

令和 3 年 4 月 3 日現在

機関番号：15301

研究種目：若手研究

研究期間：2018～2020

課題番号：18K15212

研究課題名(和文) PRRX1陽性がん幹細胞を標的とした新規骨肉腫治療法の開発

研究課題名(英文) Novel therapeutic strategy for sarcomas by targeting PPRX1 positive cancer stem-like cells

研究代表者

山田 大祐 (Yamada, Daisuke)

岡山大学・医歯薬学総合研究科・助教

研究者番号：50733680

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,100,000円

研究成果の概要(和文)：骨肉腫における転写制御因子PRRX1の機能を明らかにするために、まず臨床検体を用いた解析を行った結果、PRRX1の発現量が高い骨肉腫は予後不良を示すことが明らかとなった。さらに、ヒト骨肉腫細胞株である143BでPRRX1をノックダウンさせた結果、細胞増殖能や浸潤能の低下、ならびにドキソルビシンへの感受性の増加が生じることが判明した。さらに、PRRX1ノックダウンによりRNA transcriptomeがforskolin暴露サンプルのものと類似するようになることも判明した。以上の結果から、PRRX1はPKAシグナルの制御を介して骨肉腫の悪性化を誘導していることが考えられた。

研究成果の学術的意義や社会的意義

発生過程において、PRRX1は四肢に存在する肢芽間葉系細胞に発現していることが報告されているが、骨肉腫における機能に関しては解析がなされていなかった。本研究により、ヒト骨肉腫においてPRRX1が悪性化促進因子として機能することが明らかとなり、さらにPKAシグナルがPRRX1を介した骨肉腫の悪性化に関与している可能性が示唆された。以上の結果より、PRRX1の高発現による腫瘍の悪性化メカニズムの解明につながる知見が得られただけでなく、PRRX1が骨肉腫治療の有望な治療標的になることが明らかとなった。

研究成果の概要(英文)：We performed PRRX1 immunostaining on 35 human osteosarcoma specimens to assess the correlation between PRRX1 level and overall survival. In patients with osteosarcoma, the expression level of PRRX1 positively correlated with poor prognosis or the ratio of lung metastasis. Additionally, we found PRRX1 expression on in 143B cells, a human osteosarcoma line with a high metastatic capacity. Downregulation of PRRX1 not only suppressed proliferation and invasion but also increased the sensitivity to cisplatin and doxorubicin. When 143B cells were subcutaneously transplanted into nude mice, PRRX1 knockdown decreased tumor sizes and rates of lung metastasis. Interestingly, forskolin, a chemical compound identified by Connectivity Map analysis using RNA expression signatures during PRRX1 knockdown, decreased tumor proliferation and cell migration to the same degree as PRRX1 knockdown. These results demonstrate that PRRX1 promotes tumor malignancy in human osteosarcoma.

研究分野：腫瘍生物学

キーワード：骨肉腫 PRRX1 転移

様式 C-19、F-19-1、Z-19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

骨肉腫は原発性骨腫瘍の中で最も発症頻度が高いだけでなく、肺や肝臓といった他臓器にも遠隔転移が生じる予後不良な悪性腫瘍の一つである。骨肉腫の治療には抗癌剤療法や外科療法が適応されているが、四肢の温存が困難となり切除によって患者の生命の質(QOL)が著しく低下してしまうケースも存在する。したがって、骨肉腫の新規治療法の確立のためにも、骨肉腫の起源となっている細胞で特異的に発現されている分子を同定し、それらが治療標的分子になり得るかを解明していくことが必要となる。

申請者は生体内における PRRX1 陽性間葉系幹細胞の機能解析を行っており、その過程で骨肉腫の発症頻度の高い膝関節に PRRX1 陽性細胞が存在することを発見した。Paired Related Homeobox 1 (PRRX1) はホメオドメインを有する転写因子であり、骨格形成に関与するだけでなく、神経幹細胞やグリオーマ幹細胞の維持に重要である (J Neurosci, 2013 / J Mol Cell Biol, 2017) との報告もなされている。また、申請者は PRRX1 の発現減少はヒト間葉系幹細胞の増殖性を低下させるという予備データも得ており、骨肉腫においても PRRX1 によるがん幹細胞の維持機構が存在する可能性が浮上してきた。しかし、PRRX1 の骨肉腫の進行や薬剤感受性に与える影響に関しては不明な点が多く、PRRX1 阻害剤を臨床応用する上で解析すべき課題が多いのが現状である。

