

平成 30 年 6 月 15 日現在

機関番号：32620

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2015～2017

課題番号：15K18451

研究課題名(和文) 抗癌剤抵抗性骨肉腫に対する新規治療法の開発

研究課題名(英文) Novel therapeutic strategy for refractory osteosarcoma

研究代表者

窪田 大介 (KUBOTA, DAISUKE)

順天堂大学・医学部・非常勤助教

研究者番号：70638197

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)：骨肉腫は若年者に好発する悪性骨腫瘍の代表的疾患であり、希少癌の一つである。化学療法の導入により骨肉腫の予後は改善されてきたが、治療抵抗性の骨肉腫患者の予後は依然として不良で臨床的な問題点となっている。申請者は現在までに骨肉腫の治療抵抗性・悪性化のメカニズムを解析し、骨肉腫の化学療法抵抗性を規定する分子(PRDX2・miR-125b・miR-100)を同定した。本研究ではこれらの同定した分子が特に治療抵抗性骨肉腫に対して新規治療標的となり得るか、その有用性を検討した。その結果、PRDX2の阻害剤であるconoidin-Aは治療抵抗性骨肉腫細胞株に対して抗腫瘍効果を有する事を明らかとした。

研究成果の概要(英文)：Osteosarcoma is the most common primary malignancy in bone. Patients who respond poorly to induction chemotherapy are at higher risk of adverse prognosis. The molecular basis for such poor prognosis remains unclear. In this study, we tried to identify novel therapeutic targets for chemo-resistant osteosarcomas. Previously, We investigated protein and miRNA expressions using biopsy samples to identify predictive of response to induction chemotherapy, and identified PRDX2 and miRNA biomarkers. These results suggested that they are also potential novel therapeutic target for osteosarcomas. In this study, we found that the treatments of OS cells with conoidin-A, which inhibits the function of peroxiredoxin, markedly suppressed their proliferation. Our findings indicate the possible application of PRDX2 as a predictive biomarker and a novel therapeutic target in patients with osteosarcoma.

研究分野：整形外科

キーワード：骨肉腫 治療抵抗性 酸化ストレス miRNA チロシンキナーゼ

1. 研究開始当初の背景

骨肉腫は小児や若年成人に発症する代表的な原発性悪性骨腫瘍の代表的疾患である。骨肉腫の治療成績は、1970年代に導入された抗癌剤治療や適切な広範切除術の導入により漸次改善されてきた。骨肉腫においては、薬理作用の異なる複数の抗癌剤による治療が標準的に行われているが、抗癌剤の効果不十分な症例の予後は依然として不良である。抗癌剤奏効症例の5年生存率は90%であるのに対して、抗癌剤抵抗性の症例では5年生存率が50%以下と言われており、抗癌剤の奏効性は骨肉腫において最も重要な予後規定因子である(Paul A Meyers, et al, 1993)。しかし、現段階では抗癌剤の治療効果を事前に予測する有用な手段がないため、全ての患者に画一的な治療を行わざるを得ず、臨床的な問題となっている。そこで我々は現在までに骨肉腫の化学療法抵抗性を規定する分子・バイオマーカーの開発を行ってきた。そしてプロテオーム解析やmiRNA発現解析の手法を用いて、化学療法抵抗性を規定する分子の同定およびバイオマーカーの開発に成功した。今回、我々はそれらのバイオマーカーにより選別した化学療法抵抗性の骨肉腫を対象として、新規治療法の開発を目指した。骨肉腫に対する新規治療法の開発は現在までに多くの研究者によって行われてきたが、その多くは他の悪性腫瘍で使用されている化合物の二次的な利用を目指したものであり、臨床に実用化されているものは無いのが現状である。我々は新規治療法の開発にあたり、今までに同定してきた骨肉腫の悪性度や薬剤抵抗性に関わる分子に注目し、新規治療標的としての可能性を検討する。

新規治療法の開発にあたっては、化学療法奏効性に関わるタンパク質、マイクロRNA(miRNA)、チロシンキナーゼ(TK)に注目した。これまでに、骨肉腫の抗癌剤抵抗症例と抗癌剤奏効症例の治療前の生検検体を用いて、タンパク質の網羅的発現解析およびmiRNAマイクロアレイ解析により統計学的に抗癌剤奏効性に関与するタンパク質(PRDX2)とmiRNA(miR-125b, miR-100)を同定している。そしてこれらの分子が機能的に抗癌剤奏効性に関与する事をin vitroで確認した。これらの網羅的発現解析方法により同定した治療標的となり得る分子については、特異的な小分子化合物および阻害剤が存在することが明らかとなっている。今後はこれらの分子を標的として、治療抵抗性骨肉腫に対する新規治療法の開発を目指す。

