

令和 4 年 9 月 14 日現在

機関番号：94416

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2018～2021

課題番号：18K09051

研究課題名(和文) 骨軟部腫瘍の肺転移抑制を目指した免疫療法の開発

研究課題名(英文) Investigating the new strategy to suppress lung metastasis of sarcomas

研究代表者

笹川 覚 (Sasagawa, Satoru)

医療法人徳洲会野崎徳洲会病院(附属研究所)・研究所・主任研究員

研究者番号：80345115

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,400,000円

研究成果の概要(和文)：希少がん分類される滑膜肉腫は高頻度に転移を生じるため、予後の悪いがんの一つとして知られている。本研究ではTwist1および転移促進環境条件がMICA/Bの発現を抑制し、低用量HDAC阻害剤がMICA/Bの発現を回復させることを示した。また、Twist1がHDAC阻害剤に対する薬剤抵抗性の原因であることを実験的に証明した。Twist1の発現を抑制する薬剤としてSN38を同定し、HDAC阻害剤と併用することで薬効改善効果が得られることを示した。本研究成果は、滑膜肉腫の転移に対する新規分子標的治療法の方向性を明示した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究課題では、滑膜肉腫の転移に対して有効な治療法として、低用量HDAC阻害剤とイリノテカン(もしくはその代謝産物SN38)を併用することで、転移巣でもMICA/Bの発現を回復させ、NK細胞による腫瘍免疫反応により細胞死を誘導することを提案した。いずれの薬剤もいくつかのがんで承認されているものであることから、滑膜肉腫治療における臨床応用へのハードルは高くないと推測される。これまでに、滑膜肉腫の転移を抑制する、転移巣に於いても有効に作用する化学療法はほとんど無いため、本研究の成果は臨床応用への重要な礎になると期待される。

研究成果の概要(英文)：Synovial sarcoma, classified as rare cancer, is known as one of the cancers with a poor prognosis due to its high incidence of metastasis. In this study, we demonstrated that Twist1 and metastasis-promoting environmental conditions suppress MICA/B expression, and low-dose HDAC inhibitors restore MICA/B expression. We also experimentally demonstrated that Twist1 is responsible for drug resistance to HDAC inhibitors; we identified SN38 as a drug that suppresses Twist1 expression and showed that it can be used in combination with HDAC inhibitors to improve drug efficacy. The results of this study clearly indicate the direction of novel molecular targeted therapy for synovial sarcoma metastasis.

研究分野：分子腫瘍学

キーワード：滑膜肉腫 転移 Twist1 MICA/B

様式 C-19、F-19-1、Z-19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

骨軟部腫瘍は腫瘍発症例全体に占める比率は 1%以下と少ないが、若年齢層に限ればその比率は 20%程度を占め、肺や肝臓など遠隔臓器への転移を認めるケースが少なくない。転移は患者の予後を左右する最大の要因であり、例として滑膜肉腫では初診時に肺転移が見られる場合の 5 年生存率は 0%である (Takenaka et al., 2008)。転移の抑制は患者の予後改善に直結するため、転移抑制薬剤や治療法の開発は臨床現場においても渴望されているが、現在までに決定的な薬剤や治療法は見出されていない。

2. 研究の目的

NKG2D リガンドはウイルス感染や腫瘍化などのストレスに応答して発現上昇し、高発現しているストレス細胞は NK 細胞によって検知、排除されることが知られているが、CTC の生存戦略のために発現抑制される分子メカニズムについてはほとんど報告がない。申請者は、これら NKG2D リガンドや Fas の発現が Twist1 をノックダウンすると回復することを発見した。すなわち、Twist1 の骨軟部腫瘍悪性化に関する新規作用として、免疫監視システムからの逃避が強く示唆される。本研究計画ではこの点にフォーカスを絞り、骨軟部腫瘍転移能における Twist1 の機能と、Twist1 関連分子を標的とした転移抑制の可能性を検討することを研究目的とする。

3. 研究の方法

- 1) 骨軟部腫瘍細胞における NKG2D リガンドと Twist1 の分子メカニズムの解明
- 2) MICA/B の発現を回復させる薬剤、Twist1 を抑制する薬剤の探索
- 3) 見出した薬剤を併用した際の薬効評価