2. 研究の目的

ヒト骨肉腫における PRRX1 の発現量と予後との関連性、並びにヒト骨肉腫細胞株を用いて PRRX1 をノックダウンすることで増殖性、浸潤能、遊走能、薬剤感受性および腫瘍原生成への影響を解析する。さらに、PRRX1 ノックダウン後の RNA transcriptome を解析することで、PRRX1 を介したヒト骨肉腫の悪性化機構のメカニズムを解明し、PRRX1 が骨肉腫の有望な治療標的となることを示す。

3. 研究の方法

ヒト骨肉腫患者から採取した組織標本を PRRX1 で免疫染色し、その後染色性と患者の予後との関連性を Kaplan-Meier 法により解析した。また、PRRX1 に対する shRNA をレンチウイルスベクターに組み込むことで、ヒト骨肉腫細胞株である 143B で PRRX1 をノックダウンさせ、増殖能と薬剤感受性への影響は WST-8 アッセイ、浸潤能と遊走能への影響は Boyden chamber を用いた解析、腫瘍原生成への影響は移植実験、RNA transcriptome の解析は RNA-seq により実施した。

4. 研究成果

マウスの骨肉腫自然発症モデルおよびヒト骨肉腫における PRRX1 の発現を免疫染色により評価した結果、それらで PRRX1 の発現が認められ、ヒトにおいては PRRX1 の発現量が高い患者は予後不良ならびに肺転移の増加が観察された (Fig. 1)。

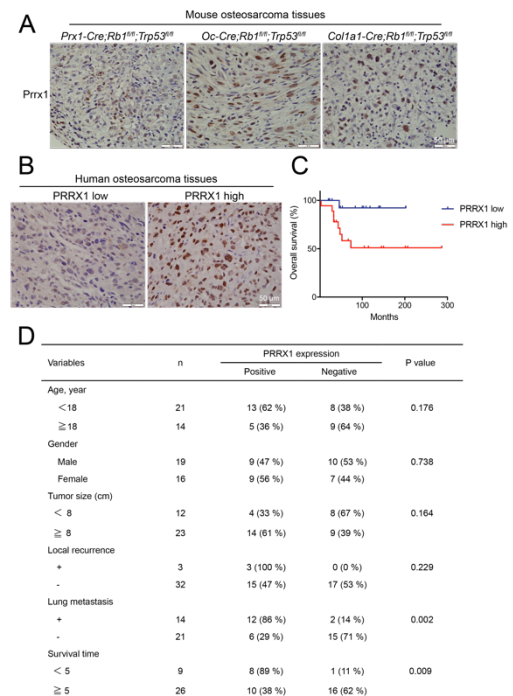


Figure 1. Expression of PRRX1 in mouse or human osteosarcoma tissues.

(A) Immunostaining of Prrx1 in mouse osteosarcoma tissues. Sections derived from *Prrx1-Cre;Rb1^{fl/fl};Trp53^{fl/fl}*, *Oc-Cre;Rb1^{fl/fl};Trp53^{fl/fl}* or *Col1a1-Cre;Rb1^{fl/fl};Trp53^{fl/fl}* osteosarcomas were stained with Prrx1 and representative photos are shown. (B) Immunostaining of PRRX1 in human osteosarcoma tissues. Sections derived from human osteosarcomas were stained with PRRX1, and representative photos of PRRX1-low or PRRX1-high tumors are shown. (C) Comparison of overall survival between PRRX1-low and PRRX1-high osteosarcoma patients. Kaplan-Meier survival curve demonstrates significant (log-rank test, $p < 0.01$) worse overall prognosis for osteosarcoma patients with high expression levels of PRRX1 compared with the PRRX1-low expression group. (D) Correlation of PRRX1 levels with patient clinical and pathological characteristics.

