

令和元年6月21日現在

機関番号：32620

研究種目：研究活動スタート支援

研究期間：2017～2018

課題番号：17H07098

研究課題名(和文) 高悪性骨軟部肉腫の脱リン酸化活性異常と新規治療法の開発

研究課題名(英文) Development of new therapy for high-grade sarcoma focused on dephosphorylation disorder

研究代表者

赤池 慶祐 (AKAIKE, KEISUKE)

順天堂大学・医学部・非常勤助教

研究者番号：60801719

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,100,000円

研究成果の概要(和文)：近年多くのがん種で、脱リン酸化酵素であるPP2Aの異常活性が、腫瘍悪性度と関連すると報告されている。胞巣型横紋筋肉腫の有するPAX3/FOXO1融合遺伝子に注目した網羅的タンパク質解析を行ったところ、PP2AのsubunitをコードするPPP2R1Aの変動を同定した。胞巣型横紋筋肉腫細胞株を用いたPPP2R1Aについての機能解析により、同因子が腫瘍増殖・悪性化に関与している事を同定した。更にPP2A賦活剤であるFTY720が胞巣型横紋筋肉腫細胞株へ抗腫瘍効果を示すことを見出した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究は、難治性の骨軟部肉腫に対して、生命予後の改善に貢献する新規治療法開発を進める臨床的意義の高い研究である。これまで分子標的治療薬の開発は主にリン酸化に関連する“kinase”に焦点が当てられてきたが、もう一つの中心である“Phosphatase”については基礎的な研究が後れを取っている。未だ予後不良である多数の骨軟部肉腫ではPP2Aを含んだ脱リン酸化異常についての報告はなく、本研究結果を基に既存のPP2Aを含んだ脱リン酸化賦活剤の臨床応用に成功すれば、新薬の開発を待つことなく生命予後が改善する事が期待され、骨軟部肉腫患者へ大きく貢献できる。

研究成果の概要(英文)：We performed proteomic analyses of Alveolar rhabdomyosarcoma (ARMS) to determine proteins profiles regulated by PAX3-FOXO1, and PPP2R1A was determined to play a critical functional role in the setting of ARMS. We also evaluated the function of PPP2R1A, suggesting that PPP2R1A still has a tumor suppressive function in ARMS cells and PPP2R1A is a negatively regulated by PAX3-FOXO1 in ARMS. In addition, the activation of PP2A - part of which was encoded by PPP2R1A - by FTY720 treatment in ARMS cell lines inhibited cell growth.

研究分野：骨軟部腫瘍

キーワード：高悪性骨軟部腫瘍 特異的融合遺伝子 網羅的タンパク質解析 胞巣型横紋筋肉腫 脱リン酸化酵素 P2A FTY720

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19、CK - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

近年の分子生物学の飛躍的な進歩に従い、上皮性悪性腫瘍・造血管腫瘍では、EGFR 遺伝子に代表される癌の発生・進展に直接的に重要な役割を果たす“driver-oncogene”が、分子治療の標的に成り得ると報告され、がん患者の生命予後は飛躍的に改善している。一方、高悪性度骨軟部腫瘍（骨軟部肉腫）領域においては、組織型毎に融合遺伝子を代表とした特異的遺伝子変異を有する事が報告され、腫瘍均一性や発生・悪性化の一端を担っていると考えられているが、現在まで明確な“driver-oncogene”や治療標的の発見が無く、依然予後不良のままである。軟部肉腫全般において VEGF 及び PDGF が高発現している事を背景として、チロシンリン酸化酵素 (Tyrosine kinase; TK) 阻害剤である Pazopanib (標的は VEGFR, PDGFR, c-Kit など) が唯一軟部肉腫に保険適応されているものの、組織型毎や“driver-oncogene”を考慮せずに、軟部肉腫に対して一律に Pazopanib を臨床応用した結果、生存改善効果について既に疑問が呈され、多数の副作用が生じるなどの問題も報告されている。これまで分子標的治療剤の開発は、主に“driver-oncogene”及び TK を含んだ“kinase”の異常活性を阻害する事に焦点が当てられてきたが、骨軟部肉腫領域の治療では、既存の方法とは全く異なるアプローチから、新たな抗がん戦略を見直す必要があった。