1-3 までの解析を実施することにより、高転移能獲得における Twist1 の新規分子作用を明確にし、その関連分子が転移抑制のための重要な標的と成り得ることを示す。滑膜肉腫だけでなく広範な骨軟部腫瘍や脳腫瘍など血行性転移しやすい腫瘍タイプにおいても転移時における免疫監視システムからの逃避が Twist1 により調節されているかどうかを明らかにする。

4. 研究成果

滑膜肉腫は AYA 世代 (思春期から若年齢層) に発症ピークを持つ肉腫の一つで、日本国内での発症例数は 200 件/年程度の希少がんとして扱われる。また、高頻度に転移を生じるため、非常に予後の悪いがんとして知られている。初診時にすでに肺転移を生じているケースも少なからずあり、その場合の 5 年生存率はほぼゼロである。そのため、転移の抑制が患者予後の改善のキーポイントと考えられるが、現在までに転移抑制を目的とした治療法は確立されていない。これまでに、肉腫細胞の転移に対して NK 細胞による免疫監視が転移抑制に作用していることが報告されている。そのため、NK 細胞によって認識される腫瘍細胞側の細胞表面分子 MICA/B の発現をスクリーニングした結果、大半の細胞株で MICA/B の発現が消失していることが判明した。一方、転移を促進する因子として Twist1 が滑膜肉腫の大半で強く発現していることを確認しており、MICA/B の発現パターンと対比すると排他的な関係にあることがわかった。この関係に因果があるか確認するため、MICA/B を発現している細胞株に Twist1 を強制発現したところ、MICA/B の発現は抑制された。このことから Twist1 は MICA/B の発現抑制作用を持つと考えられた。一方で、Twist1 を発現している細胞で Twist1 をノックダウンしても MICA/B の発現は回復しなかったことから、MICA/B の発現消失は別の要因があると推測された (図 1A,B)。また、滑膜肉腫細胞を転移促進環境を模した浮遊環境、低酸素環境で培養したところ、MICA/B の発現は抑制された。これらの結果から、転移促進環境下では MICA/B の発現が抑制され、NK 細胞による免疫監視をくぐり抜けやすくなることで転移成立に寄与することが推測された (図 1C,D)。

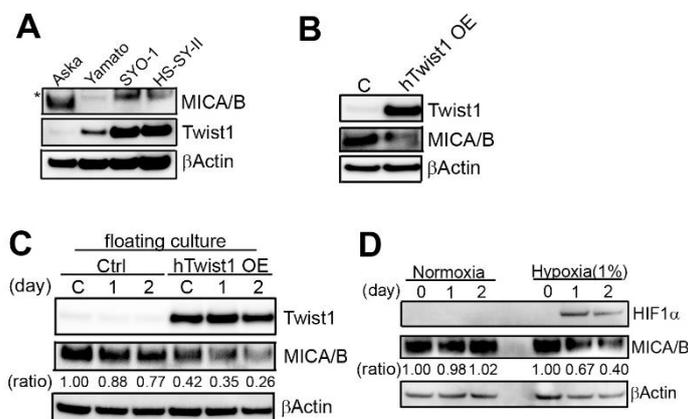


図 1

MICA/B の消失は NK 細胞による免疫監視網を麻痺させることから、MICA/B の発現回復が転移抑制につながると考えられる。そこで、文献などから MICA/B の発現を調節しうる薬剤を探索したところ、HDAC 阻害剤が一部の腫瘍細胞で MICA/B の発現を増強することが報告されていた。そのため、各種 HDAC の阻害剤を滑膜肉腫細胞に投与したところ、MICA/B の発現が消失している細胞でも発現誘導が確認された。この誘導能は浮遊環境下、低酸素環境下に於いても強力に MICA/B の発現を誘導した (図 2)。