チロシンキナーゼ(TK)については、近年、骨軟部腫瘍領域においても pazopanib というTK阻害剤が臨床で使われるようになり注目されている。しかしその適応は悪性軟部腫瘍に

限られ、悪性骨腫瘍である骨肉腫に対する効果はいまだ明らかとなっていない。また、TKは様々な悪性腫瘍において腫瘍悪性化に関わる分子として報告されているが、骨肉腫におけるTKの発現を網羅的に調査した報告はない。そこで我々は、治療奏効症例および治療抵抗症例の臨床検体を用いて、ヒトで発現が報告される全90種類のTKの発現を網羅的に評価し、骨肉腫における pazopanib の有効性およびその他のTK阻害剤の骨肉腫への適応についての検討をすすめる。

このよう骨肉腫は抗癌剤の奏効性をバイオマーカーにより事前に予測し、化学療法奏効性やTKの発現状況など個々の分子病態を把握した上で、最適化された治療を提供することが重要である。そしてこのように遺伝子背景を基とした治療戦略を確立することによって、骨肉腫の予後改善に寄与することが可能となる。

2. 研究の目的

骨肉腫は若年者に好発する悪性骨腫瘍である。化学療法の導入により骨肉腫の予後は改善されてきたが、一方で化学療法抵抗性の骨肉腫患者の予後は依然として不良で臨床的な問題点となっている。現在までに我々は骨肉腫の化学療法抵抗性を規定する分子を同定し、治療開始前に奏効性を予測するバイオマーカーの開発を進めてきた。本研究の目的は現在までに同定してきたバイオマーカーの機能を解明し、臨床応用を目指すと共に、化学療法抵抗性の骨肉腫に対する新規治療標的候補としての可能性を検討する事である。バイオマーカーにより治療抵抗性の骨肉腫を選定し、その分子病態に応じた新たな治療戦略を策定することにより、骨肉腫の治療成績の向上が期待される。

3. 研究の方法

(1) 抗癌剤奏効性関連タンパク質およびmiRNAに対する阻害剤の抗腫瘍効果の検討

骨肉腫の治療開始前の生検検体を用いたタンパク質発現解析およびmiRNAマイクロアレイ解析により、抗癌剤奏効性に関わるタンパク質PRDX2およびmiRNA miR-125b, miR-100を同定した。そしてin vitroレベルでこれらの分子が骨肉腫の抗癌剤抵抗性に関与し、奏効性の予測バイオマーカーとして利用できることを明らかにした。そこで、本研究ではこれらの化学療法奏効性に関わる分子について、阻害剤(conoidin-A, miRNA inhibitor)を用いて骨肉腫細胞株(HOS, 143B, MG63, KHOS)、ドキシソルビシン抵抗性骨肉腫細胞株(KHOS-R)における抗腫瘍効果を検討する。

抗腫瘍効果の測定は、細胞増殖やアポトーシス、浸潤能について検討する。細胞増殖(MTS-assay)については、Cell Counting

Kit-8 (Wako) を用いて行う。アポトーシスについては、アポトーシス関連分子に対するウェスタンブロット法による解析を行う。浸潤能の変化については Cell Invasion Assay Kit (BD) にて評価する。また既存の抗癌剤である MTX, DOX, CDDP との相乗効果についての検討も MTS assay を行い評価する。

また、阻害剤投与前後の分子病態の変化を観察するためにプロテオーム解析・トランスクリプトーム解析を行い、阻害剤によりどのようなパスウェイを介して抗腫瘍効果を発揮しているかを検討する。

(2) 骨肉腫におけるチロシンキナーゼ (TK) の網羅的発現解析と TK 阻害剤の抗腫瘍効果の検討

骨肉腫の臨床検体を用いてヒトで発現する全 90 種類の TK の発現をウェスタンブロット法および特異抗体を用いて調査する。使用する臨床検体は、治療開始前に採取した生検検体で、抗癌剤奏効症例、抗癌剤抵抗症例、肺転移症例を用いる。TK の発現に対しては、TK の抗体ライブラリーおよび NanoString を用いて、その発現を解析する。

