

令和 5 年 6 月 8 日現在

機関番号：82504

研究種目：若手研究

研究期間：2019～2022

課題番号：19K16760

研究課題名(和文)骨肉腫の肺転移における分子機序解明と新規治療薬の探索

研究課題名(英文)Elucidation of molecular mechanisms and development of novel therapeutic agents in pulmonary metastasis of osteosarcoma

研究代表者

木下 英幸(Kinoshita, Hideyuki)

千葉県がんセンター(研究所)・整形外科・医長

研究者番号：50797115

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 1,800,000円

研究成果の概要(和文)：骨肉腫は局所増大と肺転移により予後が悪くなるため両者の制御が重要である。本研究では骨肉腫における酸化・還元(レドックス)制御の解明とともに、チオレドキシンおよびチオレドキシ還元酵素阻害剤であるPX-12とオーラノフィン(AUR)に着目した。PX-12は局所増大を、AURは肺転移も抑制した。また他の酸化ストレス誘発剤との相乗効果も検討するためにセレコキシブとAURの併用も検討した。両者併用により骨肉腫の局所増大を相乗的に抑制した。また骨肉腫と軟骨肉腫の患者腫瘍組織移植モデル(Patient-derived xenografts:PDX)作成に成功し、今後の研究で応用する予定である。

研究成果の学術的意義や社会的意義

骨・軟部肉腫ではレドックス制御の報告は限られており、本研究のさらなる発展によりレドックス関連阻害剤の骨・軟部肉腫への応用が期待できる。また、AURはすでに本邦において承認されており、抗リウマチ薬としても用いられている安全性の高い内服薬である。近年、ドラッグリポジショニングが注目されており、今後AURの骨肉腫への効果がPDX等でも証明できれば、AURの臨床応用も早期可能であると考えられる。またPDXはヒトの病態に最も近いモデルであり、現在骨肉腫も含めた様々な骨・軟部肉腫のPDX作成を継続しており、今後のレドックス制御の解明を含め様々な研究の基盤になると考える。

研究成果の概要(英文)：Osteosarcoma has a poor prognosis due to local progression and pulmonary metastasis, both of which must be controlled. In the current study, we focused on thioredoxin and thioredoxin reductase inhibitors, PX-12 and auranofin (AUR), to elucidate the involvement of oxidative and reductive (redox) regulation in osteosarcoma, respectively. PX-12 inhibited local progression and AUR also inhibited pulmonary metastasis. The combination of celecoxib and AUR was also examined to determine synergistic effects with other oxidative stress-inducing agents. The combination of celecoxib and AUR synergistically suppressed local progression of osteosarcoma. Patient-derived xenografts (PDX) models of osteosarcoma and chondrosarcoma were successfully generated and will be applied in future studies.

研究分野：骨・軟部肉腫

キーワード：骨肉腫 レドックス チオレドキシン (TXN) PX-12 TXN還元酵素 (TXNRD) オーラノフィン (AUR) 患者腫瘍組織移植モデル(PDX)

科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属します。

1. 研究開始当初の背景

骨肉腫 (Osteosarcoma: OS) は、思春期や若年層に多く発生するまれな悪性腫瘍である。OS の治療は、手術と術後の化学療法となる。小児患者に対する標準的な化学療法では、ドキシソルビシン、シスプラチン、高用量のメトトレキサートが使用される。しかし、OS の 5 年生存率は良好とは言えず、肺転移を有する患者ではさらに低下する。現在行われている化学療法には、副作用の強い従来の細胞傷害性薬剤が含まれており、新規治療薬の開発が望まれる。一方、酸化還元 (レドックス) システムは、細胞の様々な代謝機能を調節する必須なシステムである。レドックスシステムの重要な分子であるチオレドキシシン (TXN) は、がんや肉腫など各種の疾患の発症に関連する活性酸素種 (ROS) を消去するのに積極的な役割を果たしている。TXN 還元酵素 (TXNRD) は、TXN を還元し、TXN の活性を制御する酵素である。しかし、OS の局所進行および肺転移に対する TXN や TXNRD の関与やそれら阻害剤の効果についての報告はない。

2. 研究の目的

OS におけるレドックス制御の分子機序解明とそれら阻害剤の効果を検討すること、並行して OS も含めた骨・軟部肉腫の PDX (patient-derived xenograft) を作成することである。