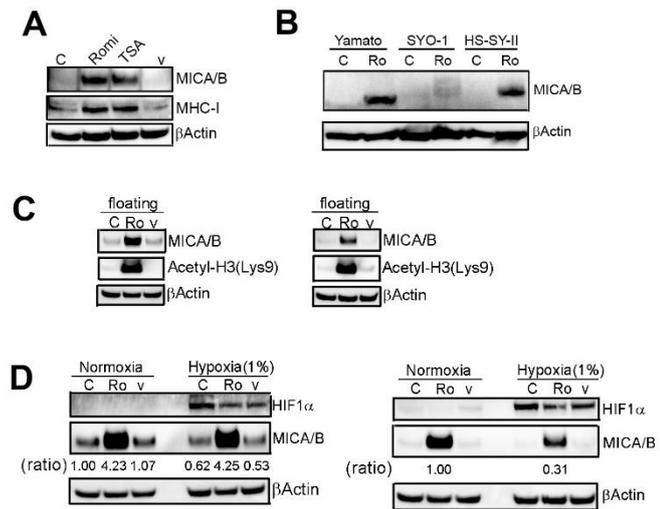


図 2

一方、肺などでの転移巣を模したスフェロイド形態では HDAC 阻害効果が弱まり、特に Twist1 が強く発現している細胞のスフェロイドではほとんど誘導されないという結果を得た。HDAC 阻害剤の濃度を上げて誘導能は回復しなかったことから、何らかの薬剤耐性メカニズムにより HDAC 阻害剤の阻害剤の効果キャンセルされていると推測された。Twist1 は転移促進因子として知られる一方、薬剤耐性因子としても知られる。Twist1 をほとんど発現していない細胞のスフェロイドでは HDAC 阻害剤による MICA/B の発現誘導が観察されていることから、スフェロイド形態における HDAC 阻害剤の効果抑制は Twist1 による薬剤抵抗メカニズムに起因する可能性が浮上した。そのため、shRNA による Twist1 のノックダウンを施し、その上でスフェロイドを形成し、HDAC 阻害剤を投与した。その結果、HDAC 阻害剤による MICA/B の発現誘導能が回復した (図 3)。

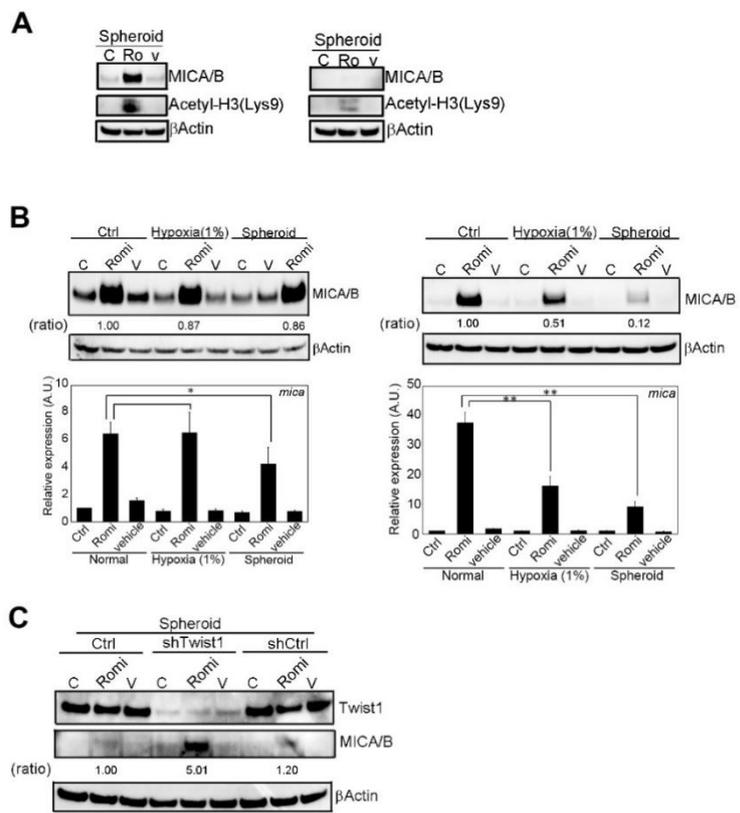
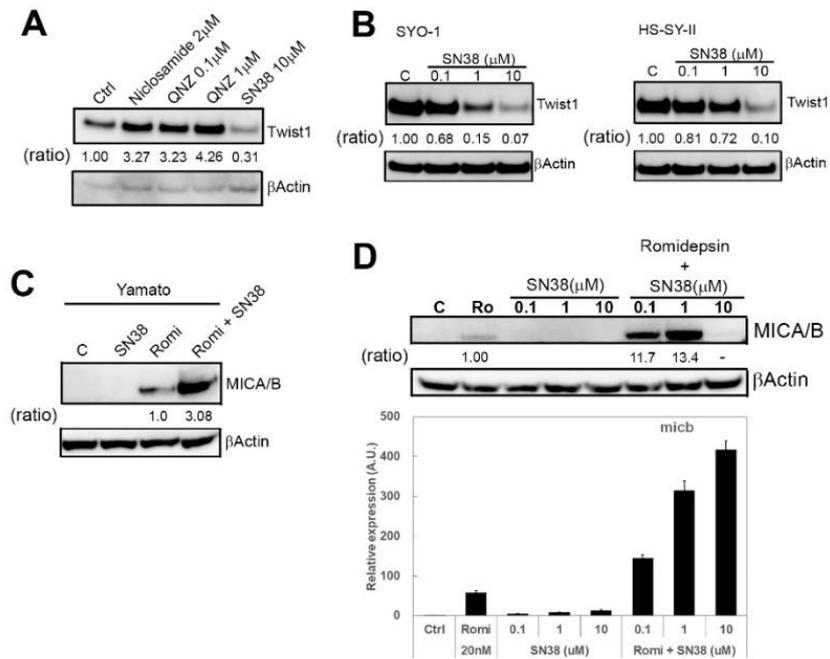