TK はその発現が高いだけでは阻害剤が有効であるわけではなく、腫瘍の悪性度と関係しているかが重要である。また TK 阻害剤は通常、multi kinase 阻害剤であることが多く、何種類かの TK を標的とする。TK の発現・腫瘍分子病態への関与を網羅的に調査し、適切な TK 阻害剤を選択することが重要と考える。

4. 研究成果

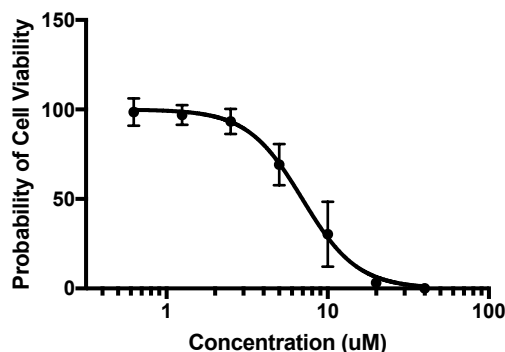
(1) PRDX2・miRNA を標的とした新規治療法の検討

ペルオキシレドキシシン (PRDX) は酸化作用を有する一酵素群として知られており、少なくとも 6 種類 (PRDX1-6) が知られ、多くの生体内で広く発現することが報告されている。酸素は呼吸などの生命活動に必須の物質であるが、活性酸素という強力な酸化作用をもつ物質も存在する。この活性酸素による細胞へのダメージは酸化ストレスと呼ばれ、がんや糖尿病、動脈硬化など様々な疾患や細胞の老化に関わることが報告されている。この活性酸素による酸化ストレスから細胞を防御するために、細胞は酸化タンパク質とよばれる物質を生成する。ペルオキシレドキシシンは酸化作用を有する一酵素群として知られており、少なくとも 6 種類 (PRDX1-6) が知られ、多くの生体内で広く発現することが報告されている。通常、活性酸素は癌の原因ともなると考えられているため、抗酸化物質はがん抑制的に働く物質と考えられることもあったが、抗酸化物質が逆にがん促進的に働くことが多

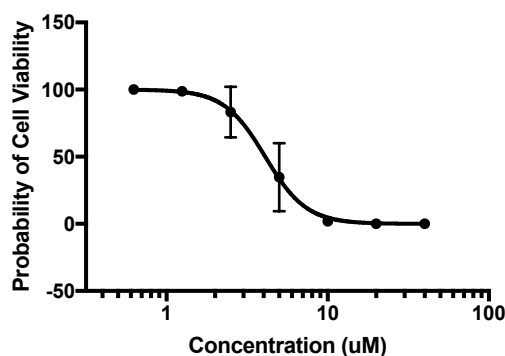
く報告されている。これは、がん細胞で発生した抗酸化物質ががん細胞自体の害となるほどの過剰な活性酸素の生成を防ぐことでがん細胞の健康な助長を助けてしまっている可能性が考えられる (Lu et al. Mol Cell Biochem. 2014)。また悪性腫瘍とその周辺の間質から成る腫瘍微小環境においては多くの場合、過剰な細胞の増殖により酸素の供給が不足し、低酸素状態 (Hypoxia) に陥っている。この酸化ストレスと腫瘍低酸素環境が腫瘍の悪性度に関与することが考えられる。実際に大腸癌や乳がん、喉頭がん、前立腺がんなどの様々な悪性腫瘍で PRDX の高発現が報告されている。本研究では、骨肉腫において、PRDX2 の発現が上昇していることに着目し、その阻害剤である conoidin-A ($C_{10}H_8Br_2N_2O_2$) の抗腫瘍効果について検討した。conoidin-A は PRDX1・PRDX2 の活性阻害剤であることが報告されている (Haraldsen et al. Org Biomol Chem. 2009)。しかしその抗腫瘍効果については明らかでない。