3. 研究の方法

- ① 公開されたマイクロアレイデータ (R2 genomics analysis and visualization platform) を用いて OS 患者の TXN と TXNRD 遺伝子の発現量と OS 患者における無遠隔転移生存率および全生存率の関係を Kaplan-Meier 生存解析により評価した。
- ② 高肺転移骨肉腫細胞株である LM8 を PX-12 (TXN 阻害剤) とオーラノフィン (AUR) (TXNRD 阻害剤) で刺激し、下記の評価を行った。生存率および増殖率に関しては MTT assay を、経時的細胞増殖の評価は IncuCyte® cell proliferation assay を用いた。細胞内のアポトーシス関連タンパク質に関しては MAPK のうち p38 および JNK と Cleaved-Caspase 3 をウェスタンブロットにより評価した。さらに Caspase 活性に関しては Caspase assay を行った。遊走能に関しては Wound healing assay にて評価した。
- ③ 動物実験としては、5 週齢雌 C3H/HeS1c の背部に LM8 を移植した。一週後にコントロール群、PX-12 群と AUR 群 (n:6) に分け、それぞれ局所の腫瘍サイズが均等になるように群分けした。その時点より溶媒(コントロール)、12.5 mg/kg PX-12 もしくは 10 mg/kg AUR を毎日腹腔内投与した。投与開始 5 週後に屠殺して評価するまで、体重および局所腫瘍サイズを測定した。屠殺した後に局所腫瘍の重量および肺転移の結節数と HE (Hematoxylin and eosin) 染色を行った。

④ 酸化ストレス誘発剤であるセレコキシブと AUR を併用した群も作成し、上記③と同様の実験を行った。

⑤ 当院の骨・軟部肉腫患者の生検および手術検体をヌードマウスの大腿四頭筋に移植し、PDX 作成を行った。

4. 研究成果

① TXN と TXNRD 遺伝子の高レベル発現は、OS 患者の遠隔転移および全生存率の負の予後因子であったことから TXN と TXNRD が OS の局所進展および遠隔転移に関連する治療標的となる可能性が示唆された。

② PX-12 と AUR は用量・時間依存的に OS の細胞死を誘導した。さらに、低用量の両阻害剤は、細胞増殖アッセイにおいて LM8 の増殖を阻害した。ウェスタンブロッティングにより、両阻害剤は p38, JNK のリン酸化と活性化、および Caspase 3 の切断を誘導し、LM8 細胞のアポトーシスを誘導することが示唆された。Caspase assay では、両阻害剤はコントロールと比較して 2 倍の Caspase 活性を誘導した。さらに、Caspase 阻害剤である Z-VAD-FMK は、両阻害剤によって誘導された LM8 の細胞死を有意に回復させた。グルタチオンの前駆体である抗酸化物質の NAC は、両阻害剤による MAPK タンパク質の活性化と Caspase 3 の切断を抑制した。さらに、NAC は、AUR によって引き起こされた LM-8 の細胞死を有意に抑制した。このことは、AUR が酸化ストレス-MAPK-Caspase 3 経路を介して細胞死を引き起こした可能性を示唆している。また、両阻害剤は顕微鏡学的に時間依存的な LM8 細胞の遊走を抑制した。さらに定量評価においても時間依存的な LM8 細胞の遊走を抑制した。

③ PX-12 は OS の局所進展を有意に抑制した(図 1)。AUR に関しては局所進展に関しては抑制効果が乏しかったが、肺転移を有意に抑制した(図 2-3)。

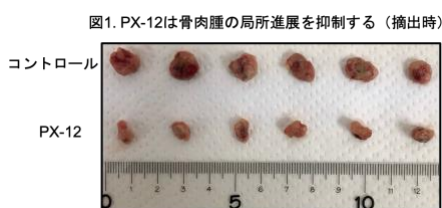
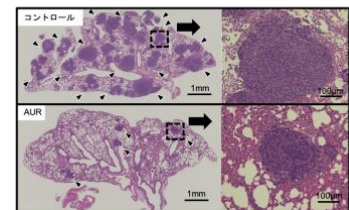


図3. AUR群はコントロール群と比べて病理学的肺転移結節を抑制する



④ セレコキシブと AUR を併用した群ではマウスの骨肉腫の局所腫瘍進展を有意に抑制し、併用により相乗効果が認められた。

⑤ 骨・軟部肉腫の 20-30 検体をヌードマウスに移植し、類上皮肉腫(2 株)と横紋筋肉腫の PDX を確立した。また通常型骨肉腫、間葉性軟骨肉腫、通常型軟骨肉腫、血管肉腫、滑膜肉腫に関しては、第 1 世代 PDX の作成に成功した。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計16件（うち査読付論文 16件／うち国際共著 0件／うちオープンアクセス 7件）

