

平成 30 年 6 月 4 日現在

機関番号：17102

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2015～2017

課題番号：15K10449

研究課題名(和文) 骨髄間質細胞を標的とした、悪性骨軟部腫瘍の新規治療法の開発

研究課題名(英文) Development of new therapy for malignant bone and soft tissue tumor by targeting bone marrow stromal cells

研究代表者

松本 嘉寛 (Matsumoto, Yoshihiro)

九州大学・医学研究院・准教授

研究者番号：10346794

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,600,000円

研究成果の概要(和文)：系統的化学療法導入により原発性悪性骨軟部腫瘍(以後、肉腫)の予後は改善したが、進行例の予後は極めて不良である。本研究では、肉腫細胞および、肉腫周囲の腫瘍間質細胞の中で、特に骨髄間質細胞(Bone marrow stromal cells: BMSC)に焦点をあて、肉腫の新規治療法の開発をめざした。その結果、Ewing肉腫とBMSCの異種細胞間接着や骨転移に、Cad-11が重要な役割を果たしている事、滑膜肉腫の分子標的薬 Pazopanib(PAZ)の耐性化にはErk情報伝達系が関与し、Erk阻害剤によりPAZ耐性が克服されることを確認した。

研究成果の概要(英文)：The clinical prognosis of localized malignant bone and soft tissue tumors are improved by systemic chemotherapy. However, the prognosis of the advanced cases of those tumors remains dismal. In this study, we investigated the roles of bone marrow stem cells (BMSC), as well as tumor cells, in the tumor biology of malignant bone and soft tissue tumors. We found that, in Ewing's sarcoma, cadherin-11 on BMSC regulated the bone metastasis of Ewing's sarcoma cells. We also proved that, in synovial sarcoma, the activation of Erk pathway was critical for the drug resistance for pazopanib, a multi-kinase inhibitor.

研究分野：整形外科

キーワード：骨軟部腫瘍 骨髄間質細胞

## 1. 研究開始当初の背景

骨肉腫(Osteosarcoma: OS), Ewing 肉腫(Ewing's Family of Tumor: EFT)などに代表される肉腫は、若年者に好発する極めて悪性度の高い腫瘍である。近年の系統的化学療法導入により、飛躍的な生存率の向上が得られているが、化学療法の奏功しない例、遠隔転移を来した症例(進行例)では、**集学的治療にも関わらず依然予後は極めて不良**で、臨床上大きな問題となっている。

我々は1980年代より、肉腫の悪性化進行機序について系統的に解析を行ってきた。これまでにOS、EFT、軟骨肉腫における**化学療法への耐性化機序を解明**し、新規治療法の開発を行うと同時に、転移の重要性にも以前から注目し、**肉腫細胞の基底膜浸潤・転移機序**についての検討を継続している。

腫瘍組織は腫瘍細胞に加え、血管内皮細胞、炎症細胞 (Tumor associated macrophage:TAM)、線維芽細胞 (Carcinoma associated fibroblast:CAF)といった間質細胞が存在し、それらを取り巻く細胞外基質からなる腫瘍間質が、腫瘍細胞と複雑に相互作用することで、その悪性化が修飾される(図1)。我々は、TAMとEFT細胞が相互作用しEFT細胞の増殖や浸潤能を亢進させることを世界に先駆けて報告している。(Fujiwara et al. Am J Path 2011)また、間質細胞のなかでも、骨髄内の主要な間質細胞である骨髄間質細胞(Bone marrow stromal cells: BMSC)は、様々なGrowth factorを産生することや、白血球細胞の薬剤耐性化、幹細胞性維持などに関与していることが報告されている。しかしながら、**BMSCの肉腫の転移、薬剤耐性化などに果たす役割**については基礎研究、臨床研究ともに**ほとんど知見がない**。

## 2. 研究の目的

本研究では、肉腫周囲の腫瘍間質細胞の中で、特に**骨髄間質細胞(Bone marrow stromal cells: BMSC)**に焦点をあて、肉腫の悪性化におけるBMSCの役割を解明するとともに、BMSCを標的とした新規治療法の開発をめざす。

## 3. 研究の方法

### 1. 腫瘍細胞の運動能におけるBMSCの役割

BMSCの培養上清(Conditioned medium:CM)によって肉腫細胞の運動能が亢進するかどうかについて解析する。亢進が認められた場合は、そのメカニズムを解析する。

### 2. 腫瘍細胞の細胞間接着におけるBMSCの役割

BMSCと肉腫細胞が直接に接着可能であることを確認、媒介している接着分子を同定する。BMSC、複数の肉腫細胞に発現していることが確認されている**Cadherin-11 (Cad-11)などが候補分子**として考えられ、予備実験により既に

有望な結果が得られているため、研究を進めた。

### 3. 腫瘍細胞の骨髄での薬剤耐性化におけるBMSCの役割

肉腫細胞株とBMSCを共培養した上で、各種抗腫瘍薬を投与、肉腫細胞の薬剤耐性化の解析を行う。BMSCによる肉腫細胞の耐性化メカニズムを分子細胞生物学的手法を用いて解析する。