図 3

Twist1 が HDAC 阻害剤の MICA/B 誘導効果を阻害することが明らかとなったが、治療を考える上で shRNA によるノックダウンは現実的ではなく、薬剤による Twist1 の抑制が求められる。現在までに Twist1 を抑制する薬剤はほとんど知られていない。わずかに NF- κ B 経路を阻害する薬剤が Twist1 を抑制することが他のがん種で示唆されていたが、滑膜肉腫細胞に対して投与したところ、逆に Twist1 の発現を強化する結果となった。一方、マウス骨肉腫の肺転移モデルで、作用機序は不明ながらイリノテカン (TOPO イソメラーゼ阻害剤) が肺転移を抑制することを共同研究者が以前に報告している。この転移性骨肉腫細胞 LM8 には Twist1 が強力に発現し、その親株 Dunn には Twist1 が発現していないことから、イリノテカンの作用が Twist1 の抑制にあるのではないかと考え、イリノテカンの活性化誘導体である SN38 で滑膜肉腫を処理したところ、

Twist1 を抑制することが判明した。そこで、HDAC 阻害剤と SN38 を併用したところ、通常培養条件下でも MICA/B の発現誘導量は増加し、スフェロイド状態においても MICA/B の発現を誘導することに成功した (図 4)。

図 4

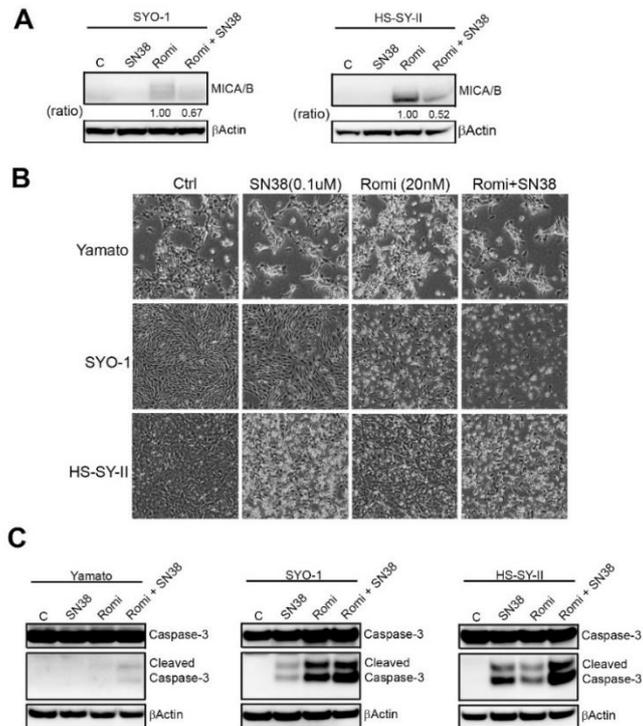


HDAC は滑膜肉腫の発生原因となる SS18-SSX 融合遺伝子産物がハイジャックする BAF 複合体の構成因子の一つであり、それ故に

HDAC 阻害剤は滑膜肉腫治療のキラードラッグとして注目されていたが、現在までに劇的な治療改善には繋がっておらず、治療薬として承認されたものはない。

