

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

令和 4 年 6 月 3 日現在

機関番号：15301

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2019～2021

課題番号：19K09551

研究課題名(和文) 悪性軟部腫瘍に対する新しい複合がん免疫療法の開発

研究課題名(英文) Development of new combined cancer immunotherapy for malignant soft tissue tumor

研究代表者

中田 英二 (Nakata, Eiji)

岡山大学・医歯薬学域・講師

研究者番号：10649304

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)：高肺転移株である骨肉腫細胞株でPRRX1をノックダウンし、WST-8 assayで増殖能を計測すると、増殖が強く抑制されることを確認した。この細胞をマウスに移植すると、コントロール群に比べ増殖が抑制された。また、PRRX1をノックダウンさせた骨肉腫細胞をmigration assayで検討するとコントロール群に比べ浸潤する細胞数が減少していた。さらに、PRRX1をノックダウンさせた骨肉腫細胞をマウスの皮下に移植し、6週後にマウスの肺を取り出し肺転移数やサイズをコントロール群と比較した。すると、PRRX1をノックダウンさせた骨肉腫細胞群の方が肺転移巣の数が少ないことが判明した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

骨肉腫は四肢に多く発生し、肺転移を起こす予後不良な悪性腫瘍である。有効な化学療法はほとんど開発されておらず、進行例に対する新規抗がん剤の開発が期待されている。我々の結果からPRRX1が骨肉腫の腫瘍細胞の増殖だけでなく、移動能・浸潤能に強く影響していることが明らかとなった。したがって、PRRX1は骨肉腫において、増殖および肺転移を促進している可能性を考えた。骨肉腫細胞株に対するPRX1阻害に関する研究はこれまで報告がなく、我々の研究は、骨肉腫に対する新規治療の開発につながる、非常に重要な研究と考えている。

研究成果の概要(英文)：When PRRX1 was knocked down in an osteosarcoma cell line, which is a hyperlung metastatic strain, and the proliferative capacity was measured by the WST-8 assay, it was confirmed in vitro that the proliferation was strongly suppressed. It was also confirmed that when these cells were transplanted into mice, proliferation was suppressed as compared with the control group. In addition, when the osteosarcoma cells in which PRRX1 was knocked down were examined by wound healing assay and migration assay, the number of invading cells was reduced compared to the control group. Furthermore, osteosarcoma cells in which PRRX1 was knocked down were transplanted under the skin of mice, and 6 weeks later, the lungs of the mice were taken out and the number and size of lung metastases were compared with those of the control group. Then, it was found that the osteosarcoma cell group in which PRRX1 was knocked down had a smaller number of lung metastases.

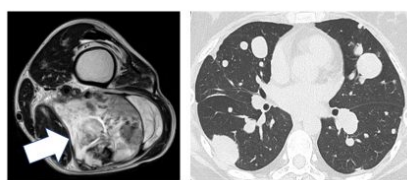
研究分野：整形外科

キーワード：骨肉腫 転移 浸潤 PRX1

## 1. 研究開始当初の背景

悪性骨・軟部腫瘍は四肢に多く発生し、肺転移を起こす予後不良な悪性腫瘍である (図 1)。有効な化学療法はほとんど開発されておらず、進行例に対する新規抗がん剤の開発が期待されている。最近、免疫チェックポイント阻害剤の登場によりがん治療は大きく進歩している (図 2)。しかし、免疫チェックポイント阻害剤の有効性には限界があり、最近、他剤との併用により、治療効果を改善させる治療法が開発中である。Paired related homeobox 1 (PRX1) という遺伝子は骨格発生過程における未分化間葉系組織に強く発現し、生体の MSC にも発現が認められている。PRX1 は胎生期の骨格形性において極めて重要な役割を果たしており、ノックアウトマウスは致命的で、死産となる (図 3)。公共データベース (Gene Expression Profiling Interactive Analysis) から、一部の肉腫で PRX1 が高発現していることが判明した。そこで、軟部肉腫 (未分化多形性肉腫) における PRX1 の発現を調べると、腫瘍の核に PRX1 の発現を強く認めた。