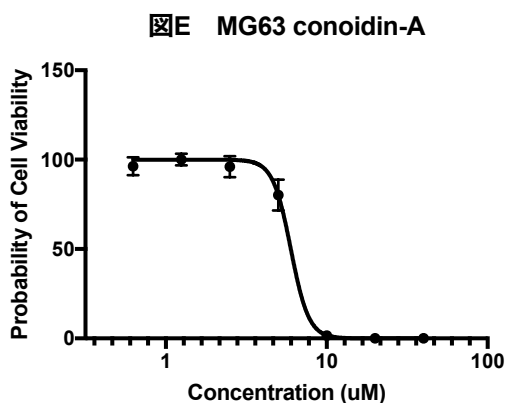
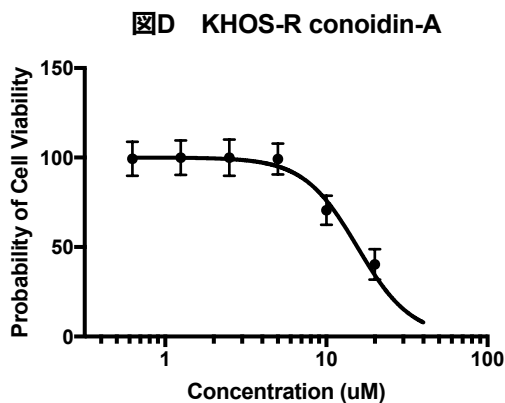
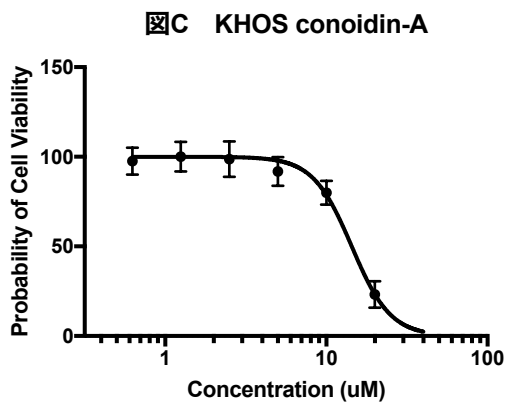
今回、我々はヒト骨肉腫細胞株 (HOS, 143B, KHOS) および薬剤抵抗性骨肉腫細胞株である KHOS-R を用いて conoidin-A の抗腫瘍効果について解析を行った。その結果、いずれの細胞株においても、骨肉腫細胞の細胞増殖を抑制することを確認した (図 A-E)。

図A 143B conoidin-A

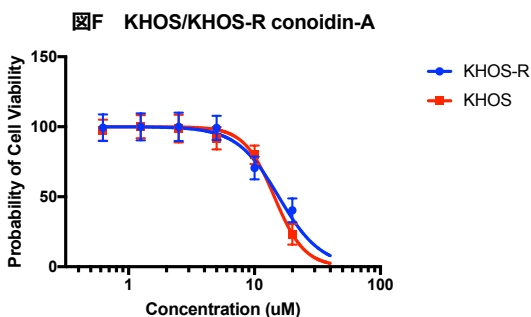


図B HOS conoidin-A



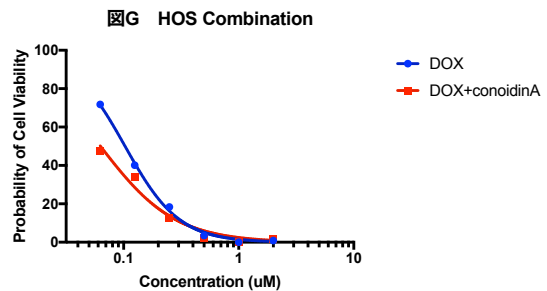


また薬剤抵抗性骨肉腫 KHOS-R に対しても抗腫瘍効果を認めており (図 D)、さらに KHOS と比較しても 50% 阻害濃度の値 (IC50) に変化がみられないことを確認した (図 F)



次に骨肉腫の標準的治療として用いられる Doxorubicin と conoidin-A の併用による抗腫瘍効果について検討した。骨肉腫細胞株に Doxorubicin 単剤を投与した場合と、

Doxorubicin に conoidin-A を併用した場合を比較した結果、両剤を併用した場合に IC50 値が有意に減少 (0.1uM→0.06uM) した (図 G)。



次に conoidin-A の抗腫瘍効果について、特異抗体を用いたウェスタンブロットにより、そのメカニズムの解析を行った。その結果、conoidin-A は PRDX2 の発現を抑制し、さらに腫瘍細胞のアポトーシスを促進させた。