そこで、改めて HDAC 阻害剤、SN38、およびその併用投与の効果を検証した。その結果、細胞ごとに応答性が異なり、HDAC 阻害剤に感受性の高い細胞、マイルドに感受性を示す細胞、ほとんど感受性を示さない細胞とばらつきが見られた。SN38 を併用投与すると、多くの細胞で強い殺細胞効果が観察されたが、一部の細胞では併用効果も観察されなかった。整理すると、HDAC 阻害剤に感受性のある細胞は単剤もしくは SN38 との併用で殺細胞効果が認められ、殺細胞効果が見られない細胞では MICA/B の強い発現上昇が観察された (図 5)。

図 5



総括すると、滑膜肉腫の高い転移発生率の背景には滑膜肉腫に広く Twist1 が発現していることと MICA/B の発現が消失していることが細胞的要因として挙げられ、これらの分子発現の挙動は転位を促進するとされる状況に応答して転移に都合の良い状況を作り出していることが環境要因として挙げられる。これに対して、HDAC 阻害剤は MICA/B の発現を回復させ、SN38 は Twist1 の発現を抑制することで細胞的要因を改善しうることが示された。またこれらの併用は感受性の高い細胞に対しては直接的に細胞死を、抵抗性の高い細胞に対しては MICA/B の発現を回復させることで NK 細胞を介して間接的に細胞死を誘導することが期待される。これらの薬剤は、滑膜肉腫の治療においては一般的なものではないが、他の腫瘍ではすでに臨床応用されているものではある。ドラッグリポジショニングの候補薬剤として、本研究成果が臨床治験への科学的根拠となり臨床応用へと繋がることを期待する (図 6)。

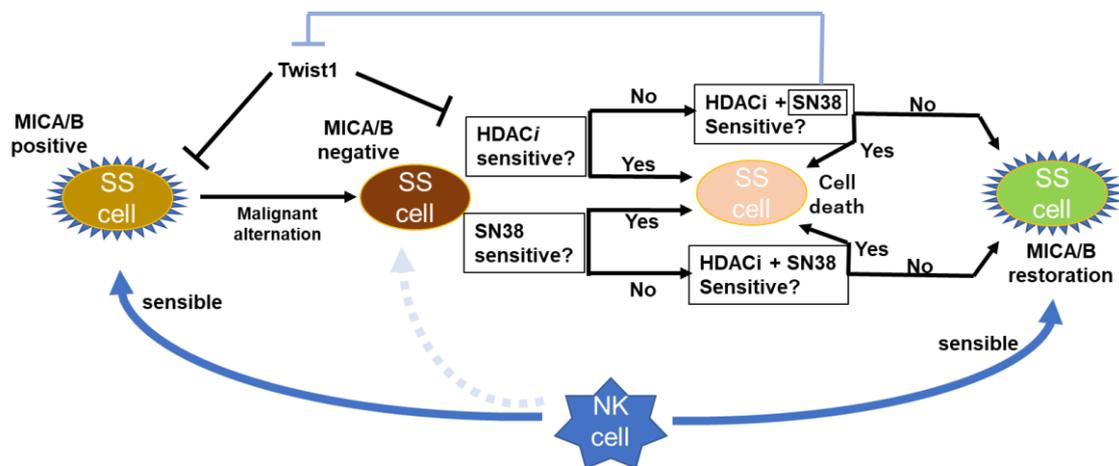


図 6

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計7件（うち査読付論文 7件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 3件）

