

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 6 月 11 日現在

機関番号：17701

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2012～2014

課題番号：24592237

研究課題名(和文) 骨軟部腫瘍に対する新規遺伝子治療ベクターの開発 - GLI2をターゲットとして

研究課題名(英文) GLI2-targeted gene therapy for musculoskeletal tumors

研究代表者

永野 聡 (Nagano, Satoshi)

鹿児島大学・医歯(薬)学総合研究科・講師

研究者番号：50373139

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,000,000円

研究成果の概要(和文)：骨肉腫の細胞内シグナル伝達に重要なGLI2をターゲットとして、三酸化ヒ素(ATO)が骨肉腫細胞株の増殖を抑制することを明らかにした。ATOは白血病に対して承認された薬剤であり、早期の臨床応用が可能であると期待される。我々が開発したSurvivin依存性癌特異的増殖型アデノウイルス(Surv.m-CRA)の、通常治療抵抗性の横紋筋肉腫幹細胞への高い有効性を報告した。GLI2の標的遺伝子であるribosomal protein S3(RPS3)をノックダウンすると、骨肉腫の浸潤能・移動能が抑制された。また、Surv.m-CRAを用いた医師主導治験の準備を着実に進めており、今後の発展が期待される。

研究成果の概要(英文)：We showed arsenic trioxide targets GLI2, a crucial factor for intracellular signaling of musculoskeletal tumors, and suppressed growth of osteosarcoma cells. ATO is already approved for leukemia, therefore translation into clinical usage for osteosarcoma is anticipated. We also showed that Surv.m-CRA, a survivin-responsive conditionally-replicative adenovirus (CRA), exhibit strong antitumor activity to rhabdomyosarcoma stem cells. We found that ribosomal protein S3 is a target gene of GLI2 and its knockdown suppressed invasion and motility of osteosarcoma cells. We are preparing for clinical trial of Surv.m-CRA for musculoskeletal tumor patients, which is expected to further advance the research of gene therapy for musculoskeletal tumors.

研究分野：骨軟部腫瘍

キーワード：遺伝子治療 ヘッジホッグシグナル 骨軟部腫瘍

### 1. 研究開始当初の背景

骨肉腫は化学療法の進歩により生存率の向上が得られたものの、肺転移症例では予後は不良である。我々は以前から癌遺伝子治療研究を継続し、種々の癌をターゲットとする独自のウイルスベクターを開発した。

一方、我々は骨肉腫の細胞内シグナル伝達経路としてHedgehogシグナルの重要性を解明し、治療への応用を模索している。これまでの骨軟部腫瘍の細胞内シグナル伝達の研究成果 (GLI, Notch, GOLPH3 など) を、遺伝子治療研究に生かすことができれば、新たな分子標的治療、遺伝子治療の開発が可能と考えられる。

### 2. 研究の目的

骨肉腫に強く発現する GLI2 遺伝子のプロモーターを用いて、肉腫特異的な発現制御が可能が検証する。

GLI2 プロモーターに制御された増殖制御型アデノウイルスベクターを作製し、骨肉腫、その他の癌での治療効果を明らかにするとともに、臨床応用の可能性を検証する。

### 3. 研究の方法

(1) 骨肉腫特異的遺伝子発現を可能とするプロモーターの解析

骨肉腫細胞において GLI2 の転写調節を解析するために、過去に報告のある 8 × 3 Gli-BS- 51 配列の活性を解析。

(2) GLI2 をターゲットとした新規治療法としての三酸化ヒ素 (ATO) の効果解析

骨肉腫細胞において、ATO を投与後の GLI2 などの発現レベルの変化、細胞障害性を WST-1 アッセイで評価。細胞死のメカニズムを解析するために DNA 損傷を解析。骨肉腫移植モデルマウスでも ATO の効果を評価。

(3) 肉腫幹細胞に対する増殖制御型アデノウイルス (CRA) の効果解析

以前報告した横紋筋肉腫の幹細胞分離マーカーである FGFR3 を用いて cell sorting を行う。横紋筋肉腫幹細胞に対する Survivin 依存性 CRA (Surv.m-CRA) の効果を解析。