1. 著者名 Kinoshita H, Kamoda H, Hagiwara Y, Kinoshita S, Ohtori S, Yonemoto T.	4. 巻 2(6)
2. 論文標題 Prognostic Factors for Survival in Patients With High-grade Chondrosarcoma	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Cancer Diagn Progn.	6. 最初と最後の頁 681-685.
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.21873/cdp.10159	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 Kinoshita H, Kamoda H, Hagiwara Y, Ishii T, Ohtori S, Yonemoto T.	4. 巻 42(4)
2. 論文標題 Clavícula Pro Humero Reconstruction for Malignant Tumor of the Proximal Humerus in Children and Adults	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Anticancer Res.	6. 最初と最後の頁 2139-2144.
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.21873/anticanres.15696	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 Kinoshita H, Yonemoto T, Kamoda H, Hagiwara Y, Tsukanishi T, Inoue M, Terakawa F, Ohtori S, Ishii T.	4. 巻 41(2)
2. 論文標題 Effectiveness of Salvage Knee Rotationplasty on Sarcoma Around the Knee in Adolescents and Young Adults.	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Anticancer Res.	6. 最初と最後の頁 1041-1046.
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.21873/anticanres.14860	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 Kinoshita H, Yonemoto T, Kamoda H, Hagiwara Y, Tsukanishi T, Inoue M, Terakawa F, Ohtori S, Ishii T.	4. 巻 41(8)
2. 論文標題 Poor efficacy of postoperative radiotherapy in infiltrative high-grade soft tissue sarcomas.	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Anticancer Res.	6. 最初と最後の頁 4027-4032.
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.21873/anticanres.15202	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 Kinoshita H, Shimozato O, Ishii T, Kamoda H, Hagiwara Y, Tsukanishi T, Ohtori S, Yonemoto T.	4. 巻 41(10)
2. 論文標題 The thioredoxin reductase inhibitor auranofin suppresses the pulmonary metastasis of osteosarcoma, but not local progression.	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Anticancer Res.	6. 最初と最後の頁 4947-4955
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.21873/anticancerres.15308	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 Kinoshita H, Hagiwara Y, Kamoda H, Hagiwara Y, Tsukanishi T, Ishii T, Ohtori S, Yonemoto T.	4. 巻 41(12)
2. 論文標題 Doxorubicin Combined With Ifosfamide for Sarcoma Induces Muscle Atrophy and Sleep Disruption.	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Anticancer Res.	6. 最初と最後の頁 6273-6278.
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.21873/anticancerres.15448.	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 Kinoshita H, Shimozato O, Kamoda H, Hagiwara Y, Tsukanishi T, Ishii T, Ohtori S, Yonemoto T.	4. 巻 41(12)
2. 論文標題 The Thioredoxin-1 Inhibitor, PX-12, Suppresses Local Osteosarcoma Progression.	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Anticancer Res.	6. 最初と最後の頁 6013-6021.
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.21873/anticancerres.15420.	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 Kinoshita H, Kamoda H, Ishii T, Hagiwara Y, Tsukanishi T, Orita S, Inage K, Hirose N, Ohtori S, Yonemoto T.	4. 巻 2020
2. 論文標題 Successful Neurological Recovery with Multimodality Therapy without Surgery for Spinal Metastases from Advanced Gastric Cancer	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Case Rep Orthop.	6. 最初と最後の頁 4753027
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1155/2020/4753027	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 Kinoshita H, Orita S, Inage K, Fujimoto K, Shiga Y, Abe K, Inoue M, Norimoto M, Umimura T, Ishii T, Yonemoto T, Kamoda H, Tsukanishi T, Akazawa T, Ohtori S	4. 巻 14(1)
2. 論文標題 Freeze-Dried Platelet-Rich Plasma Induces Osteoblast Proliferation via Platelet-Derived Growth Factor Receptor-Mediated Signal Transduction	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Asian Spine J.	6. 最初と最後の頁 1-8
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.31616/asj.2019.0048	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 Kinoshita H, Tsukanishi T, Ishii T, Kamoda H, Hagiwara Y, Orita S, Inage K, Hirose N, Ohtori S, Yonemoto T.	4. 巻 2020
2. 論文標題 Giant protruding high grade undifferentiated pleomorphic sarcoma arising in a keloid scar on the abdominal wall.	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Case Rep Dermatol Med.	6. 最初と最後の頁 4898965
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1155/2020/4898965	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 Kinoshita H, Ishii T, Kamoda H, Tsukanishi T, Orita S, Inage K, Ohtori S, Yonemoto T.	4. 巻 2020
2. 論文標題 Successful treatment of a massive desmoplastic fibroma of the ilium without surgery: A case report with long-term follow-up	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Case Rep Orthop.	6. 最初と最後の頁 5380598
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1155/2020/5380598	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 Kinoshita H, Ishii T, Kamoda H, Hagiwara Y, Tsukanishi T, Orita S, Inage K, Hirose N, Ohtori S, Yonemoto T.	4. 巻 2020
2. 論文標題 Synovitis, acne, pustulosis, hyperostosis, and osteitis syndrome with purely osteolytic, not osteosclerotic, lesions mimicking a malignant tumor.	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Case Rep Rheumatol.	6. 最初と最後の頁 6316921
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1155/2020/6316921	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 Kinoshita H, Orita S, Inage K, Yamauchi K, Abe K, Inoue M, Norimoto M, Umimura T, Eguchi Y, Fujimoto K, Shiga Y, Kanamoto H, Aoki Y, Furuya T, Suzuki M, Akazawa T, Takahashi K, Ohtori S.	4. 巻 44(8)
2. 論文標題 Skeletal Muscle Cell Oxidative Stress as a Possible Therapeutic Target in a Denervation-Induced Experimental Sarcopenic Model.	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Spine (Phila Pa 1976).	6. 最初と最後の頁 446-455
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1097/BRS.0000000000002891	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 Kinoshita H, Orita S, Yonemoto T, Ishii T, Iwata S, Kamoda H, Tsukanishi T, Inage K, Abe K, Inoue M, Norimoto M, Umimura T, Fujimoto K, Shiga Y, Kanamoto H, Furuya T, Takahashi K, Ohtori S.	4. 巻 13(1)
2. 論文標題 Successful total en bloc spondylectomy of the L3 vertebra with a paravertebral giant cell tumor following preoperative treatment with denosumab.	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 J Med Case Rep.	6. 最初と最後の頁 116
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1186/s13256-019-2029-4	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 Kinoshita H, Ishii T, Kamoda H, Tsukanishi T, Orita S, Inage K, Ohtori S, Yonemoto T.	4. 巻 2019
2. 論文標題 Muscle Invasive Dermatofibroma Clinically Mimicking a Malignant Tumor.	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Case Rep Dermatol Med.	6. 最初と最後の頁 4503272
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1155/2019/4503272	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 Kinoshita H, Yonemoto T, Kamoda H, Tsukanishi T, Orita S, Inage K, Hirose N, Ohtori S, Ishii T.	4. 巻 2019
2. 論文標題 Giant protruding nodular fasciitis of the anterior chest wall clinically mimicking a soft tissue sarcoma.	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Case Rep Orthop.	6. 最初と最後の頁 4174985
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1155/2019/4174985	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 -

