

令和 3 年 6 月 25 日現在

機関番号：12602

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2018～2020

課題番号：18K09096

研究課題名(和文) PAI-1制御を基軸とした新規肉腫治療薬の開発

研究課題名(英文) Development of novel anti-sarcoma drug based on PAI-1 regulation

研究代表者

菊地 克史(Katsushi, Kikuchi)

東京医科歯科大学・大学院医歯学総合研究科・非常勤講師

研究者番号：00602062

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,500,000円

研究成果の概要(和文)：マウス肉腫モデルから抽出された肉腫サンプルを用いて、PAI-1の発現をqPCR法、免疫染色法を用いて解析したところ、肉腫におけるPAI-1の発現が確認された。ヒト肉腫細胞株、およびヒト間葉系幹細胞に対してPAI-1阻害剤を作用させ、増殖活性に対する影響を解析した。その結果、PAI-1阻害剤は肉腫細胞株において、用量依存的に細胞増殖に有意な影響を与えること、ヒト間葉系幹細胞ではその活性が認められないことが明らかとなった。現在RNA-seq解析により、肉腫細胞に対するPAI-1阻害剤の分子制御メカニズムを解析している。

研究成果の学術的意義や社会的意義

抗がん剤が大半の骨軟部肉腫に作用し難いことは、肉腫治療における大きな課題である。また、高悪性肉腫の場合は、肉眼的には完全に肉腫を切除できた場合でも、しばしば再発や転移が問題となり、このような症例は抗がん剤治療のみではコントロールができず、予後不良となる。このため、抗がん剤に代わるもしくは抗がん剤と併用する新たな肉腫治療薬が希求されている。PAI-1阻害薬はがん幹細胞ニッチからの肉腫幹細胞の離脱を促進し、抗がん剤の感受性を増強させる画期的な新規肉腫治療薬となる可能性があり、化学療法と併用することで、再発および転移の抑制を十分期待できる。

研究成果の概要(英文)：When the expression of PAI-1 was analyzed using qPCR method and immunostaining method using the sarcoma sample removed from the mouse sarcoma model, the expression of PAI-1 in the sarcoma was confirmed. PAI-1 inhibitors were acted on human sarcoma cell cells and human mesenchymal stem cells to analyze their effects on growth activity. As a result, it was clarified that PAI-1 inhibitors have a significant effect on cell proliferation in the sarcoma cell system in a dose-dependent manner, and that the activity is not observed in human mesenchymal stem cells. Currently, RNA-seq analysis is employed to analyze the molecular mechanism of PAI-1 inhibitors for sarcoma cells.

研究分野：薬学

キーワード：肉腫 PAI-1

1. 研究開始当初の背景

抗がん剤が大半の骨軟部肉腫に作用し難いことは、肉腫治療における大きな課題である。また、高悪性肉腫の場合は、肉眼的には完全に肉腫を切除できた場合でも、しばしば再発や転移が問題となり、このような症例は抗がん剤治療のみではコントロールができず、予後不良となる。このため、抗がん剤に代わるもしくは抗がん剤と併用する新たな肉腫治療薬が希求されている。肉腫の増殖および転移のメカニズムはよくわかっておらず、そのため有効な治療薬の開発は著しく遅れている。近年、パゾパニブ、トラベクテジン、エリブリンといった新たな薬剤が肉腫治療薬として使用できるようになったが、肉腫特異的に抗腫瘍作用を発揮する薬剤ではないため、肉腫に対する著しい効果を発揮期待するには至っていない。近年、がん組織の中には「がん幹細胞」が存在することが明らかとなり、このような細胞は「がん幹細胞ニッチ」に守られているため、抗がん剤に対する抵抗性を有し、再発や転移の原因となることが知られている。プラスミノゲン活性化抑制因子-1 (Plasminogen activator inhibitor 1: PAI-1) は各種悪性腫瘍患者の血中に高発現し、しかもその発現量は腫瘍の悪性度と正の相関を示すが、肉腫においてもその例外ではない。PAI-1 は造血系に関与し、PAI-1 阻害薬が造血幹細胞を骨髄ニッチから離脱させ、細胞分化を促進させることが報告されたが、この知見は、PAI-1 阻害薬が肉腫幹細胞をニッチから離脱させ、肉腫に対する化学療法の根治性を高めるとともに、肉腫の再発および転移を抑制する可能性を示唆する。PAI-1 は線維肉腫において PI3K/AKT を活性化して抗癌剤の攻撃から細胞を守ることが報告されている。