次に、各種ヒト由来骨肉腫細胞株における PRRX1 の発現量をウェスタンブロットによって比較した結果、143B にて高発現が認められたことから、この細胞株を用いて PRRX1 のノックダウン実験を実施した。まず、増殖能と薬剤感受性(ドキシソルビシンとシスプラチン)への影響を解析した結果、PRRX1 ノックダウンによって増殖性の減少および薬剤感受性の増加が観察された (Fig. 2)。

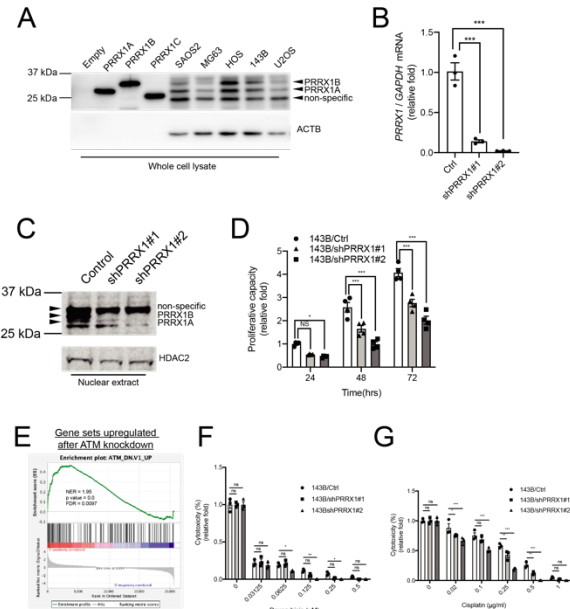


Figure 2. Effects of PRRX1 knockdown on proliferative capacity or drug sensitivity of human osteosarcoma cells.

(A) Detection of PRRX1 in human osteosarcoma cell lines by western blot analysis. Total protein was extracted from the human osteosarcoma cell lines SAOS2, MG63, HOS, 143B, and U2OS, and the expression of PRRX1 in each was assessed compared with cell lysates prepared from HEK293T cells overexpressing each PRRX1 isoform as reference. (B) RT-qPCR analysis of *PRRX1* in 143B cells after PRRX1 knockdown. The 143B cells were infected with a lentivirus encoding each shPRRX1 clone, and total RNA was extracted to compare the expression level of *PRRX1* mRNA. All values were normalized to *GAPDH* mRNA level ($n = 3$) (C) Western blot analysis after PRRX1 knockdown. The 143B cells were infected with lentivirus encoding each shPRRX1 clone, and nuclear lysates were extracted to compare the expression level of PRRX1. (D) Comparison of proliferative capacity by WST-8 assay. The 143B/Ctrl or 143B/shPRRX1#1 or #2 cells were seeded in a 96-well plate, and the OD₄₅₀ was measured at each indicated time point ($n = 4$, two independent experiments). (E) Comparison of the RNA transcriptome after PRRX1 knockdown. RNA-seq of 143B/Ctrl and 143B/shPRRX1#2 was performed, and data were compared by gene sets enrichment analysis (GSEA). Genes upregulated in 143B/shPRRX1#2 were clustered at the left ($n = 2$, two independent experiments). (F, G) Comparison of cisplatin (F) or doxorubicin (G) sensitivity after PRRX1 knockdown. Cells were treated with cisplatin or doxorubicin for 72 h, and the ratio of living cells was assessed by WST-8 assay. The ratio of DMSO-treated cells was set to 100% ($n = 3$, three independent experiments).

次に、PRRX1 ノックダウンの遊走能への影響をスクラッチアッセイと Boyden chamber 法を用いて評価した結果、これらが有意に減少することが判明した。また、浸潤能に関しても Boyden chamber 法で比較を行ったが、PRRX1 ノックダウンにより有意に減少することが判明した (Fig. 3)。

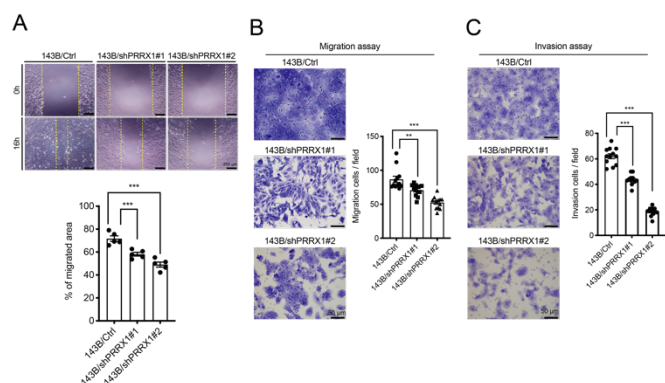


Figure 3. Effects of PRRX1 knockdown on migration or invasion of human osteosarcoma cells.

