

令和 2 年 5 月 21 日現在

機関番号：32612

研究種目：若手研究

研究期間：2018～2019

課題番号：18K15249

研究課題名(和文)骨肉腫に対するWntシグナルを標的とした治療法の検討

研究課題名(英文) Investigation of Wnt-signaling-targeted therapy for osteosarcoma

研究代表者

弘實 透 (Hirozane, Toru)

慶應義塾大学・医学部(信濃町)・助教

研究者番号：70594539

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,200,000円

研究成果の概要(和文)：本研究の目的は、骨肉腫に対するWntシグナル・TNIKを標的とした治療の作用機序と有効性を明らかにし、臨床の現場へと成果を還元する事である。申請者らは骨肉腫に対するWntシグナルを標的とした治療法を、Wntシグナルを正に制御するTNIKに着目し、研究を行った。本研究の結果から骨肉腫に対し、TNIKが治療標的となりうる事、その作用機序としてはがん幹細胞性の喪失、代謝変動を伴った脂肪細胞への分化転換誘導という新しい機序が示唆された。臨床応用へ向け、TNIK阻害剤のコンパニオンマーカーの検討などをさらに行っていく予定である。

研究成果の学術的意義や社会的意義

骨肉腫に対する薬物治療としては、20-30年来、細胞障害性の抗がん剤を主体とした治療法が中心であり、有効な分子標的が見つかっていない。本研究から骨肉腫に対し、Wntシグナル・TNIKを標的とした治療法の有効性が示唆された。

研究成果の概要(英文)：The purpose of this study was to clarify the mechanism of action and efficacy of Wnt-signal-TNIK-targeted therapy for osteosarcoma, and to apply the results to clinical practice. We focused on TNIK, which positively regulates Wnt signaling, to study the treatment of osteosarcoma by targeting Wnt signaling. The results of this study suggested that TNIK could be a potential therapeutic target for osteosarcoma and suggested new mechanisms of action, such as loss of cancer stemness and induction of conversion to adipocytes with metabolic changes. We plan to further investigate companion markers of TNIK inhibitors for clinical application.

研究分野：骨軟部腫瘍

キーワード：骨肉腫 Wntシグナル がん幹細胞性 分化転換

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

#### 1. 研究開始当初の背景

Wnt シグナルが骨肉腫の治療標的となる可能性が多く報告されている。TNIK は Wnt シグナルの活性を TCF4,  $\beta$  カテニンと結合し, 最下流で正に制御する重要な因子である。大腸癌では Wnt シグナルの活性化が発がんに関与する事が知られており, TNIK は大腸癌における有効な治療標的となりうる可能性が報告された(文献 1, 2)。骨肉腫は大腸癌同様に Wnt シグナルの亢進が発生に関与する事が示唆されている肉腫の一つである。しかし TNIK が骨肉腫の発生や治療標的として実際にどのような機能を有しているかは未だ報告がない。そこで, 申請者は骨肉腫に対する TNIK を介した Wnt シグナル阻害の有効性の検証を行った。

#### 2. 研究の目的

本研究の目的は, 骨肉腫に対する Wnt シグナル・TNIK を標的とした治療の作用機序と有効性を明らかにし, 臨床の現場へと成果を還元する事である。

#### 3. 研究の方法

骨肉腫細胞における TNIK 発現の評価, siTNIK および TNIK 阻害剤による抗腫瘍効果の検討, TNIK 阻害剤による遺伝子発現変動の RNA-Seq 解析, TNIK 阻害剤によるがん幹細胞性制御の検討, TNIK 阻害剤による脂肪細胞分化への影響検討, TNIK 阻害剤による細胞内代謝への影響, メタボローム解析を行った。