リン酸化・脱リン酸化は細胞内のシグナル伝達における主要な翻訳後修飾であり、前述の kinase のみならず、脱リン酸化酵素 (phosphatase) によって可逆的に調節されている。Protein Phosphatase 2 (PP2A) は細胞内の主要な Serine-Threonine phosphatase であり、細胞周期やアポトーシスを初めとした様々なシグナル伝達に関与し、がんの発生や悪性化のシグナル伝達を抑制している。PP2A は様々な AB₂C ヘテロ 3 量体を形成することで基質に対する特性を獲得しており、その活性は種々の翻訳後修飾や、細胞内に存在する PP2A 阻害因子 (SET, CIP2A, PME-1 等) により調節されている。近年、骨軟部肉腫を除く多くのがん種で、PP2A 阻害因子の発現上昇などにより PP2A 活性が低下し、悪性度や予後の悪さと相関する事が報告されている。申請者を含む研究グループは、既に高悪性軟部肉腫における PP2A 動態について研究を進めており、消化管間質腫瘍における PP2A 活性と腫瘍悪性度が関連する事を発見し、予後バイオマーカーとなり得る事を解明した (Toda-Ishii M, et al. Modern Pathology. 2016)。この様な背景より、骨軟部肉腫全般においても PP2A を含む脱リン酸化異常によるシグナル伝達系 (TK を含む) の異常活性化が、腫瘍発生・悪性度獲得に関与していることが推測され、これらが新規治療標的となる可能性があった。

2. 研究の目的

骨軟部肉腫患者の予後改善に向け、本研究では特異的融合遺伝子を有する骨軟部肉腫全般において、腫瘍発生・悪性化の原因と考えられる融合遺伝子発現と PP2A を含んだ脱リン酸化異常によるシグナル伝達系異常との関連を分析し、脱リン酸化酵素活性回復による抗腫瘍効果を解明する事を目的としている。このため、研究期間内に下記の達成を目標とする。

(1) 特異的融合遺伝子を有する軟部肉腫細胞株に対して、網羅的遺伝子・タンパク質発現解析などにより、遺伝子変動及び関連するネットワークについての各種プロファイリングを行い、発生・悪性化獲得に関連する因子を各レベルで同定する。

(2) 腫瘍発生・悪性化に関連する脱リン酸化異常因子が同定された場合は、腫瘍細胞株及び凍結腫瘍検体を用いた各種機能解析を進める。

(3) 軟部肉腫細胞株に対して、既存の脱リン酸化活性化賦活薬による抗腫瘍効果を確認し、脱リン酸化活性回復が治療標的となり得る組織型を決定する。

(4) 抗腫瘍効果が認められた組織型について網羅的リン酸化解析により、治療薬がターゲットとしている遺伝子変動及び関連するネットワークについてのプロファイリングを行い、発生・悪性化獲得に関連する因子を各レベルで同定する。

3. 研究の方法

高悪性度骨軟部肉腫患者の生命予後改善に向けて、本研究では、これまでの分子標的治療で焦点が当てられなかった「Phosphatase」に着目し、骨軟部肉腫における脱リン酸化異常によるシグナル伝達異常と高悪性度獲得に関する因子の解明を基に、新規治療法の開発を目指す。このゴールに向け、以下 ~ の目標を設定し、順次アプローチする。

(1) 骨軟部肉腫の組織型特異的融合遺伝子発現プロファイリング

概要：特異的融合遺伝子を有する複数の軟部肉腫細胞株に対して、網羅的遺伝子・タンパク質発現解析によりデータベースを構築し、それらデータに基づくネットワーク解析を行い、各種プロファイリングを作成する。

方法：Ewing 肉腫細胞株、胞巣型横紋筋肉腫細胞株、滑膜肉腫細胞株について、それぞれが有する EWS/FLI1, PAX3/FOXO1, SYT/SSX 融合遺伝子発現抑制を siRNA 導入により行い、各細胞株より RNA、タンパク質を抽出する。遺伝子発現は cDNA マイクロアレイ、タンパク質発現は

Isobaric Tag for Relative and Absolute Quantitation (iTRAQ)法を用いて、網羅的に解析する。また、がん遺伝子発現データベースである Oncomine によるデータマイニングや、Tomy digital biology 社の IPA によるネットワーク解析を行い、候補因子の絞り込みや、重要 pathway 及び上流因子を同定する。

(2) “Mitogenic-driver” としての機能解析

概要：(1)で同定された未知の腫瘍発生・悪性化に関連する脱リン酸化関連因子について、腫瘍細胞株において同定された因子の遺伝子抑制・導入を行い、各種機能解析を進める。また、凍結手術検体セット及び FFPE を用いて発現を検証し、臨床病理学的特徴との関連を解析する。

方法：同定された因子については、各細胞株において mRNA レベル、タンパク質レベルでの発現検証を行う。各組織型で同定された未知の腫瘍発生・悪性化に関連する因子について、腫瘍細胞株での遺伝子抑制・導入を行い、細胞増殖、浸潤、遊走、細胞死について評価する。②腫瘍凍結検体から DNA, RNA, タンパク質抽出を行い、腫瘍部・正常部間での悪性化関連因子発現を(1)と同様の手法にて比較解析する。また、FFPE を用いた各種免疫染色発現を行い、臨床病理学的素因と共に総合的に解析する。

