

令和 6 年 5 月 29 日現在

機関番号：13901

研究種目：基盤研究(B) (一般)

研究期間：2020～2022

課題番号：20H03689

研究課題名(和文) 悪性中皮腫におけるオキシトシン受容体を標的とした新規治療法の開発

研究課題名(英文) Oxytocin receptor is a promising therapeutic target of malignant mesothelioma

研究代表者

田中 一大 (TANAKA, ICHIDAI)

名古屋大学・医学部附属病院・助教

研究者番号：40809810

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 13,700,000円

研究成果の概要(和文)：極めて予後不良な悪性中皮腫の新規治療標的を探索するために施行した細胞株のデータ解析から、他がん腫と比較し中皮腫においてオキシトシン受容体(OXTR)が著しく高発現していることを発見した。OXTRが高発現している中皮腫細胞株を用いて、同遺伝子をノックダウンすると、細胞周期がG1期で停止し、細胞周期を制御する遺伝子群が有意に低下することを突き止めた。In vitro/ vivo の解析で、OXTR阻害剤が腫瘍増殖を抑制することを発見し、同阻害剤を悪性中皮腫の新規治療薬とするPCT出願を行った。TCGAのデータベースを用いた解析では、OXTRの高発現が独立した予後不良因子であることを同定した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

悪性中皮腫は、アスベスト曝露から30-40年経過した後に発症する極めて予後不良な難治性腫瘍である。本邦において未だ患者数は増加傾向であり、全世界の年間死亡者数は約4万人と推定されていることに加え、発展途上国を中心に爆発的な患者数の増加が危惧されている。本研究では、オキシトシン受容体(OXTR)の高発現が、悪性中皮腫の腫瘍進展に深く関わり、有望な治療標的になりうることを世界で初めて発見した。さらにOXTR阻害剤の抗腫瘍効果を検証し、悪性中皮腫に対する新規の抗腫瘍薬として、新たな効能の展開に向けての可能性を見出した。今後は、本研究結果に基づいて、悪性中皮腫に対する新たな治療法の開発が可能になる。

研究成果の概要(英文)：Oxytocin receptor (OXTR) expression is remarkably upregulated in malignant mesothelioma (MM) compared with other tumor types, and cases with high expression have worse clinical outcomes. OXTR knockdown dramatically suppressed cell proliferation of MM cell lines with high OXTR expression through disturbance of tumor cell cycle. OXTR antagonists significantly inhibited the growth of MM cell lines, and oral administration of the OXTR antagonist suppressed MM tumor progression. OXTR could be a promising therapeutic target and a new prognostic indicator in MM.

研究分野：呼吸器内科

キーワード：悪性中皮腫 オキシトシン受容体 オキシトシン オキシトシン受容体阻害剤 細胞周期制御因子 予後因子 ドラッグリポジショニング 新規個別化治療

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

悪性中皮腫の国内死亡数は年間約 1,500 名と希少な腫瘍であるが、化学療法・外科的治療に放射線療法を加えた集学的治療が行われているにもかかわらず、生存期間中央値は約 1 年とその予後は極めて厳しい状況である。アスベスト暴露から 30 40 年経過した後に発症するため、本邦において現在も患者数は増加傾向にある。世界的には途上国を中心に爆発的な増加が懸念されており、WHO の報告では、調査が可能であった 59 カ国で年間に計 15000 人程度の死亡が確認されており、今後は年間 40000 人規模まで増加する見込みである。次世代シーケンスを用いた網羅的な遺伝子解析によっても、特徴的な腫瘍抑制遺伝子の不活化が報告されているのみで、分子標的となるドライバー遺伝子変異は発見されていない。2018 年には、本邦で免疫チェックポイント阻害剤の適応が悪性中皮腫にも拡大されたが、他癌腫と比較するとその効果は限定的であり、新規治療薬の開発が切望されている。

2. 研究の目的

悪性中皮腫の現状を打開するため、申請者は Cancer Cell Line Encyclopedia (CCLE) や The Cancer Genome Atlas (TCGA) といったデータベースを用いてパイオインフォマティクス解析を行い、新規治療標的の探索を行った。その結果、他癌腫と比較し悪性中皮腫では、オキシトシン受容体(OXTR)が著しく高発現していることを発見した。さらに、同受容体を標的とすることで中皮腫細胞株の増殖が抑制されることを見出した。一方、欧州では、早産・流産の予防目的でオキシトシン受容体阻害剤が臨床で使用されているほか、より選択性の高い拮抗剤も開発されている。悪性中皮腫に対する新規の抗腫瘍薬として、同阻害剤のドラッグリポジショニングを目指し、*in vivo* で最適となる投与量・投与経路を決定し、さらに既存の抗がん剤との併用による抗腫瘍効果を確認し、効果の高い薬剤を選定する。