1. 著者名 Igarashi Ko, Yui Yoshihiro, Watanabe Kenta, Kumai Jun, Nishizawa Yasuko, Miyaura Chisato, Inada Masaki, Sasagawa Satoru	4. 巻 20
2. 論文標題 Molecular evidence of IGFBP-3 dependent and independent VD3 action and its nonlinear response on IGFBP-3 induction in prostate cancer cells	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 BMC Cancer	6. 最初と最後の頁 802
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1186/s12885-020-07310-5	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -

1. 著者名 Kumai Jun, Sasagawa Satoru, Horie Masanobu, Yui Yoshihiro	4. 巻 8
2. 論文標題 A Novel Method for Polyacrylamide Gel Preparation Using N-hydroxysuccinimide-acrylamide Ester to Study Cell-Extracellular Matrix Mechanical Interactions	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Frontiers in Materials	6. 最初と最後の頁 なし
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.3389/fmats.2021.637278	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -

1. 著者名 Nakagawa H, Sasagawa S, Itoh K.	4. 巻 15(2)
2. 論文標題 Sodium butyrate induces senescence and inhibits the invasiveness of glioblastoma cells.	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Oncology Letters	6. 最初と最後の頁 1495-1502
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.3892/ol.2017.7518.	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Nakagawa H, Yui Y, Sasagawa S, Itoh K.	4. 巻 139(1)
2. 論文標題 Evidence for intrathecal sodium butyrate as a novel option for leptomeningeal metastasis.	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Journal of Neuro-Oncology	6. 最初と最後の頁 43-50
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1007/s11060-018-2852-2	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Watanabe K, Yui Y, Sasagawa S, Suzuki K, Kanamori M, Yasuda T, Kimura T.	4. 巻 10(2)
2. 論文標題 Low-dose eribulin reduces lung metastasis of osteosarcoma in vitro and in vivo.	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Oncotarget	6. 最初と最後の頁 161-174
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.18632/oncotarget.26536	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている(また、その予定である)	国際共著 -

1. 著者名 Amari Keigo, Sasagawa Satoru, Imayoshi Natsuki, Toda Yuki, Hosogi Shigekuni, Imamura Toshihiko, Ashihara Eishi	4. 巻 588
2. 論文標題 The CDK4/6-UCL5-BRD4 axis confers resistance to BET inhibitors in MLL-rearranged leukemia cells by suppressing BRD4 protein degradation	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Biochemical and Biophysical Research Communications	6. 最初と最後の頁 147 ~ 153
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.bbrc.2021.12.063	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Yui Yoshihiro, Kumai Jun, Watanabe Kenta, Wakamatsu Toru, Sasagawa Satoru	4. 巻 -
2. 論文標題 Lung fibrosis is a novel therapeutic target to suppress lung metastasis of osteosarcoma	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 International Journal of Cancer	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1002/ijc.34008	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

〔学会発表〕 計4件(うち招待講演 0件/うち国際学会 1件)

1. 発表者名 笹川覚、熊井準、伊藤和幸、由井理洋
2. 発表標題 滑膜肉腫におけるMICA/Bの発現調節とそれを利用した免疫療法による転移抑制の検討
3. 学会等名 第78回日本癌学会学術総会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Satoru Sasagawa
2. 発表標題 Vitamin D can enhance the effects of Anti-tumor treatment in prostate tumor cells.
3. 学会等名 ASCB EMBO 2019 meeting (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 笹川寛、由井理洋、渡邊健太、伊藤和幸、水本篤志、中川秀光
2. 発表標題 滑膜肉腫におけるNKG2Dリガンドの発現調節と転移制御
3. 学会等名 日本癌学会第77回日本癌学会学術総会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 笹川寛、熊井準、伊藤和幸、由井理洋
2. 発表標題 滑膜肉腫における転移環境条件とTwist1によるMICA/Bの発現抑制とHDAC阻害剤による MICA/Bの発現回復
3. 学会等名 日本癌学会第80回日本癌学会学術総会
4. 発表年 2021年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
---------------------------	-----------------------	----

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8 . 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------