(3) 悪性骨軟部肉腫における脱リン酸化活性回復による抗腫瘍効果の検証

概要：これまで他がん種で抗がん効果の報告がある脱リン酸化酵素活性賦活剤である PP2A 阻害因子抑制薬について、骨軟部肉腫における PP2A 活性回復による新規治療標的の可能性を探る。具体的には、各細胞株において薬剤投与による PP2A 活性回復下での機能解析を行い、脱リン酸化活性回復が治療標的となり得る骨軟部肉腫の組織型を決定する。

方法：骨軟部肉腫細胞株を用いて、PP2A 阻害因子抑制薬投与下に(2)-と同様の手法を用い、薬剤奏功性への観察を進める。

(4) 網羅的リン酸化解析による脱リン酸化異常によるシグナル伝達と腫瘍発生・悪性化に関する因子の同定

概要：PP2A 阻害因子抑制薬に著明な抗腫瘍効果を示した組織型では、脱リン酸化活性に関わる生物学的な特徴をプロファイリングするために、網羅的なリン酸化発現データベースの構築を行う。特に、PP2A ががん抑制因子として関与が報告されている Ras/MAPK cascade における Akt 及び ERK1/2 発現について解析を行い、各組織型での脱リン酸化酵素活性回復による治療奏功機序を解明する

方法：PP2A 阻害因子抑制薬処理を行った各細胞株のタンパク質を抽出する。処理前後での各サンプルについて、Proteome Profiler Human Phospho Antibody Array Kit を用いて、網羅的なリン酸化発現解析をする。

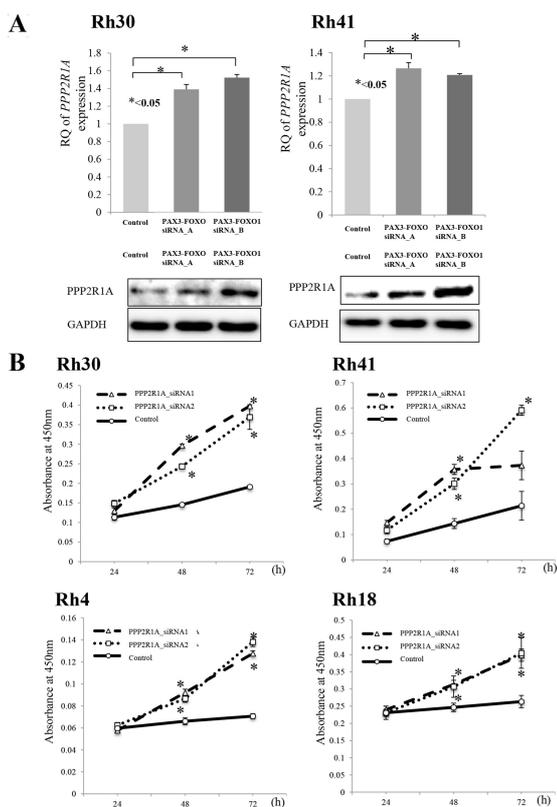
4. 研究成果

(1) 骨軟部肉腫の組織型特異的融合遺伝子発現プロファイリング

各特異的融合遺伝子発現抑制株について、コントロール群と比較してそれぞれ約 1300-2400 個のタンパク質変動が観察された。得られたデータの中で、2 つ以上の融合遺伝子発現抑制細胞株で有意に発現が変動している因子を絞り込んだ。更に、Oncomin 及び IPA データベースを用いたデータマイニングを行い、最終的に、特異的融合遺伝子によって制御され、腫瘍の発生・悪性化に重要な役割を果たすと予想されるタンパク質候補が、それぞれ数十個同定された。中でも、複数の胞巣型横紋筋肉腫細胞株における PAX3-FOXO1 融合遺伝子抑制において、PP2A の足場となる A サブユニットをコードする遺伝子である PPP2R1A の有意な変動が明らかとなった。ユーイング肉腫細胞株、滑膜肉腫細胞株においては、脱リン酸化酵素に関連する因子の有意な変動は認められなかった。