(A, B) Comparison of migration capacity after PRRX1 knockdown by wound healing assay (A) or migration assay (B). For the wound-healing assay, the relative migration of 143B/shPRRX1#1 or #2 cells was lower than that of 143B/Ctrl at 16 h after scratch wound ($n = 5$, three independent experiments). For the migration assay, transwell plates were used to assess migration. The number of migrated cells was significantly decreased in 143B/shPRRX1#1 or #2 ($n = 12$, three independent experiments). (C) Comparison of invasion capacity after PRRX1 knockdown by invasion assay. Transwell plates were used to assess the invasion. The number of migrated cells was significantly decreased in 143B/shPRRX1#1 or #2 ($n = 12$, three independent experiments).

次に、腫瘍原生能への影響を移植実験によって評価した結果、PRRX1 ノックダウンによって形成される腫瘍内でのアポトーシスには変化は確認出来なかったが、KI67 陽性細胞数の減少と腫瘍サイズの減少が認められ、肺転移に関しては有意に減少していた(Fig.4)。

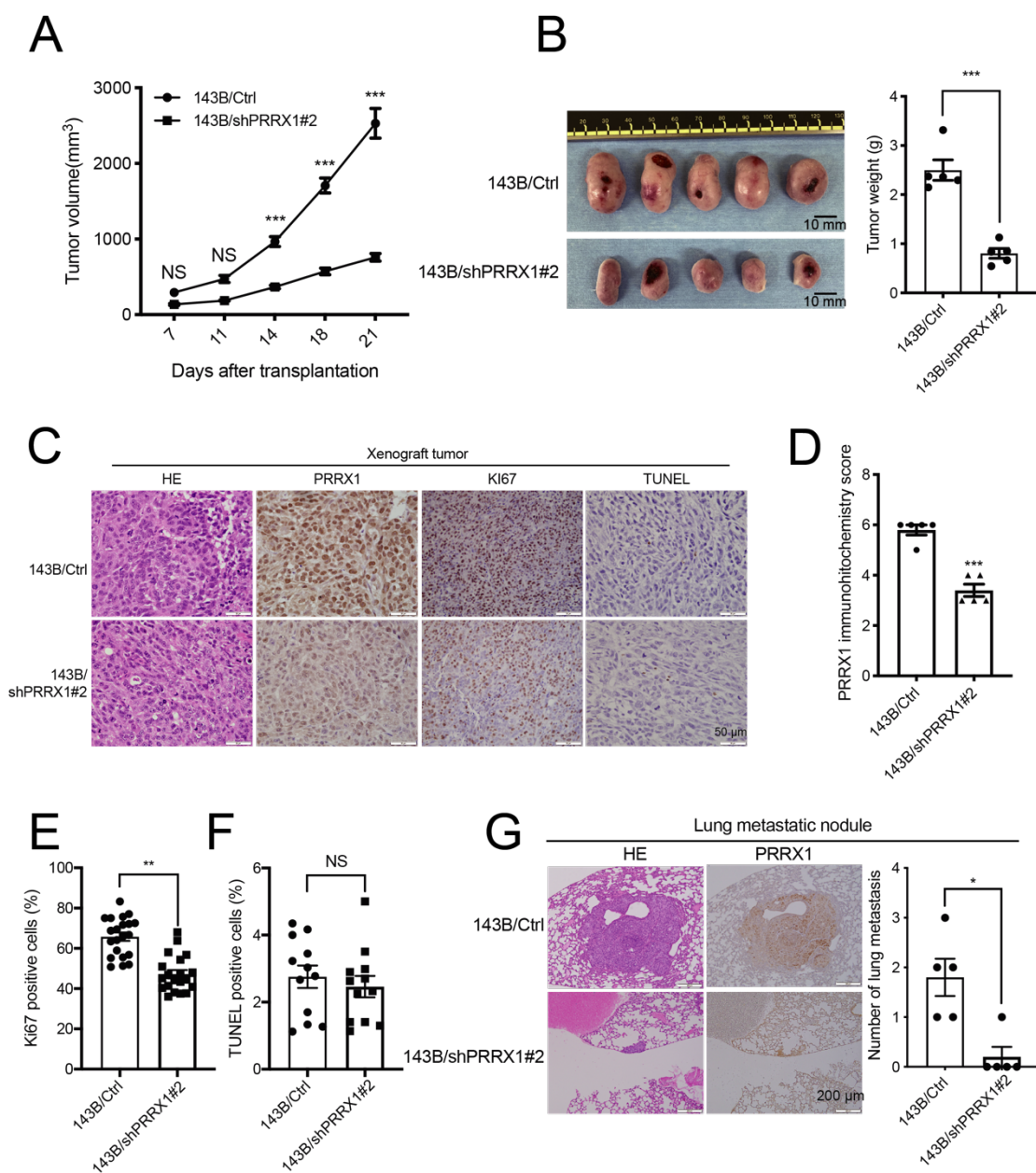


Figure 4. Effects of PRRX1 knockdown on tumor growth.

(A) Comparison of tumor volume after PRRX1 knockdown. The 143B/Ctrl or 143B/shPRRX1#2 cells were subcutaneously transplanted into nude mice, and the tumor volume at each indicated time point was measured (A). At 21 days