(4) GLI2 の骨肉腫転移能への影響解析

Microarray による GLI2 の下流にある遺伝子の検索。Hit した遺伝子の機能解析。

### 4. 研究成果

(1) 骨肉腫特異的遺伝子発現を可能とするプロモーターの解析

GLI2 の発現に依存した転写調節領域として 8 × 3 Gli-BS- 51 を発現するプラスミドを入手し、種々の正常細胞、骨肉腫細胞にトランスフェクションし、GLI2 の転写活性を評価した。通常の lipofection 試薬では導入効率が低く、転写活性の評価が不能。そこで electroporation を行ったところ導入が確認され、GLI2 の転写活性が種々の肉腫細胞で確認された。しかし活性が弱く、GLI2 特異的 CRA の作成には適さないと判断。

(2) GLI2 をターゲットとした新規治療法としての三酸化ヒ素 (ATO) の効果解析

骨肉腫細胞 143B、SaOS-2、HsOS1、U2OS において高発現する GLI2 が、ATO (1 μM) 処理により低下した。コロニー形成能においても ATO 処理により 143B、SaOS2 で抑制が得られた。DNA 損傷を解析するコメットアッセイにより、ATO は 143B 細胞に DNA 損傷を誘導していることが観察された。143B 移植モデルマウスに対し ATO 投与は腫瘍の増殖と生存率の延長を誘導した。

(3) 肉腫幹細胞に対する増殖制御型アデノウイルス (CRA) の効果解析

FGFR3 をマーカーとして KYM-1 細胞から横紋筋肉腫幹細胞 (RSC) を分離 (血清あり: 0.7~0.8%、血清なし: 7.4%)。Survivin の発現レベル、プロモーター活性は親細胞よりも RSC において有意に高値であった。Surv.m-CRA のウイルス増殖、抗腫瘍効果も親細胞よりも RSC に対して強いことを明らかにした。

(4) GLI2 の骨肉腫転移能への影響解析

Microarray 解析により、ribosomal protein S3 (RPS3) という蛋白が GLI2 の新たな標的遺伝子となっていることを見出した。RPS3 のノックダウンにより、骨肉腫の浸潤能・移動能が抑制された。この結果は GLI2 - RPS3 経路が骨肉腫の転移において重要な役割を持ち、RPS3 が新たな治療のターゲットとなることを示唆している。

### 5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文](計 10 件) 全て査読あり

1. Nagao-Kitamoto H, Nagata M, Nagano S, Kitamoto S, Ishidou Y, Yamamoto T, Nakamura S, Tsuru A, Abematsu M, Fujimoto Y, Yokouchi M, Kitajima S, Yoshioka T, Maeda S, Yonezawa S, Komiya S, Setoguchi T. GLI2 is a novel therapeutic target for metastasis of osteosarcoma. Int J Cancer. 2015 Mar 15;136(6):1276-84. doi:10.1002/ijc.29107.

2. Tsuru A, Setoguchi T, Matsunoshita Y, Nagao-Kitamoto H, Nagano S, Yokouchi M, Maeda S, Ishidou Y, Yamamoto T, Komiya S. Hairy/enhancer-of-split related with YRPW motif protein 1 promotes osteosarcoma metastasis via matrix metalloproteinase 9 expression. Br J

Cancer. 2015 Mar 31;112 Suppl:1232-40. doi:10.1038/bjc.2015.84.

3. Nagano S, Yokouchi M, Setoguchi T, Ishidou Y, Sasaki H, Shimada H, Komiya S. Differentiation of lipoma and atypical lipomatous tumor by a scoring system: implication of increased vascularity on pathogenesis of liposarcoma. *BMC Musculoskelet Disord*. 2015 Feb 22;16:36. doi: 10.1186/s12891-015-0491-8.

