

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 5 月 22 日現在

機関番号：13901

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2012～2014

課題番号：24791533

研究課題名(和文)細胞外マトリックス制御による骨軟部肉腫の分子標的治療薬増感法の開発

研究課題名(英文) Research for a sensitizer of molecular targeted therapy by a regulation of extra-cellular matrix in bone and soft tissue sarcomas

研究代表者

浦川 浩 (URAKAWA, Hiroshi)

名古屋大学・医学(系)研究科(研究院)・特任助教

研究者番号：60584753

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)：ヒアルロン酸(HA)は悪性腫瘍の成長、運動、浸潤において重要な役割を果たす。今回我々はMPNSTにおけるHA発現の予後への影響を調査した。多変量解析において腫瘍の大きさは全生存期間に影響し、HA発現と腫瘍の大きさは無病生存期間の予後因子であった。さらに、HA合成阻害剤の肉腫細胞株に対するHA発現、細胞外マトリックス、in vitroとin vivoにおける腫瘍原性への影響を調査した。MUは腫瘍増殖、運動、浸潤を抑え、同種移植モデルにおいて腫瘍成長を抑制し、組織におけるHA発現を減少させた。これらの結果は骨軟部肉腫におけるHAターゲット治療の分子標的薬増感作用の可能性を示唆するものであった。

研究成果の概要(英文)：Hyaluronan (HA) is known to have pivotal roles in the growth, migration and invasion of malignant tumors. We initially investigated the prognostic value of HA in patients with malignant peripheral nerve sheath tumors (MPNST). In multivariate analysis, large tumor size was an independent prognostic factor for overall survival, and HA expression and tumor size were independent prognostic factors for disease-free survival. We also investigated the effects of 4-Methylumbelliferone (MU) on bone and soft tissue sarcoma cell lines. MU treatment inhibited extra-cellular matrix, HA accumulation, cell growth, cell motility, and cell invasiveness. In vivo, administration of MU inhibited the tumor growth in isograft models of Rat chondrosarcoma cells. These data suggest that MU might be a therapeutic candidate for sarcomas via suppression of HA synthesis and accumulation. HA-targeting therapy may have potential as a sensitizer of molecular targeted therapy.

研究分野：整形外科学

キーワード：骨軟部肉腫 細胞外マトリックス ヒアルロン酸

1. 研究開始当初の背景

(1) 近年、骨軟部肉腫に対する抗がん剤治療成績は向上しておらず、骨肉腫に対しては抗がん剤治療が確立されているが、この30年近くめざましい治療成績の改善はみられない。軟部肉腫に対する抗がん剤治療もエビデンスに乏しく、強く推奨されるものではない。また抗がん剤感受性は同じ種の肉腫であっても症例によって異なる。Ewing肉腫や横紋筋肉腫といった抗がん剤感受性のある腫瘍と比較し、抗がん剤抵抗性を示す骨軟部肉腫の多くは不均一に構成された(heterogeneous)腫瘍であること、また細胞外マトリックスが豊富であることが大きな違いである。このheterogeneousな肉腫に対する治療成績向上には、オーダーメイドの抗がん治療の開発などが必要となるが、この細胞外マトリックスの制御を介した薬剤増感法は肉腫全体に応用が可能である。

(2) 近年、肉腫の領域においても Receptors/Growth factors (IGF1R, PDGFR, c-Kit など)、Intracellular signaling molecules (mTOR、SRK など)、Cell cycle/Apoptosis (TRAIL など)、Angiogenesis (VEGF など)など様々な標的分子をターゲットとした薬剤による clinical trial が行われている。ただ、一部の分子標的治療薬では有効性が報告されているが、肉腫の組織型などによってはその有効性が示されず、軟骨肉腫などでもその有効性が示されていない。分子標的薬においても、豊富な細胞外マトリックスが肉腫の薬剤抵抗性に関与している可能性があり、ヒアルロン酸を中心とした細胞外マトリックスの制御による抗腫瘍効果の研究を進展させ、細胞外マトリックス制御による分子標的治療薬増感効果法が開発されれば、幅広い種類の骨軟部肉腫に対し分子標的治療薬の応用が可能となる。

2. 研究の目的

(1) 最初に本研究は肉腫におけるヒアルロン酸発現の予後への影響をみるために、軟部肉腫の一種である悪性末梢神経鞘腫瘍(MPNST)におけるヒアルロン酸発現と予後との関係を検証した。