after transplantation, mice were sacrificed, and the weights of the developed tumors were measured (B) ($n = 5$, three independent experiments). (C) Immunohistological analysis of developed xenograft tumors derived from 143B/Ctrl or 143B/shPRRX1#2 cells. Tumor sections were stained with hematoxylin and eosin (H&E), immunostained for PRRX1 or Ki-67, or stained by TUNEL. Representative photomicrographs are shown. (D, E, F) Quantification of Ki-67- or TUNEL-positive cells in tumors developed from each cell line. Two or three fields in each tumor section were assessed, and the intensity of PRRX1 (D) or the numbers of cells positive for Ki-67 (E) or TUNEL (F) were compared ($n = 5$). (G) Comparison of lung metastasis after PRRX1 knockdown. Lung tissues were harvested 21 days after transplantation, and PRRX1-positive metastatic nodules were quantified. Tissue sections were sampled at 1 mm intervals, and the number of metastatic nodules in each section was added together ($n = 5$).

最後に、PRRX1 ノックダウン後の RNA transcriptome 解析を行った結果、RNA の発現パターンが forskolin を暴露して PKA シグナルを活性化させている際に近くなることが判明した。さらに、ELISA によって PRRX1 ノックダウンによって PKA 活性が増加すること、さらに forskolin 暴露によって 143B の増殖性と遊走能が減少することが判明した (Fig. 5)。