4. Nagao-Kitamoto H, Setoguchi T, Kitamoto S, Nakamura S, Tsuru A, Nagata M, Nagano S, Ishidou Y, Yokouchi M, Kitajima S, Yoshioka T, Maeda S, Yonezawa S, Komiya S. Ribosomal protein S3 regulates GLI2-mediated osteosarcoma invasion. *Cancer Lett*. 2015 Jan 28;356 (2 Pt B): 855-61. doi: 10.1016/j.canlet.2014.10.042.

5. Shimada H, Setoguchi T, Yokouchi M, Sasaki H, Ishidou Y, Kawamura I, Abematsu M, Nagano S, Komiya S. Metastatic bone tumors: Analysis of factors affecting prognosis and efficacy of CT and (18)F-FDG PET-CT in identifying primary lesions. *Mol Clin Oncol*. 2014 Sep;2(5):875-881. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4106751/>

6. Nagano S, Yokouchi M, Setoguchi T, Sasaki H, Shimada H, Kawamura I, Ishidou Y, Kamizono J, Yamamoto T, Kawamura H, Komiya S. Analysis of surgical site infection after musculoskeletal tumor surgery: risk assessment using a new scoring system. *Sarcoma*. 2014;2014:645496. doi: 10.1155/2014/645496.

7. Imamura K, Maeda S, Kawamura I, Matsuyama K, Shinohara N, Yahiro Y, Nagano S, Setoguchi T, Yokouchi M, Ishidou Y, Komiya S.

Human immunodeficiency virus type 1 enhancer-binding protein 3 is essential for the expression of asparagine-linked glycosylation 2 in the regulation of osteoblast and chondrocyte differentiation. *J Biol Chem*. 2014 Apr 4;289(14): 9865-79. doi: 10.1074/jbc.M113.520585.

8. Kakoi H, Maeda S, Shinohara N, Matsuyama K, Imamura K, Kawamura I, Nagano S, Setoguchi T, Yokouchi M, Ishidou Y, Komiya S. Bone morphogenic protein (BMP) signaling up-regulates neutral sphingomyelinase 2 to suppress chondrocyte maturation via the Akt protein signaling pathway as a negative feedback mechanism. *J Biol Chem*. 2014 Mar 21;289(12):8135-50. doi: 10.1074/jbc.M113.509331.

9. Tanoue K, Wang Y, Ikeda M, Mitsui K, Irie R, Setoguchi T, Komiya S, Natsugoe S, Kosai K. Survivin-responsive conditionally replicating adenovirus kills rhabdomyosarcoma stem cells more efficiently than their progeny. *J Transl Med*. 2014 Jan 27;12:27. doi: 10.1186/1479-5876-12-27.

10. Nakamura S, Nagano S, Nagao H, Ishidou Y, Yokouchi M, Abematsu M, Yamamoto T, Komiya S, Setoguchi T. Arsenic trioxide prevents osteosarcoma growth by inhibition of GLI transcription via DNA damage accumulation. *PLoS One*. 2013 Jul 8;8(7): e69466. doi: 10.1371/journal.pone.0069466.

〔学会発表〕(計 13 件)

1. 永野 聡, 小賤健一郎, 小宮節郎. 革新的癌治療薬を目指した増殖制御型アデノウイルスの独自開発から医師主導治験へ. 第29回日本整形外科学会基礎学術集会. 2014年10月10日, 鹿児島市

2. 瀬戸口啓夫, 小宮節郎 骨肉腫に対する Hedgehog シグナルをターゲットとした分子標的治療. 第 29 回日本整形外科学会基礎学術集会. 2014 年 10 月 10 日, 鹿児島市

3. 永田政仁, 永野 聡, 中村俊介, 北本宗子, 精松昌彦, 横内雅博, 石堂康弘, 瀬戸口啓夫, 小宮節郎. GLI2 による RPS3 発現を介した骨肉腫転移解析と臨床薬剤による阻害. 第 29 回日本整形外科学会基礎学術集会. 2014 年 10 月 9 日, 鹿児島市