(2) 細胞外マトリックスの制御に焦点を当て、分子標的治療薬の効果増強を幅広い組織型の肉腫へ応用することを可能とするため、各肉腫細胞におけるヒアルロン酸ネットワークを明らかにすることを目的とした。今回はヒアルロン酸合成阻害薬 MU (4-Methylumbelliferone) の各肉腫株(ラット軟骨肉腫株 RCS、MPNST 株 sNF96.2) に対する効果を検証した。

3. 研究の方法

本研究では、がんと比較して細胞外マトリックス形成が豊富な骨軟部肉腫に関して、その細胞外マトリックス・細胞膜上受容体・細胞内シグナル伝達のネットワークを明らかにし、これらをターゲットとした抗がん剤感受性の新規増感法を確立するため、以下の方法で肉腫のヒアルロン酸ネットワークを検証した。

(1) 悪性末梢神経鞘腫瘍(MPNST)におけるヒアルロン酸発現と予後
MPNSTにおけるヒアルロン酸発現を評価した。患者から採取した神経線維腫の15組織とMPNSTの30組織のHABP(Hyaluronic acid binding protein)染色を行い染色性に依ってスコア化した。ヒアルロン酸合成酵素(HAS)1-3をMPNSTの22組織について免疫染色した。

(2) in vitro における各肉腫細胞株における細胞外マトリックス、ヒアルロン酸合成酵

素に対する影響

HABP 染色によるヒアルロン酸染色、Percuticle exclusion assay による細胞外マトリックス、MTT assay による増殖能、Boyden Chamber による運動能、Matrigel assay による浸潤能の評価をラット軟骨肉腫株 RCC と MPNST の細胞株 sNF96.2 において行った。

(3) ラット軟骨肉腫モデルにおけるヒアルロン酸合成阻害薬の影響

ラット軟骨肉腫の同種皮下移植モデルにおいて MU 投与(100mg/body/日、連日投与)を行い、腫瘍体積を評価した。

4. 研究成果

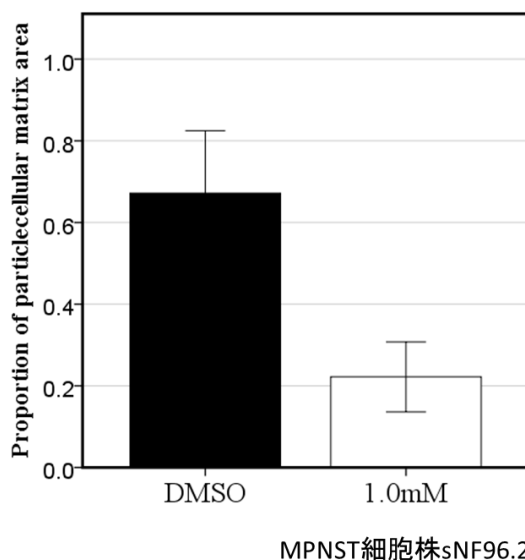
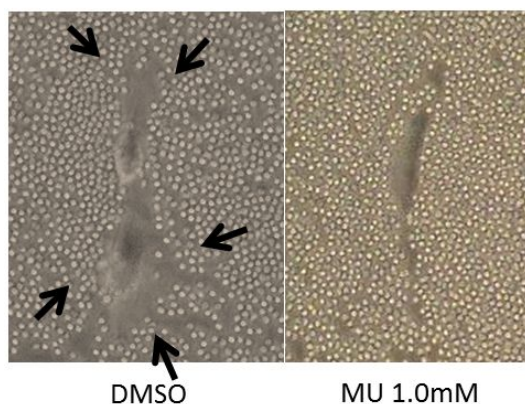
(1) 悪性末梢神経鞘腫瘍 (MPNST) におけるヒアルロン酸発現と予後