### 4. 前臨床レベルにおけるBMSCを標的とした治療法の開発

上記にて実験的に得られた結果を、動物モデルや生検時、切除後、および転移巣などの臨床検体を用いて検証する。免疫染色と共に、Laser micro dissection法により腫瘍細胞、BMSCを別個に検体より採取することで、高い精度での解析が可能となる。また、動物モデルにおいて、抗腫瘍薬の投与、本研究で得られた分子標的の機能を阻害する治療を同時に行い、早期の臨床応用への基盤確立を目指す。

## 4. 研究成果

(1) 代表的な悪性骨腫瘍であるEwing肉腫は効率に骨/骨髄へ転移し、患者の予後を悪化させる。また、Cadherin-11(Cad-11)はカドヘリンファミリーの接着因子でBMSCに高発現することが知られており、前立腺癌や乳癌患者ではその発現が骨転移に関連していることが示唆されている。Ewing肉腫におけるBMSCの役割について検討した。

その結果、**Ewing肉腫細胞株とBMSCの異種細胞間接着に、Cad-11が重要な役割を果たしている事**を見いだした。また、Cad-11はEwing肉腫細胞株の運動能を正に制御していることも明らかにした。In vivoにおいてマウス骨転移モデルで、Cad-11の発現抑制により骨転移が低下していた。さらに、Ewing肉腫患者において、Cad-11の高発現は骨転移と正相関し、多変量解析においても有意な予後不良因子の一つであった。

これらの結果より、Cad-11は、Ewing肉腫の骨転移を促進している可能性が高く、Ewing肉腫の骨転移治療における有望な分子標的になりうると考えられた。この成果はすでに「Cadherin-11 regulates the metastasis of Ewing sarcoma cells to bone」(発表論文2)として論文発表され、国内外で高い評価を得ている。今後はCad-11阻害によるEwing肉腫の骨転移治療実験も準備中であり、研究計画は順調に遂行されたと考えられる。

(2)次に、腫瘍細胞そのものに焦点をあて、代表的な軟部肉腫である、滑膜肉腫の薬剤耐性機構について、検討をすすめた。

Multi-kinase阻害薬であるpazopanib (PAZ)は肉腫における初めての分子標的治療として承認され、軟部肉腫の2nd-line chemotherapyの有効な手段となっている。しかし、PAZが初期に有効であっても、投与が長期化するにつれ

徐々に耐性化する例があり、新たな問題が生じている。そこで、滑膜肉腫細胞株のPAZ耐性株をいち早く樹立し、その耐性化メカニズムの検討を行った。その結果、PAZは親株の細胞周期をG1/S期で停止させること、耐性株ではErk情報伝達系が活性化され、G1/S期停止が回避されていることを見いだした。さらに、Erk阻害剤によりPAZ耐性が克服されることを確認している。臨床的に極めて高いインパクトを持つ結果であり、早期の臨床応用を目指している。上記の成果はすでに「Activation of ERK1/2 Causes Pazopanib Resistance via Downregulation of DUSP6 in Synovial Sarcoma Cells」(発表論文10)として論文発表され、国内外で高い評価を得ている。よって、研究計画は順調に達成されたと判断した。

(3) さらに、高悪性度の軟部肉腫である、悪性末梢神経鞘腫瘍 (MPNST) の新規治療に関して検討をすすめた。腫瘍の増大に伴い、腫瘍内部は低酸素環境となり、低酸素誘導因子 Hypoxia Induced-factor 1(HIF-1)が誘導される。HIF-1の発現に伴い、血管内皮細胞増殖因子 VEGF の誘導や、アポトーシス耐性が生じ、腫瘍の悪性化が進行する事が報告されているため、MPNSTにおけるHIF-1の役割について解析した。約400種類に薬剤ライブラリーをスクリーニングしたところ、HIF-1の阻害剤がMPNST細胞株に殺細胞効果を持つ事、siRNAによるHIF-1の発現阻害によりMPNST細胞株にアポトーシスが生じることを見いだした。また臨床的にもHIF-1の高発現がMPNSTの独立した予後不良因子であることも確認、HIF-1がMPNSTの治療標的、ならびに有効なバイオマーカーとなることを証明した。(発表論文11)

## 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12件)

1. Matsumoto Y, Matsumoto K, Harimaya K, Okada S, Doi T, Iwamoto Y. Scoliosis in patients with multiple hereditary exostoses. *Eur Spine J.* 24:1568-1573, 2015, **IF 2.132** doi: 10.1007/s00586-015-3883-4
2. Hatano M, Matsumoto Y, Fukushi J, Matsunobu T, Endo M, Okada S, Iura K, Kamura S, Fujiwara T, Iida K, Fujiwara Y, Nabeshima A, Yokoyama N, Fukushima S, Oda Y, Iwamoto Y. Cadherin-11 regulates the metastasis of Ewing sarcoma cells to bone. *Clin Exp Metastasis.* 32:579-91, 2015, **IF 2.728** doi: 10.1007/s10585-015-9729-y
3. Doi T, Tono O, Tarukado K, Harimaya K, Matsumoto Y, Hayashida M, Okada S, Iwamoto Y. A new sagittal parameter to estimate pelvic tilt

using the iliac cortical density line and iliac tilt: a retrospective X-ray measurement study. *J Orthop Surg Res.* 10:115, 2015 doi: 10.1186/s13018-015-0262-0