2. 研究の目的

本研究は、PAI-1 阻害剤が直接腫瘍細胞に及ぼす作用を検証する。PAI-1 阻害剤による抗がん剤作用増強の機序を明確にし、将来的には、肉腫を標的とした新しい治療コンセプトの非臨床における検証 (非臨床 POC の取得) を目指す。

3. 研究の方法

・マウス肉腫細胞における内在性 PAI-1 の発現解析

ペリサイト特異的に p53 欠損したマウス (NG2-cre;p53 floxed マウス) および p53^{+/+}-マウスに発症した肉腫組織を採取し、q-PCR および免疫組織学的に Pai-1 の発現を解析した。コントロールとしてマウス骨格筋組織を用いた。

・ヒト肉腫細胞における内在性 PAI-1 の発現比較

ヒト肉腫細胞株 U2OS、ヒト骨肉腫由来骨芽細胞様細胞株 SaOS、ヒト骨肉腫細胞株 ANOS を 3 日間培養の後、tRNA を採取し、PAI-1 発現を q-PCR にて比較した。

・ヒト肉腫細胞における PAI-1 阻害剤 TM5484 の抗腫瘍効果の検証

ヒト肉腫細胞における PAI-1 の機能を解析するために、U2OS、Saos-2 を培養し、PAI-1 阻害剤 TM5484 を高発現肉腫細胞と低発現肉腫細胞の増殖能、浸潤能を MTT アッセイにて比較し、PAI-1 が肉腫細胞の増殖に与える影響を検討した。コントロールとしてヒト滑膜由来の間葉系幹細胞 (以下 MSC) を使用した。

4. 研究成果

【結果】

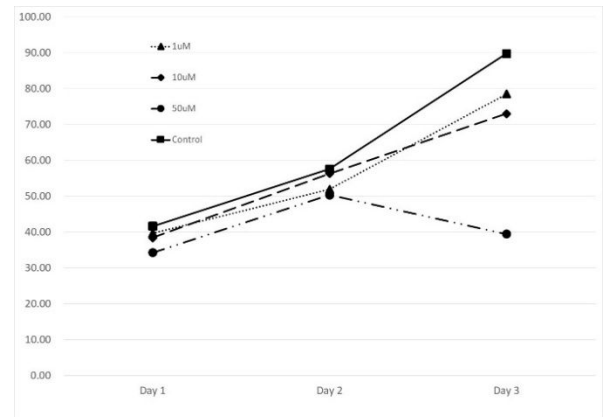
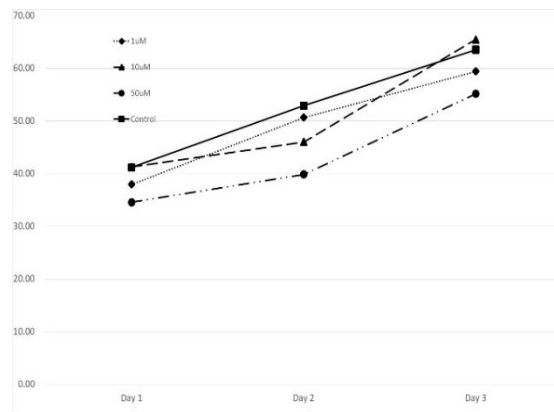
・マウス肉腫細胞における内在性 PAI-1 の発現解析

ペリサイト特異的に p53 欠損したマウス (NG2-cre;p53 floxed マウス) および p53^{+/-} マウスに発症した肉腫組織の mRNA *Pai-1* の発現は、同年代の野生型マウス骨格筋の *Pai-1* 発現とほぼ同等であった。抗 *Pai-1* 抗体による免疫染色でも同様の染色性が認められた。