4. 永田政仁, 鶴亜里紗, 小宮節郎, 瀬戸口啓夫. GLI2 と SMO 制御による骨肉腫転移能抑制の相乗効果解析. 第 73 回日本癌学会学術総会. 2014 年 9 月 25 日, 横浜市

5. 篠原直弘, 前田真吾, 篠原直弘, 横内雅博, 瀬戸口啓夫, 永野 聡, 小宮節郎. インプリンティング遺伝子 PEG10 は軟骨肉腫細胞株で過剰発現され TGF- $\beta$  ファミリー・シグナルの制御と低分化度に関連する. 第 73 回日本癌学会学術総会. 2014 年 9 月 25 日, 横浜市

6. 永田政仁, 瀬戸口啓夫, 北本宗子, 永野聡, 精松昌彦, 中村俊介, 横内雅博, 小宮節郎. GLI 転写を抑制する三酸化ヒ素と抗がん剤併用による骨肉腫増殖抑制効果. 第 47 回日本整形外科学会骨・軟部腫瘍学術集会. 2014 年 7 月 17 日, 大阪市

7. Nagano S, Yokouchi M, Shimada H, Nakamura S, Setoguchi T, Komiya S. Reduced surgical margins by using 18F-fluorodeoxyglucose positron-emission tomography-based planning for soft tissue sarcoma -Rationale and current clinical results. The 24th Japanese-Korean Combined Orthopaedic Symposium. 2014 年 6 月 6 日, 神奈川県

8. 中村俊介, 瀬戸口啓夫, 北本宗子, 永野聡, 精松昌彦, 小宮節郎. 三酸化ヒ素は GLI の転写を抑制し DNA 損傷を介して骨肉腫の増殖を阻害する. 第 28 回日本整形外科学会基礎学術集会. 2013 年 10 月 17 日, 千葉市

9. Nakamura S, Nagano S, Nagao H, Abematsu M, Yokouchi M, Ishidou Y, Komiya S, Setoguchi T. Arsenic trioxide prevents osteosarcoma growth by inhibition of GLI transcription via DNA damage accumulation. 第 36 回日本分子生物学会. 2013 年 12 月 4 日, 神戸市

10. 瀬戸口啓夫. 骨軟部肉腫に対する分子標的治療研究. 第 72 回日本癌学会学術総会. 2013 年 10 月 4 日, 横浜市

11. Setoguchi T, Nagano S, Komiya S. Functional

analysis of HEY1 in osteosarcoma metastasis. 第 71 回日本癌学会学術総会. 2012 年 9 月 21 日, 札幌市

12. 瀬戸口啓夫, 永野 聡, 横内雅博, 精松昌彦, 小宮節郎. GLI2 の骨肉腫転移・浸潤への機能の解析. 第 45 回日本整形外科学会骨・軟部腫瘍学術集会. 2012 年 7 月 15 日, 東京都

13. 中村俊介, 永尾宗子, 永野 聡, 精松昌彦, 小宮節郎, 瀬戸口啓夫. Hedgehog pathway の薬理的抑制によるヒト骨肉腫の増殖抑制効果. 第 45 回日本整形外科学会骨・軟部腫瘍学術集会. 2012 年 7 月 15 日, 東京都

〔図書〕(計 0 件)

〔産業財産権〕  
出願状況(計 0 件)

取得状況(計 0 件)

〔その他〕  
ホームページ等  
<http://www.orthop-kagoshima-u.com/>

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

永野 聡 (NAGANO SATOSHI)  
鹿児島大学・医歯学総合研究科・助教  
研究者番号: 50373139

### (2) 研究分担者

小宮 節郎 (KOMIYA SETSURO)  
鹿児島大学・医歯学総合研究科・教授  
研究者番号: 30178371

瀬戸口 啓夫 (SETOGUCHI TAKAO)  
鹿児島大学・医歯学総合研究科・特任准教授  
研究者番号: 40423727

小賤 健一郎 (KOSAI KENICHIRO)  
鹿児島大学・医歯学総合研究科・教授  
研究者番号: 90301663

(3) 連携研究者  
なし