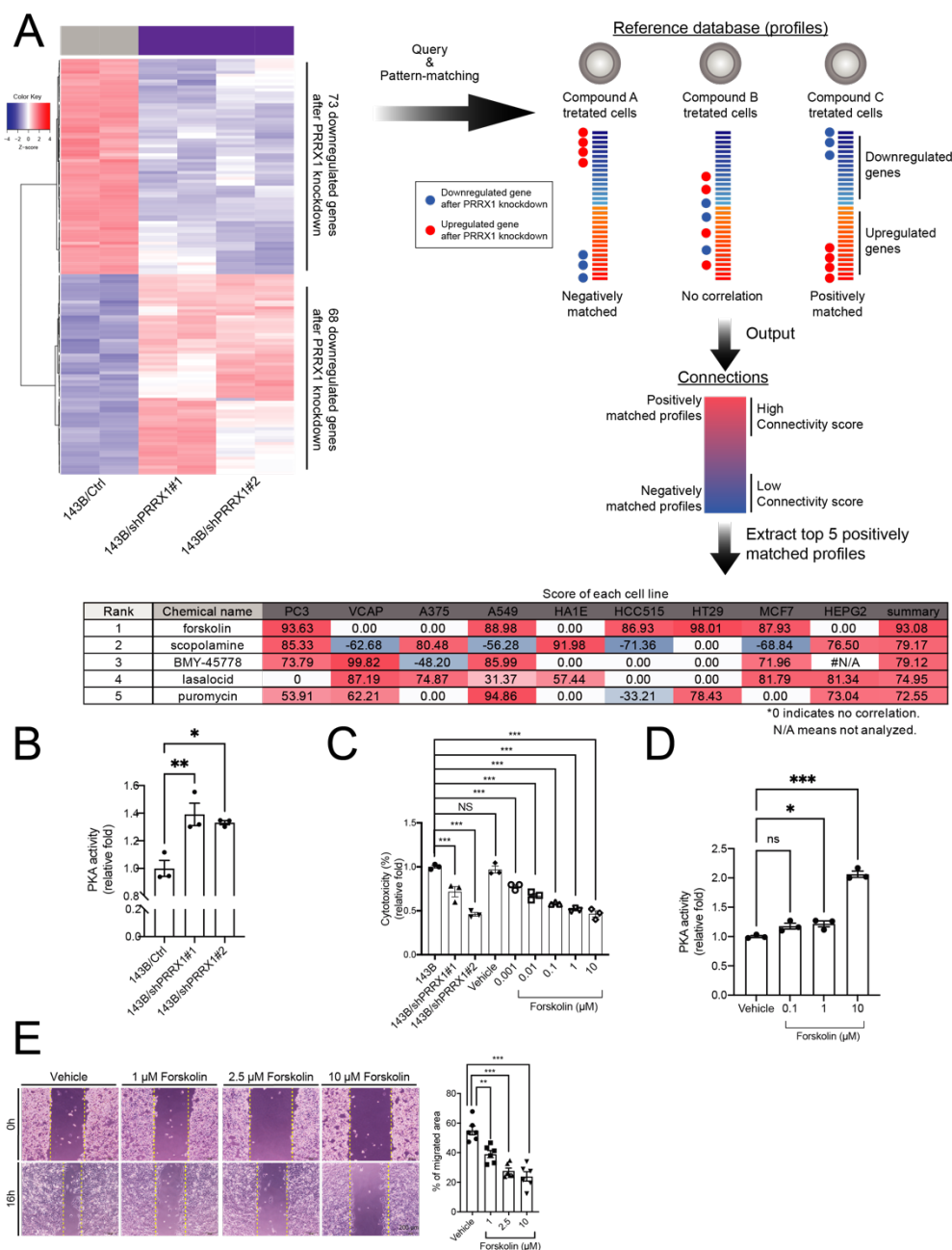


Figure 5. Identification of forskolin as a chemical compound that induces the same RNA expression signatures as those for PRRX1 knockdown in human osteosarcoma cells.

(A) Schematic demonstrating how to perform Connectivity Map analysis. The 73 downregulated or 68 upregulated genes after PRRX1 knockdown ($n = 2$, three independent experiments) were submitted to the reference database, and pattern-matching was performed. Chemical names listed in the top five positively matched profiles are shown (table in the lower panel). (B) PKA activity after PRRX1 knockdown. ($n = 3$, three independent experiments) (C) The effect of forskolin treatment on the proliferative capacity of 143B cells. The 143B cells were treated with indicated doses of forskolin for 72 h, and cytotoxicity was evaluated via WST-8 assay ($n = 5$, two independent experiments). (D) PKA activity after forskolin treatment. Cell were treated with each indicated concentration of forskolin for 24 hours and the PKA activities were compared. ($n = 3$, three independent experiments) (E) Comparison of migration capacity after forskolin treatment by a wound-healing assay. The relative migration of forskolin-treated cells was lower than that of the vehicle-treated cells (0.1% DMSO) at 16 h after scratching ($n = 5$, three independent experiments).

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計1件（うち査読付論文 0件 / うち国際共著 0件 / うちオープンアクセス 0件）

| | |
|---|-------------------------------|
| 1. 著者名 Joko Ryoji, Yamada Daisuke, Nakamura Masahiro, Yoshida Aki, Takihira Shota, Takao Tomoka, Lu Ming, Sato Kohei, Ito Tatsuo, Kunisada Toshiyuki, Nakata Eiji, Ozaki Toshifumi, Takarada Takeshi | 4. 巻 14 |
| 2. 論文標題 PRRX1 promotes malignant properties in human osteosarcoma | 5. 発行年 2021年 |
| 3. 雑誌名 Translational Oncology | 6. 最初と最後の頁 100960 ~ 100960 |
| 掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.tranon.2020.100960 | 査読の有無 無 |
| 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0件

〔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 |
|---------|---------|
|---------|---------|