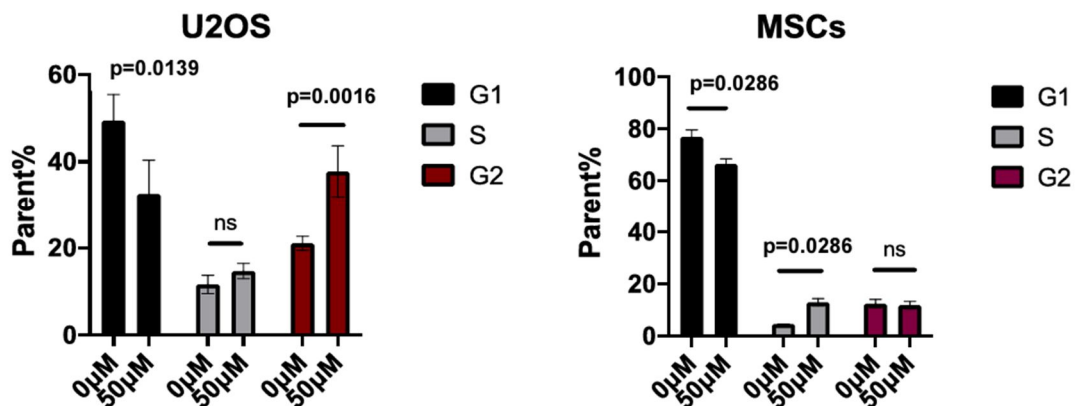
細胞増殖に対する TM5614 の効果とその濃度依存性を検証するために、U2OS 細胞を様々な濃度の TM5614 で処理し、MTT アッセイを行った。その結果、TM5614 は 50 μM で U2OS 細胞の増殖を抑制したが、MSC の増殖には影響を及ぼさなかった。以上の結果を元に、50 μM の TM5614 を用いて以下の実験を行った。



50  $\mu$ M の TM5614 または DMSO を MSC および U2OS 細胞に適用し、MSC および U2OS 細胞の細胞数を評価した結果、TM5614 投与群では、投与開始 3 日後に U2OS 細胞の増殖率が低下した。しかし、MSC ではこのような効果は見られなかった。

次にアポトーシス活性に対する活性を解析した。U2OS 細胞と MSC の両方において、6 時間、24 時間、72 時間後に活性化カスパーゼ 3 タンパクの発現増加は見られなかった。TUNEL 陽性細胞は、U2OS および MSC のいずれにおいても、TM5614 の添加によって増加することはなかった。

次に、ヨウ化プロピジウム (PI) で細胞を染色し、フローサイトメトリーで細胞の DNA 含量を測定することで、細胞周期に対する TM5614 の影響を評価した。50  $\mu$ M の TM5614 を U2OS に 24 時間投与すると、DMSO 投与群と比較して G2/M 期の細胞集団が増加し、それに伴って G1 期の細胞集団が減少した。この現象は、MSC を TM5614 で処理した場合には観察されなかった。



TM5614 処理後 72 時間までアポトーシス活性の上昇が U2OS で観察されなかったこと、および上記のフローサイトメトリーデータを考慮すると、G2 停止の誘導が、U2OS の増殖に対する TM5614 の阻害効果の少なくとも一部に寄与していることが示唆された。

TM5614 処理後の U2OS 細胞では、p53 と p21<sup>Waf1/Cip1</sup> の発現が有意に上昇したのに対し、MSC ではそれぞれの発現に変化は見られなかった。これらの結果は、TM5614 の効果が、少なくとも部分的には p53 および p21<sup>Waf1/Cip1</sup> の活性化によって媒介されることを示している。

本研究の結果により、TM5614 が骨肉腫治療の臨床転帰を改善する可能性が期待される。G2-M arrest 誘導の根底にある分子メカニズムを解明するために、我々は RNAseq 解析を進めている。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計1件（うち査読付論文 1件/うち国際共著 1件/うちオープンアクセス 1件）

1. 著者名 Anniwaer Gilinazi Tsuji Kunikazu Sato Shingo Miyata Toshio Okawa Atsushi Asou Yoshinori	4. 巻 70
2. 論文標題 PAI-1 inhibitor TM5614 leads osteosarcoma cells to G2 arrest	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 Journal of Medical and Dental Sciences	6. 最初と最後の頁 23 - 32
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.11480/jmds.700003	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 該当する

〔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	佐藤 信吾  (Sato Shingo)  (40462220)	東京医科歯科大学・医学部附属病院・講師    (12602)	
研究分担者	麻生 義則  (Asou Yoshinori)  (50345279)	東京医科歯科大学・大学院医歯学総合研究科・ジョイントリサーチ講座教授    (12602)	

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
---------	---------