(2) “Mitogenic-driver” としての機能解析

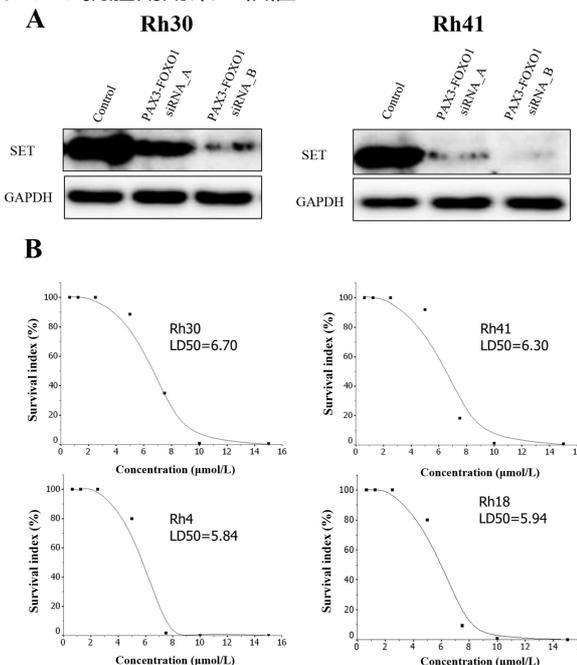
PAX3-FOXO1 融合遺伝子を有する各胞巣型横紋筋肉腫細胞株細胞株(Rh4, Rh18, Rh30, Rh41)を用いて発現検証を行った所、PAX3-FOXO1 融合遺伝子発現抑制により細胞増殖が抑制され、また各抑制細胞株において real time-PCR 法による mRNA レベル(右図 A)、及び Western blotting 法によるタンパク質レベル(右図 B)で PPP2R1A



発現の上昇が認められた。続いて、各胞巣型横紋筋肉腫細胞株において、PPP2R1A についての各種機能解析を行ったところ、siRNA による PPP2R1A 発現抑制により、有意な細胞増殖能が亢進する事を明らかにした。このことから、胞巣型横紋筋肉腫において、PPP2R1A 発現が腫瘍抑制性に働いていることが示唆された。

(3) 悪性骨軟部肉腫における脱リン酸化活性回復による抗腫瘍効果の検証

過去の報告より、PP2A 阻害因子である SET の発現が高度な腫瘍において、SET 抑制効果のある FTY720 が PP2A 活性を再活性化する事で、抗腫瘍効果を示す事が示されている。そこで、我々はまず各胞巣型横紋筋肉腫細胞株において、野生型では SET 発現が高度である事を確認した。また、PAX3-FOXO1 融合遺伝子抑制により、有意に SET 発現が低下する事を見出した（右図 A）。このことから、PAX3-FOXO1 融合遺伝子発現が、SET 発現に影響を与えている事が示唆された。その結果を踏まえ、各胞巣型横紋筋肉腫細胞株において FTY720 による抗腫瘍効果を検証した所、濃度依存性に腫瘍増殖が抑制されることを明らかにした（右図 B）。この事から、FTY720 が胞巣型横紋筋肉腫における新たな治療手段となり得る事が見いだされた。



(4) 網羅的リン酸化解析による脱リン酸化異常によるシグナル伝達と腫瘍発生・悪性化に関する因子の同定

胞巣型横紋筋肉腫において、FTY720 により活性化されるシグナルパスウェイにつき、39 種のタンパク質におけるリン酸化を網羅的に検証したところ、eNOS, AKT1/2/3, RSK1/2/3 及び STAT3 のリン酸化発現が FTY720 投与により有意に低下していた。これら因子は過去の報告で胞巣型横紋筋肉腫の腫瘍増殖・悪性化に関与している事が報告されており、FTY720 による胞巣型横紋筋肉腫の抗腫瘍効果機序が示唆された。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計 1 件)

Akaike K, Suehara Y, Kohsaka S, Hayashi T, Tanabe Y, Kazuno S, Mukaiyama K, Ishii M, Okubo T, Hayashi Y, Takamochi K, Takahashi F, Kaneko K, Ladanyi M, Saito T. PPP2R1A regulated by PAX3/FOXO3 fusion contributes to the acquisition of aggressive behavior in PAX3/FOXO1-positive alveolar rhabdomyosarcoma. (Oncotarget, 9(38), 25206, 2018) (1 番目 14 名 / 査読:有)

〔学会発表〕(計 1 件)

赤池 慶祐、PAX3/FOXO1 融合遺伝子発現のプロテオーム解析に基づいた胞巣型横紋筋肉腫における悪性度制御機構の解明、第 106 回日本病理学会総会、2017

6. 研究組織

(1)研究分担者
該当なし

(2)研究協力者
研究協力者氏名：齋藤 剛
ローマ字氏名：(SAITO, tsuyoshi)

研究協力者氏名：末原 義之
ローマ字氏名：(SUEHARA, yoshiyuki)

研究協力者氏名：林 大久生
ローマ字氏名：(HAYASHI, takuo)

研究協力者氏名：栗原 大聖
ローマ字氏名：(KURIHARA, taisei)

研究協力者氏名：佐野 圭
ローマ字氏名：(SANO, kei)

科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属されます。