そこで我々は、PRX1 が肉腫の増殖に関与している可能性があると考え、マウスの線維肉腫細胞とヒトの未分化多形性肉腫で PRX1 をノックダウンすると、増殖が抑制された。また、PRX1 が免疫チェックポイント阻害剤の効果のキーとなる Programmed Death-Ligand 1 (PD-L1) を制御することを確認した。したがって、PRX1 阻害剤と免疫チェックポイント阻害剤 (ニボルマブ) を併用した複合がん免疫療法が骨・軟部肉腫に対しより効果が得られると考えた。そこで、我々は、さらに複数の肉腫細胞株で PRX1 の発現を抑制し、細胞増殖が低下することを *in vivo* と *in vitro* で調べることとした。



軟部肉腫 多発肺転移  
図1. 肺転移をおこした軟部肉腫

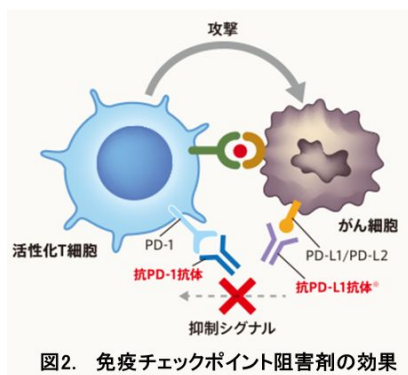


図2. 免疫チェックポイント阻害剤の効果

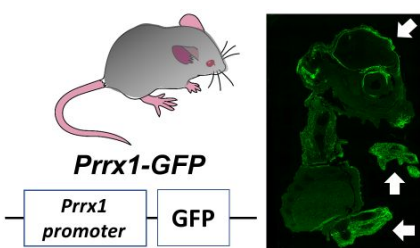


図3. マウスにおけるPRX1の発現  
四肢、頭蓋骨にPRX1の発現を認める

## 2. 研究の目的

本研究の目的は、肉腫に対する新規治療法を確立すべく、PRX1 阻害による肉腫細胞の増殖抑制を *in vivo*、*in vitro* で確認し、そのメカニズムを解明することである。また、軟部肉腫に対する新しい複合がん免疫療法を確立すべく、PRX1 阻害とニボルマブの抗がん作用を *in vivo*、*in vitro* で解明することである。

## 3. 研究の方法

本研究は以下のように PRX1 阻害による骨肉腫細胞株の増殖および遠隔転移抑制効果を *in vivo* および *in vitro* で検討する。また PRX1 発現上昇による骨肉腫の遠隔転移のメカニズムの解明を行う。

骨肉腫の肺転移巣における PRRX1 の発現の検討  
 PRRX1 阻害による骨肉腫の増殖抑制と肺転移抑制効果  
 PRRX1 過剰発現による骨肉腫の肺転移促進効果  
 PRRX1 の機能解析:遠隔転移のメカニズム、シグナル経路の解析  
 解析されたシグナル経路と同様の動向を示す薬剤の特定  
 続いて、PRX1 阻害とニボルマブの抗がん作用を in vivo、in vitro で解明する。

#### 4 . 研究成果

我々は PRRX1 が MSC 由来の骨肉腫にも発現していることを免疫染色で確認した。骨肉腫の肺転移や再発例では腫瘍細胞の核に PRRX1 の発現を強く認めた(図 4)。一方、再発・転移を認めない症例はほぼ全例陰性であった。PRRX1 の発現が強い症例は有意に予後不良であった(図 5)。さらに、shPRRX1 を挿入したレンチウイルスを用い、高肺転移株である骨肉腫細胞株 (143B)で PRRX1 をノックダウンし、WST-8 assay で増殖能を計測すると、増殖が強く抑制されることを in vitro で確認した。また、この細胞をマウスに移植すると、コントロール群に比べ増殖が抑制されることを確認した(図 6)。また、PRRX1 をノックダウンさせた骨肉腫細胞 (143B)を wound healing assay および migration assay で検討すると、いずれもコントロール群に比べ浸潤する細胞数が減少していた(図 7)。さらに、PRRX1 をノックダウンさせた骨肉腫細胞 (143B)をマウスの皮下に移植し、6 週後にマウスの肺を取り出し肺転移数やサイズをコントロール群と比較した。すると、PRRX1 をノックダウンさせた骨肉腫細胞群の方が、コントロール群と比べ、肺転移巣の数が少ないことが判明した。これらの結果から PRRX1 が骨肉腫の腫瘍細胞の増殖だけでなく、移動能・浸潤能に強く影響していることが明らかとなった。したがって、PRRX1 は骨肉腫において、増殖および肺転移を促進している可能性を考えた。