HABP 染色の陽性は神経線維腫よりも MPNST の方が多く見られた($P = 0.020$)。単変量解析でヒアルロン酸発現、年齢、神経線維腫症 1 型、腫瘍の大きさ、組織学的グレードが全生存における MPNST 患者における予後因子であり、一方、ヒアルロン酸発現、神経線維腫症 1 型、組織学的グレードは無病生存に関連した。ヒアルロン酸合成酵素 (HAS) 1-3 発現は全生存にも無病生存にも影響しなかった。多変量解析では腫瘍の大きさ($P = 0.022$)は独立した全生存への予後因子であり、ヒアルロン酸発現($P = 0.028$)と腫瘍の大きさ($P = 0.002$)は無病生存における独立した予後因子であった。In vitro においても神経線維腫細胞と比較してヒト MPNST 細胞はヒアルロン酸の高い染色性を認めた。以上の結果よりヒアルロン酸発現は MPNST と神経線維腫の鑑別に有用であり、無病生存と相関した。MPNST に対するヒアルロン酸をターゲットとした治療が期待された。

(2) ヒアルロン酸合成阻害剤 MU による軟骨肉腫のヒアルロン酸発現、細胞外マトリクスへの影響

HABP による染色では RCS 細胞に MU0.1mM と 1.0mM を加え 24 時間治療を行った後では control と比較してヒアルロン酸の染色性が低下した。さらに Percuticle exclusion assay においても MU の濃度依存性に細胞外マトリクスの面積の減少を認めた。sNF96.2 においても同様の結果であった (図 1)。

図 1 Particle exclusion assay (MU 治療後 48 時間)

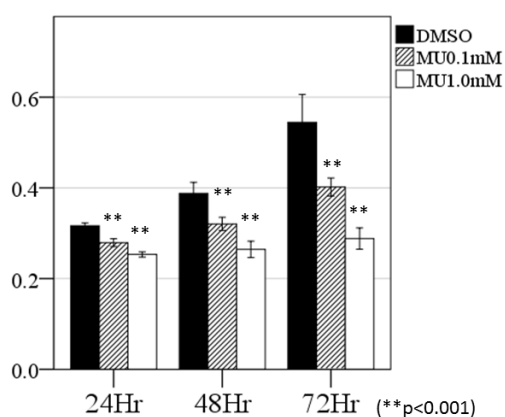


(3) ヒアルロン酸合成阻害剤による RCS 細胞の増殖能、運動能、浸潤能への影響
ヒアルロン酸合成阻害薬の MU を RCS 細胞

に 24、48、72 時間投与したところ、24、48、72 時間のすべてにおいて 0.1mM 以上の濃度で RCS 細胞の増殖を抑えた。1.0mM の MU では運動能を抑制し、0.1mM と 1.0mM の MU 投与では浸潤能を抑制した。sNF96.2 でも 24、48、72 時間のすべてにおいて 0.1mM 以上の濃度で MU は sNF96.2 細胞の増殖を抑え（図 2）、1.0mM の濃度で運動能と浸潤能を低下させた。

図2

Proliferation assay



MPNST細胞株sNF96.2

(4) MU 投与による HAS1-3mRNA 発現への影響

0.1mM、0.4mM、1.0mM の濃度の MU 投与における RCS 細胞における HAS1-3mRNA 発現への影響を 12 時間後に観察した。いずれの濃度においても HAS1-3mRNA 発現への影響は認めなかった。sNF96.2 では 12 時間の 1.0mM MU 治療で HAS2 と HAS3mRNA 発現が減少した。

(5) ラット腫瘍移植モデルにおける MU 投与への影響

RCS 細胞をラットの皮下に移植し、同系移植モデルを作成した。MU 投与(100mg/body/日、連日投与)により評価後 7 週より腫瘍増殖は MU 投与群で有意に抑制された($P < 0.05$) (図 3)。ヘマトキシリン-エオジン染色では

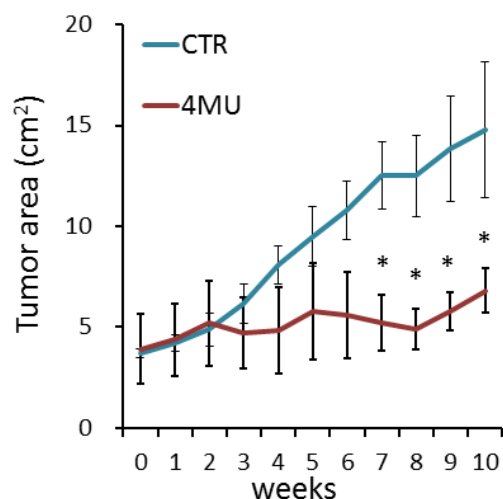
コントロールと MU 投与群における明らかな差を認めなかったが、HABP 染色において MU 投与ではヒアルロン酸の染色性が減少した。