#### 4. 研究成果

骨肉腫に対する薬物治療としてはメソトレキセート, アドリアマイシン, シスプラチンを中心とした細胞障害性の抗がん剤を用いるのが, この 20-30 年変わっておらず, 長年有効な新規治療薬が望まれている。これまでに, 様々な研究がなされているが, 未だ有効な分子標的薬は存在しないのが現状である。すなわち骨肉腫は有効な分子標的が見つかっていない代表的な希少がんの一つである。Wnt シグナルは, 骨肉腫の発生や化学療法抵抗性, 予後などに関与する事が知られており, 治療標的となりうるものと考えられている。そこで, 申請者らは骨肉腫に対する Wnt シグナルを標的とした治療法を, Wnt シグナルを正に制御する TNIK に着目(文献 1)し, 研究を開始した。過去の研究(文献 2)同様に, TNIK 阻害剤として NCB-0846 (846), コントロールには Vehicle もしくは NCB-0846 の光学異性体で TNIK 阻害活性を持たない NCB-0970 (970)を用いて研究を行った。

骨肉腫培養細胞株, 臨床検体組織タンパク, 組織標本を用いた検討で, 骨肉腫では核内に TNIK が局在しており, 活性型の TNIK 発現が確認された。また siTNIK および TNIK 阻害剤により, 9 つの骨肉腫細胞株の増殖抑制効果が認められた。また NOS-10 骨肉腫細胞を用いた Xenograft モデルでも同様に細胞増殖抑制効果が認められた。RNA-Seq 解析から, TNIK 阻害剤は代謝にかかわる遺伝子発現を正に, Wnt シグナルおよび幹細胞性の維持に関与する遺伝子発現を負に制御する事が明らかとなった。

がん幹細胞性に関わるアッセイおよび幹細胞の制御に関わる遺伝子発現を検討した所, TNIK 阻害剤により骨肉腫細胞のがん幹細胞性抑制効果が確認された。過去の報告(文献 3)から, Wnt シグナル阻害により脂肪細胞への分化が示唆されていた事に着目し, TNIK・Wnt シグナル阻害による骨肉腫細胞がん幹細胞性の喪失とともに, 骨肉腫細胞の脂肪細胞への分化傾向を検討した。脂肪細胞への分化誘導カクテルを用いる事無く, TNIK 阻害剤のみで骨肉腫細胞の脂肪細胞

への Direct な分化傾向（分化転換）が，脂肪染色，PPAR の発現上昇などから確認された．

また，幹細胞性の喪失および脂肪細胞への分化転換は Xenograft モデルでも同様の結果が得られた．TNIK 阻害剤による細胞内代謝変動の検討としてメタボローム解析を行い，(糖)代謝の亢進，アセチル CoA・マロニル CoA の増大が認められ，グルコースから脂肪を生成する方向へ代謝変動が起きている事が確認された．以上の結果をまとめ，現在論文投稿中である．

本研究の結果から骨肉腫に対し，Wnt シグナル・TNIK が治療標的となりうる事，その作用機序としてはがん幹細胞性の喪失，代謝変動を伴った脂肪細胞への分化転換誘導という新しい機序が示唆された．TNIK が骨肉腫に対する有望な治療標的となりうるものと考え，臨床応用へ向けたコンパニオンマーカーの検討などをさらに行っていく予定である．また肉腫全般において，Wnt シグナルは比較的高いという報告もあり，今後は肉腫に対する Wnt シグナルを標的とした治療法の探索を検討している．

肉腫はその希少性が相まって，積極的な研究地盤の確立や新しい診断・治療法が非常に開発されにくい経緯があるため，臨床現場における有望・有効・有意義になる様なアンメットニーズを満たす為の施策を引き続き模索していく．

#### 参考文献

1. Shitashige M. et al. Traf2- and Nck-interacting kinase is essential for Wnt signaling and colorectal cancer growth. *Cancer Res.* 2010.
2. Masuda M. et al. TNIK inhibition abrogates colorectal cancer stemness. *Nature Commun.* 2016.
3. Ross SE. et al. Inhibition of Adipogenesis by Wnt Signaling. *Science.* 2000.