〔学会発表〕 計10件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 9件）

1. 発表者名 Kinoshita H
2. 発表標題 Development of novel therapeutic agents targeting redox regulation system in osteosarcoma
3. 学会等名 European Calcified Tissue Society (ECTS) (国際学会)
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 Kinoshita H
2. 発表標題 Synovitis, acne, pustulosis, hyperostosis, and osteitis syndrome with purely osteolytic, not osteosclerotic, lesions mimicking a malignant tumor
3. 学会等名 European Calcified Tissue Society (ECTS) (国際学会)
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 Kinoshita H, Orita S, Inage K, Shiga Y, Ohtori S.
2. 発表標題 The evaluation of bone union activity of freeze-dried platelet-rich plasma
3. 学会等名 European Calcified Tissue Society (ECTS) (国際学会)
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 Kinoshita H, Yonemoto T, Kamoda H, Hagiwara Y, Tsukanishi T, Ishi T.
2. 発表標題 Effectiveness of salvage knee rotationplasty on sarcoma around the knee in adolescents and young adults
3. 学会等名 European Calcified Tissue Society (ECTS) (国際学会)
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 Kinoshita H, Orita S, Inage K, and Ohtori S.
2. 発表標題 Skeletal muscle cell oxidative stress as a possible therapeutic target for sarcopenia
3. 学会等名 European Calcified Tissue Society (ECTS) (国際学会)
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 木下英幸
2. 発表標題 レドックス制御を標的とする骨肉腫新規治療薬の開発および分子機序解明
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 2021年

1. 発表者名 Kinoshita H, Orita S, Inage K, Shiga Y, Ohtori S.
2. 発表標題 The evaluation of bone union activity of freeze-dried platelet-rich plasma
3. 学会等名 American Society for Bone and Mineral Research (ASBMR) (国際学会)
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 Kinoshita H, Yonemoto T, Kamoda H, Hagiwara Y, Tsukanishi T, Ishi T
2. 発表標題 Successful total en bloc spondylectomy of the L3 vertebra with a paravertebral giant cell tumor following preoperative treatment with denosumab
3. 学会等名 International Society of Limb Salvage (2019 Athens, Greece) (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Kinoshita H, Yonemoto T, Kamoda H, Hagiwara Y, Tsukanishi T, Ishi T
2. 発表標題 Giant muscle invasive dermatofibroma clinically mimicking a malignant tumor
3. 学会等名 International Society of Limb Salvage (2019 Athens,Greece) (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Kinoshita H, Yonemoto T, Kamoda H, Hagiwara Y, Tsukanishi T, Ishi T
2. 発表標題 Skeletal muscle cell oxidative stress as a possible therapeutic target for sarcopenia
3. 学会等名 International Society of Limb Salvage (2019 Athens,Greece) (国際学会)
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
---------------------------	-----------------------	----

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