3. 研究の方法

中皮腫細胞株において標的としている受容体の発現レベルに応じた阻害剤の細胞増殖抑制効果を検証する。不死化した正常中皮の細胞株と比較して、OXTR の発現レベルに応じて中皮腫細胞株を分類し、同薬剤の増殖抑制効果を検証する。細胞増殖抑制の効果は、WST-1 細胞増殖アッセイ・コロニーフォーメーションアッセイで検討し、50 %阻害濃度 (IC-50) を算出する。さらに、標準治療である殺細胞性の抗がん剤；シスプラチン・ペメトレキセドと併用した際の抗腫瘍効果についても同様に解析し、相加相乗効果の有無を検証する。中皮腫細胞株の増殖率がさらに 50 %以上抑制された場合は、併用効果ありと判断し、以後の *in vivo* の検討をシスプラチン・ペメトレキセド + 同阻害剤で検証する。さらに、レンチウイルスを用いて、オキシトシン受容体を恒常的にノックダウン及び強制発現する中皮腫細胞株を作成し、RNA シーケンス解析により mRNA 発現量の変化、リン酸化プロテオーム解析によりタンパク質リン酸化変動の網羅的解析を施行する。変化率の大きい遺伝子・タンパク質を、分子生物学的なパスウェイ解析に使用されるソフトウェアを用いて解析し、オキシトシン受容体の下流で腫瘍増殖を促進するシグナル経路を同定する。

4. 研究成果

OXTR の mRNA 発現レベルに基づいて、正常中皮の不死化株である MeT-5A の発現レベルを指標に、悪性中皮腫細胞株を高発現株 (30 倍以上に発現)・低発現株に分類し、オキシトシン受容体をノックダウンすると、OXTR 高発現の中皮腫細胞株において、顕著に細胞増殖が抑制された。一方で、MeT-5A や OXTR 低発現の中皮腫細胞株では、細胞増殖が抑制されないことを確認した (図 1A)。OXTR をノックダウンした際に、中皮腫細胞の増殖が抑制されるメカニズムを追及するため、恒常的発現を抑制するレンチウイルスを作成の上、FACS による細胞周期解析を施行した。図 1B の如く、OXTR をノックダウンすると、G1 期の増加・G2/M 期の減少を認め、G1 期停止が誘導されていること突き止めた。さらに、OXTR のノックダウンは、cyclin dependent kinase 1 (CDK1)・cyclin dependent kinase 2 (CDK2)・Aurora kinase A (AURKA) などの複数の細胞周期制御因子の発現低下を誘導することを発見した (図 1C)。また、オキシトシンを添加すると、オキシトシン受容体を高発現する中皮腫細胞株では増殖の促進が認められた。

さらに、図 2 に示すように検証した 4 種類すべての OXTR 阻害剤で中皮腫細胞株の増殖が抑制されることを見出した。クリゴシバン (Cligosiban) は、男性の早漏症に対して用いられる OXTR 阻害剤であり、他、OT-R アンタゴニスト 1、L368,899 塩酸塩、アトシバンを用いた解析において、これらすべての OXTR 阻害剤で濃度依存性に悪性中皮腫細胞の増殖を抑制することを発見した (図 2)。NCI-H2052、Y-MESO-27、NCI-H2373 は、OXTR 高発現の中皮腫細胞株。また、これらの薬剤の IC₅₀ は、OXTR に対する阻害定数 K_i 値と正の相関を示した。最も IC₅₀ が低かったクリゴシバンを選択し、複数の中皮腫細胞株で解析すると、想定通りオキシトシン受容体高発現株で有意に IC₅₀ が低い結果であった。