・ヒト肉腫細胞における内在性 PAI-1 の発現比較

ヒト肉腫細胞株 U2OS、Saos-2、ANOS から mRNA を採取して *PAI-1* 発現を q-PCR 法にて比較した。SaOS、ANOS と比較し、U2OS での *PAI-1* 発現が最も多かった。

・ヒト肉腫細胞における PAI-1 阻害剤 TM5484 の抗腫瘍効果の検証



MTT assay の結果 左はヒト滑膜幹細胞、右はヒト肉腫細胞株 SaOS
50uM の TM5484 は SaOS の増殖を著しく抑制した

U2OS、SaOS および MSC を培養し、1 μ M から 50 μ M の TM5484 を作用させた。MTT アッセイの結果、TM5484 はほぼ容量依存的に U2OS、SaOS の増殖を抑制することが明らかとなった。一方 TM5484 は MSC の増殖は抑制しなかった。

【考察】

PAI-1 は肉腫細胞において正常細胞とほぼ同等に発現していた。PAI-1 阻害剤 TM5484 はヒト骨肉腫細胞株の増殖を抑制したが、正常細胞であるヒト MSC の増殖は阻害しなかった。細胞株の種類によって PAI-1 発現に差があったが、PAI-1 阻害剤の投与効果と PAI-1 発現量の相関は認められなかった。現在、PAI-1 阻害による増殖抑制の分子メカニズムを特定するために、PAI-1 阻害剤を作用させた細胞株、およびコントロールから tRNA を採取し、RNA-seq 解析を行っている。PAI-1 阻害薬は抗がん剤の感受性を増強させる画期的な新規肉腫治療薬となる可能性があり、化学療法と併用することで、再発および転移の抑制を十分期待できる。PAI-1 阻害薬と化学療法の併用という新しい肉腫治療法の開発は、肉腫患者の生存率向上につながるだけでなく、他の腫瘍の悪性化機構解明や治療薬開発においても波及的な効果をもたらすことが期待される。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計1件（うち査読付論文 1件/うち国際共著 1件/うちオープンアクセス 1件）

1. 著者名 Aihemaiti A, Yamamoto N, Piao J, Oyaizu T, Ochi H, Sato S, Okawa A, Miyata T, Tsuji K, Ezura Y, Asou Y.	4. 巻 534
2. 論文標題 A novel PAI-1 inhibitor prevents ageing-related muscle fiber atrophy.	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Biochem Biophys Res Commun.	6. 最初と最後の頁 849-856
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.bbrc.2020.10.089.	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 該当する

〔学会発表〕 計3件（うち招待講演 0件/うち国際学会 1件）

1. 発表者名 Alkebaier Aobulikasimu*1, Hiroki Ochi1, Jinying Piao1, Shingo Sato1, Kunikazu Tsuji2, Atsushi Okawa1, Yoshinori Asou1
2. 発表標題 Osteocyte Sirt6 has crucial roles in bone and phosphate metabolism through senescence- dependent and -independent manner
3. 学会等名 米国骨代謝学会（国際学会）
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 アディハム アハマツト アクバル アブルカスム 越智広樹 山本尚輝 小柳津卓哉 宮田敏男 佐藤信吾 畑裕 辻邦和 大川淳 麻生義則
2. 発表標題 PAI-1はロコモティブシンドローム、サルコペニアを加速する。
3. 学会等名 日本整形外科基礎学会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Alkebaier Aobulikasimu, 越智広樹、朴金瑛、佐藤信吾、辻邦和、大川淳、麻生義則
2. 発表標題 骨細胞Sirt6による骨代謝、リン代謝制御機構
3. 学会等名 日本整形外科基礎学会
4. 発表年 2019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
研究 分担者	麻生 義則 (Asou Yoshinori) (50345279)	東京医科歯科大学・大学院医歯学総合研究科・ジョイントリサーチ講座教授 (12602)	
研究 分担者	佐藤 信吾 (Sato Shingo) (40462220)	東京医科歯科大学・医学部附属病院・講師 (12602)	

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
---------	---------