このように PRDX2 を標的とした conoidin-A は骨肉腫細胞株に対して抗腫瘍効果を有することが明らかとなった。また薬剤抵抗性の骨肉腫細胞株に対しても抗腫瘍効果を有しており、治療抵抗性骨肉腫に対して有用な新規治療標的となり得る可能性が考えられた。

miRNA inhibitor に関する検討では、miR-125b に対する miRNA inhibitor を用いて抗腫瘍効果についての検討を行った。miRNA inhibitor により miR-125b の発現を抑制することで、有意に細胞増殖が抑制された。またウェスタンブロットにより、miR-125b は主にごん抑制遺伝子である TP53 遺伝子の働きを抑制していた。しかし miRNA は非常に多彩な mRNA を標的とすることがわかっており、miRNA を標的とした治療に関しては、更に網羅的な標的遺伝子探索を行っていく必要がある。

(2) 骨肉腫におけるチロシンキナーゼ (TK) の網羅的発現解析と TK 阻害剤の抗腫瘍効果の検討

次に、骨肉腫における治療抵抗性のメカニズム解析および治療標的探索を目的として、TK を中心とした網羅的な発現解析を行った。骨肉腫の生検検体を用いて、DNA・RNA・タンパク質を抽出し、タンパク質レベルでは抗体ライブラリーを用いた発現解析、DNA/RNA レベルでは NanoString による解析を行った。

骨肉腫は heterogeneity の強い腫瘍であり、分子背景の不均一さが一般的に知られている。今回行った解析では、全例に共通した遺伝子変異は認めなかったが、一部の症例に VEGF や PDGFR などの発現異常を認めた。VEGF は血管内皮細胞増殖因子 (Vascular endothelial growth factor)、PDGF は血小板由来成長因子

(platelet-derived growth factor) である。いずれも悪性腫瘍の血管新生に関わる分子であり、骨肉腫においても腫瘍の増殖や浸潤・遠隔転移に関与する可能性が考えられる。また、すでにVEGFやそのレセプターVEGFRに対する阻害薬は大腸がん、肺がん、乳がん、腎臓がん、肝臓がんなどで使用されているが、骨肉腫に対する有効性は不明であり、検討が必要である。なお、近年、軟部肉腫に対して使用が開始されたpazopanibはc-kit、FGFR、PDGFR、VEGFRを阻害するmulti kinase阻害剤である。我々は骨肉腫細胞株を用いてpazopanibの有効性をin vitroで確認したところ、明らかな抗腫瘍効果はみられなかった。その他にVEGFやPDGFを標的とする阻害剤であるSunitinib, Sorafenib, Dasatinibの抗腫瘍効果について現在、検討を進めている。

このように本研究課題において我々は主に抗がん剤抵抗性の骨肉腫を対象として、抵抗性メカニズムの解析と新規治療標的の探索を行った。腫瘍低酸素環境や酸化ストレスに関わるPRDX 2は骨肉腫において、抗がん剤抵抗性に関与し、またその阻害剤であるconoidin-Aは抗がん剤抵抗性骨肉腫に対しても抗腫瘍効果を有した。またTKを中心とした網羅的発現解析では、VEGFやPDGFなどの血管新生に関わる遺伝子に発現異常を認める症例がみられ、新規治療標的候補と考えられた。

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)

[学会発表] (計3件)

① 窪田大介, 田邊 雄, 向井原健太, 末原義之, 小林英介, 金子和夫, 腫瘍低酸素環境を標的とした骨肉腫の新規治療法開発, 第31回日本整形外科学会基礎学術集会, 2016年10月14日~2016年10月15日, 福岡

② 窪田大介, 網羅的発現解析に基づく骨軟部腫瘍のバイオマーカーの開発と新規治療法への応用, 第49回日本整形外科学会骨・軟部腫瘍学術集会, シンポジウム, 2016年07月14日~2016年07月15日, 東京

③ 窪田大介, 田邊 雄, 向井原健太, 末原義之, 小林英介, 金子和夫, 腫瘍低酸素環境を標的とした骨肉腫の新規治療法開発, 第89回日本整形外科学会学術総会, 2016年05月14日~2016年05月15日, 神奈川

6. 研究組織

(1) 研究代表者

窪田大介 (DAISUKE KUBOTA)

順天堂大学・整形外科・非常勤助教

研究者番号: 70638197