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計2件（うち査読付論文 2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 Otani S, Nakayama R, Sekita T, Hirozane T, Asano N, Nishimoto K, Sasaki A, Okita H, Morioka H, Nakamura M, Matsumoto M.	4. 巻 3
2. 論文標題 Pseudomyogenic hemangioendothelioma of bone treated with denosumab: a case report.	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 BMC Cancer	6. 最初と最後の頁 872
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） なし	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 Yoda Y, Yamaguchi SI, Hirozane T, Asano N, Seki A, Morioka H, Nakayama R, Nakamura M, Matsumoto M.	4. 巻 10
2. 論文標題 Preservation of the Epiphysis and Growth Plate in the Surgical Management of Femoral Osteosarcoma in a Skeletally Immature Patient by Intercalary Resection and Biological Reconstruction: A Case Report.	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Case Rep Oncol	6. 最初と最後の頁 513-522
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） なし	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11件（うち招待講演 0件/うち国際学会 4件）

1. 発表者名 弘貫透, 齊藤誠人, 中川瑠美, 浅野尚文, 菊田一貴, 須佐美知郎, 堀内圭輔, 渡部逸央, 穴澤卯圭, 森井健司, 中村雅也, 松本守雄, 中山口バート
2. 発表標題 軟骨芽細胞腫18例の治療成績
3. 学会等名 日本整形外科学会骨・軟部腫瘍学術集会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 弘貫透, 浅野尚文, 中村雅也, 松本守雄, 中山口バート
2. 発表標題 腰部軟部組織に原発した神経内分泌腫瘍の1例
3. 学会等名 日本癌治療学会学術集会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 弘貫透, 齊藤誠人, 浅野尚文, 中村雅也, 松本守雄, 中山口バート
2. 発表標題 軟骨芽細胞腫10例の治療経験
3. 学会等名 日本整形外科学会学術総会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 弘貫透
2. 発表標題 TNIK阻害による骨肉腫細胞の分化転換誘導とその分子機構
3. 学会等名 大阪大学蛋白質研究所セミナー Wnt研究会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 弘貫透, 齊藤誠人, 浅野尚文, 中村雅也, 松本守雄, 中山口バート
2. 発表標題 小児に発生した動脈瘤様骨嚢腫9例の治療経験
3. 学会等名 日本小児整形外科学会学術集会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 弘貫透, 増田万里, 浅野尚文, 小林英介, 川井章, 堀内圭輔, 澤匡明, 森岡秀夫, 松本守雄, 中村雅也, 山田哲司
2. 発表標題 骨肉腫に対するTNIK阻害剤の臨床応用へ向けた開発
3. 学会等名 日本整形外科学会基礎学術集会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 弘貫透, 増田万里, 浅野尚文, 小林英介, 川井章, 堀内圭輔, 松本守雄, 中村雅也, 澤匡明, 森岡秀夫, 山田哲司
2. 発表標題 メベンダゾールの骨肉腫治療における可能性
3. 学会等名 日本整形外科学会学術総会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 Hirozane T
2. 発表標題 CLINICAL FEATURES OF CHONDROBLASTOMA: A REVIEW OF 19 CASES
3. 学会等名 Connective Tissue Oncology Society (CTOS) (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Hirozane T
2. 発表標題 Clinical features of chondroblastoma:A review of 18 cases
3. 学会等名 International Symposium on Limb Salvage (ISOLS) (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Hirozane T
2. 発表標題 TNIK IS A NOVEL MOLECULAR TARGET FOR OSTEOSARCOMA TREATMENT AND CONTROLS OSTEOSARCOMA CELL FATE
3. 学会等名 Connective Tissue Oncology Society (CTOS) (国際学会)
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 Hirozane T
2. 発表標題 TRAF2 and NCK-interacting protein kinase (TNIK) regulates cancer stemness and adipogenesis of osteosarcoma cells
3. 学会等名 American Association for Cancer Research (AACR) (国際学会)
4. 発表年 2018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
--	---------------------------	-----------------------	----