図3

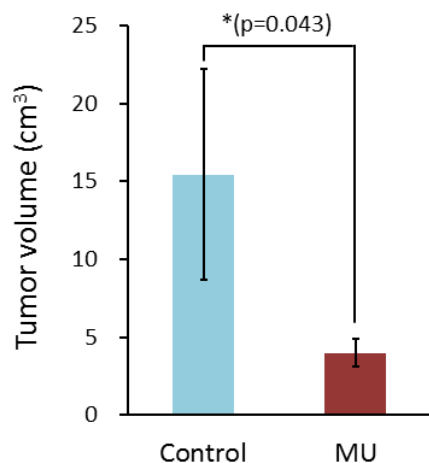
Inhibition of Isotransplantation tumor growth by MU

MU treated with 100mg / body / day

The change of tumor area



Tumor volume at 10 weeks



(* $p < 0.05$, ** $p < 0.01$)

ラット軟骨肉腫細胞株RCC

これらの結果より軟骨肉腫、MPNST の各細胞株において細胞外マトリックスおよびヒアルロン酸発現は細胞増殖、運動能、浸潤能に重要な働きを持っており、分子標的治療薬を含む肉腫治療の効果増強が期待された。

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 2 件)

Hyaluronan expression as a significant prognostic factor in patients with malignant peripheral nerve sheath tumors. Ikuta K, Urakawa H, Kozawa E, Arai E, Zhuo L, Futamura N, Hamada S, Kimata K, Ishiguro N, Nishida Y.

Clin Exp Metastasis.

2014 Aug;31(6):715-25. 査読有り

doi: 10.1007/s10585-014-9662-5.

Hyaluronan synthesis inhibitor supplements the inhibitory effects of zoledronic acid on bone metastasis of lung cancer.

Futamura N, Urakawa H, Arai E, Kozawa E, Ishiguro N, Nishida Y.

Clin Exp Metastasis.

2013 Jun;30(5):595-606. 査読有り

doi: 10.1007/s10585-012-9563-4.

[学会発表] (計 3 件)

ヒアルロン酸合成制御によるラット軟骨肉腫細胞の抑制効果の検討

濱田俊介, 浦川造, 新井英介, 小澤英史, 生田国大, 篠村多摩之, 石黒直樹, 西田佳弘

第 28 回日本軟骨代謝学会 2015.3.6-7

東京医科歯科大学鈴木章夫記念講堂

(東京都文京区)

Hyaluronan is a Useful Prognostic Marker and a Possible Therapeutic Target in Patients with MPNSTs.

Ikuta K, Futamura N, Urakawa H, Arai E, Kozawa E, Hamada S, Tsukushi S, Ishiguro N, Nishida Y.

2014 Annual Meeting of American Academy

of Orthopaedic Surgeons,

2014.3.11-15 New Orleans (USA)

Roles of hyaluronan as a significant prognostic factor and a potential therapeutic target in patients with malignant peripheral nerve sheath tumors.

Ikuta K, Futamura N, Urakawa H, Arai E, Kozawa E, Hamada S, Tsukushi S, Nishida Y.

9th International Conference on Hyaluronan, 2013. 6. 2-7 Oklahoma city (USA)

6 . 研究組織

(1)研究代表者

浦川 浩 (URAKAWA, Hiroshi)

名古屋大学・医学系研究科・特任助教

研究者番号 : 6 0 5 8 4 7 5 3

(2)研究分担者

なし

(3)連携研究者

なし

(4)研究協力者

西田 佳弘 (NISHIDA, Yoshihiro)

名古屋大学・医学系研究科・准教授

研究者番号 : 5 0 3 3 2 6 9 8

小澤 英史 (KOZAWA, Eiji)

名古屋大学・医学部附属病院・病院助教

研究者番号 : 6 0 6 3 5 5 7 2

生田 国大 (IKUTA, Kunihiro)

名古屋大学・医学部附属病院・医員

研究者番号 : 4 0 7 3 2 6 5 7

濱田 俊介 (HAMADA, Shunsuke)

名古屋大学・医学部附属病院・医員

研究者番号 : 9 0 7 4 7 2 8 9