肺転移なし: ほぼ発現なし      肺転移あり: 発現強い

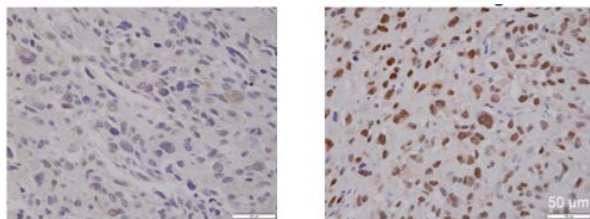


図4. 骨肉腫細胞の核におけるPRRX1の発現

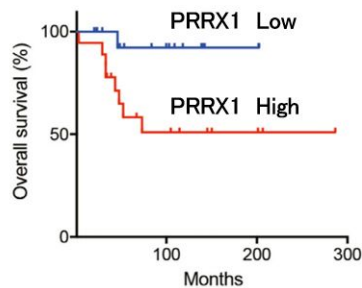
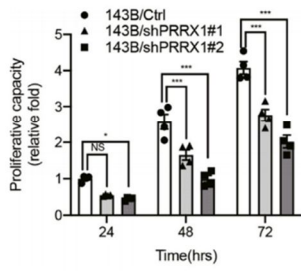


図5.

PRRX1の発現  
 が強い骨肉腫  
 は予後不良

**In vitro**  
PRRX1ノックダウンで増殖能低下



**In vivo**  
PRRX1ノックダウンで増殖能低下

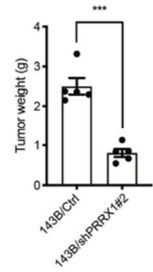
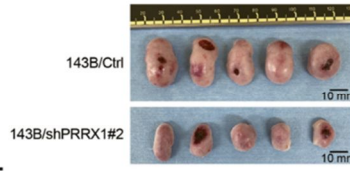
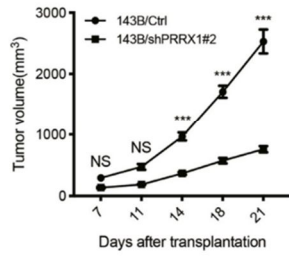


図6. PRRX1 をノックダウンした骨肉腫細胞株の増殖

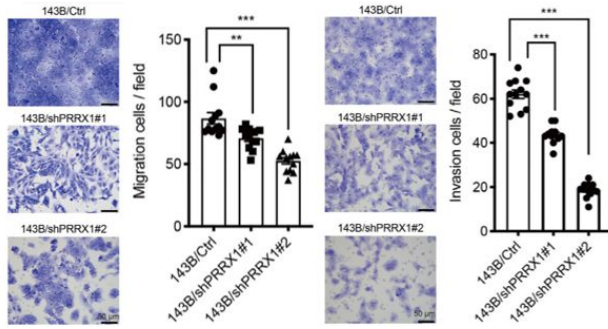


図7  
PRRX1 ノックダウンにより  
骨肉腫細胞株の移動能、  
浸潤能が低下した

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 0件 / うちオープンアクセス 0件）

1. 著者名 Joko Ryozi	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 Transl Oncol .	6. 最初と最後の頁 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 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2件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 1件）

1. 発表者名 上甲良二
2. 発表標題 骨肉腫におけるPRRX1の発現は悪性化に關与する
3. 学会等名 第134回 中部日本整形外科災害外科学会学術集会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 上甲良二
2. 発表標題 PRRX1 expression is involved in the malignant transformation of osteosarcoma
3. 学会等名 Orthopaedic Research Society 2020 Annual Meeting (国際学会)
4. 発表年 2020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	宝田 剛志  (Takadada Takeshi)  (30377428)	岡山大学・医歯薬学域・教授    (15301)	

6. 研究組織（つづき）

	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	尾崎 敏文  (Ozaki Toshifumi)  (40294459)	岡山大学・医歯薬学域・教授    (15301)	
研究分担者	山田 大祐  (Yamada Daisuke)  (50733680)	岡山大学・医歯薬学域・助教    (15301)	
研究分担者	伊藤 達男  (Tastuo Ito)  (80789123)	川崎医科大学・医学部・講師    (35303)	
研究分担者	上甲 良二  (Ryoji Zyoko)  (80847856)	岡山大学・大学病院・医員    (15301)	

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