4. Ueda T, Morioka H, Nishida Y, Kakunaga S, Tsuchiya H, Matsumoto Y, Asami Y, Inoue T, Yoneda T. Objective tumor response to denosumab in patients with giant cell tumor of bone: a multicenter phase II trial. *Ann Oncol.* 26: 2149-2154, 2015, **IF 9.269** doi: 10.1093/annonc/mdv307
5. Bekki H, Harimaya K, Matsumoto Y, Hayashida M, Okada S, Doi T, Iwamoto Y. The Position of the Aorta Relative to the Vertebrae in Patients with Lenke Type 1 Adolescent Idiopathic Scoliosis. *Spine.* 41: 585-590, 2016, **IF 2.439** doi: 10.1097/BRS.0000000000001257
6. Ishimaru D, Gotoh M, Takayama S, Kosaki R, Matsumoto Y, Narimatsu H, Sato T, Kimata K, Akiyama H, Shimizu K, Matsumoto K. Large-scale mutational analysis in the EXT1 and EXT2 genes for Japanese patients with multiple osteochondromas. *BMC Genet.* 2016;17(1):52, **IF 3.867** doi: 10.1186/s12863-016-0359-4
7. Matsumoto Y, Harimaya K, Kawaguchi K, Hayashida M, Okada S, Doi T, Iwamoto Y. Dumbbell Scoring System: A New Method for the Differential Diagnosis of Malignant and Benign Spinal Dumbbell Tumors. *Spine (Phila Pa 1976).* 2016; 41(20): E1230-E1236, **IF 2.439**
8. Matsumoto Y, Matsunobu T, Harimaya K, Kawaguchi K, Hayashida M, Okada S, Doi T, Iwamoto Y. Bone and soft tissue tumors presenting as sciatic notch dumbbell masses: A critical differential diagnosis of sciatica. *World J Clin Oncol.* 2016; 7(5): 414-419, **IF 0**
9. Saito T, Yokota K, Kobayakawa K, Hara M, Kubota K, Harimaya K, Kawaguchi K, Hayashida M, Matsumoto Y, Doi D, Shiba K, Nakashima Y, Okada S. Experimental Mouse Model of Lumbar Ligamentum Flavum Hypertrophy. *PLoS One.* 2017; 12(1): e0169717, **IF 3.057** doi: 10.1371/journal.pone.0169717
10. Yokoyama N, Matsunobu T, Matsumoto Y, Fukushi J, Endo M, Hatano M, Nabeshima A, Fukushima S, Okada S, and Iwamoto Y. Activation of ERK1/2 Causes Pazopanib Resistance via Downregulation of DUSP6 in Synovial Sarcoma Cells. *Sci Rep.* 2017; 7: 45332, **IF 5.228** doi: 10.1038/srep45332

11. Fukushima S, Matsumoto Y, Endo M, Matsumoto Y, Fukushi JI, Matsunobu T, Kawaguchi KI, Setsu N, Iida K, Yokoyama N, Nakagawa M, Yahiro K, Oda Y, Iwamoto Y, Nakashima Y. Hypoxia-inducible Factor 1 alpha is a Poor Prognostic Factor and Potential Therapeutic Target in Malignant Peripheral Nerve Sheath Tumor. PLoS One. 2017; 12(5): e0178064, **IF** **3.057** doi: 10.1371/journal.pone.0178064

12. Matsumoto Y, Shinoto M, Endo M, Setsu N, Iida K, Fukushi J, Kawaguchi K, Okada S, Bekki H, Imai R, Kamada T, Shioyama Y, Nakashima Y. Evaluation of risk factors for vertebral compression fracture after Carbon-ion radiotherapy for primary spinal and paraspinal sarcoma. Biomed Res Int. 2017; 9467402, **IF** **2.134** doi: 10.1155/2017/9467402

〔学会発表〕(計 0 件)

〔図書〕(計 0 件)

〔産業財産権〕

○出願状況(計 0 件)

名称：  
発明者：  
権利者：  
種類：  
番号：  
出願年月日：  
国内外の別：

○取得状況(計 0 件)

名称：  
発明者：  
権利者：  
種類：  
番号：  
取得年月日：  
国内外の別：

〔その他〕  
ホームページ等

## 6. 研究組織

### (1)研究代表者

松本 嘉寛 (MATSUMOTO, yoshihiro)  
九州大学医学研究院整形外科・准教授  
研究者番号：10346794

(2)研究分担者 ( )

研究者番号：

(3)連携研究者 ( )

研究者番号：

(4)研究協力者 ( )