図1A OXTRノックダウンによる細胞増殖抑制効果

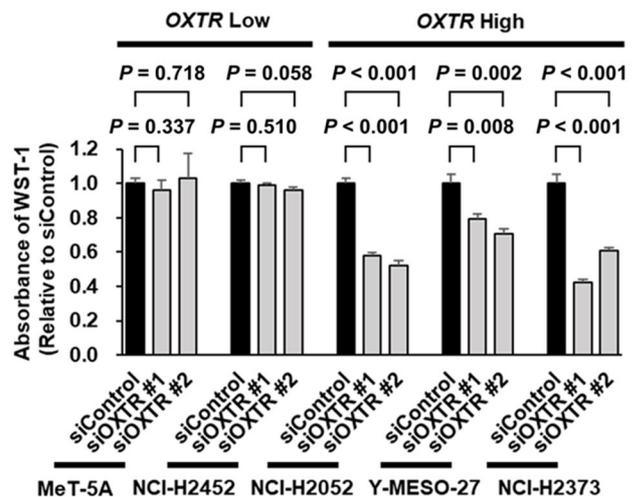


図1B OXTR のノックダウンは、G1 期の増加 G2/M 期の減少を引き起こす

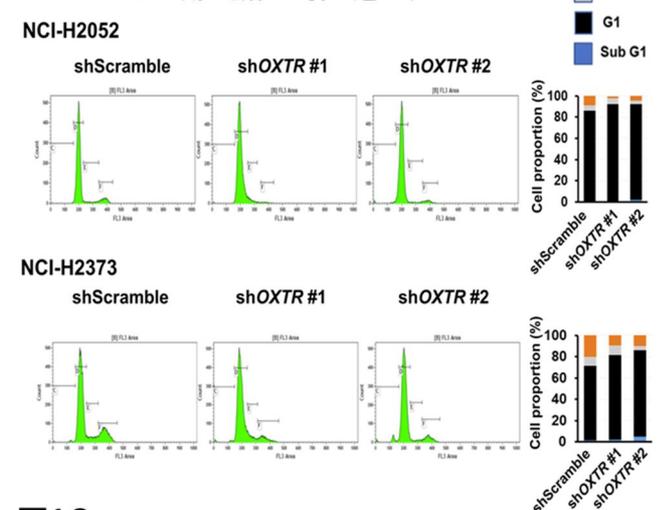


図1C

OXTR ノックダウンは、細胞周期制御因子である CDK1, CDK2, CCNE2, AURKA の発現低下をもたらす

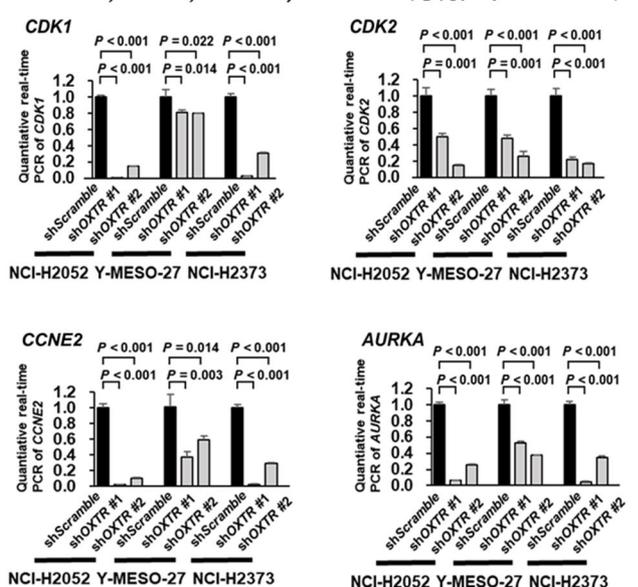
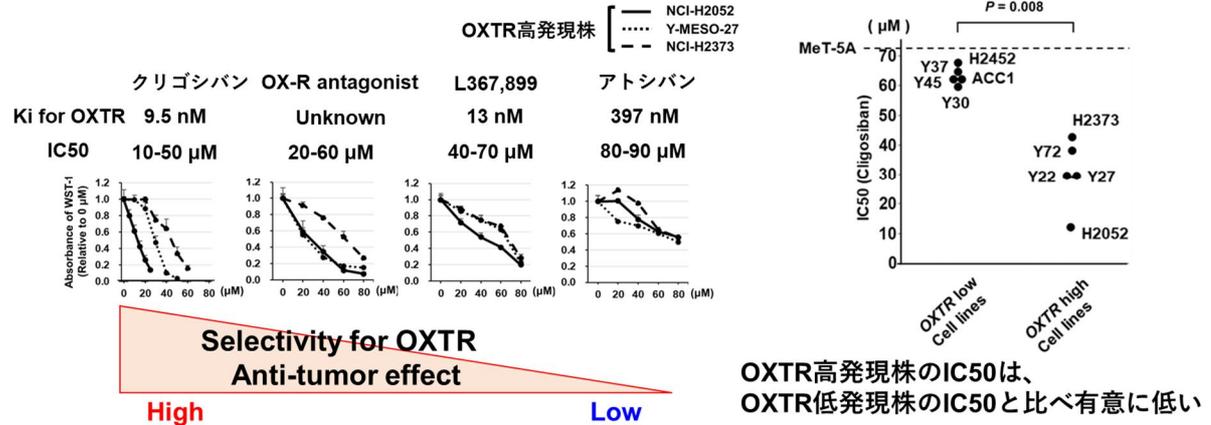
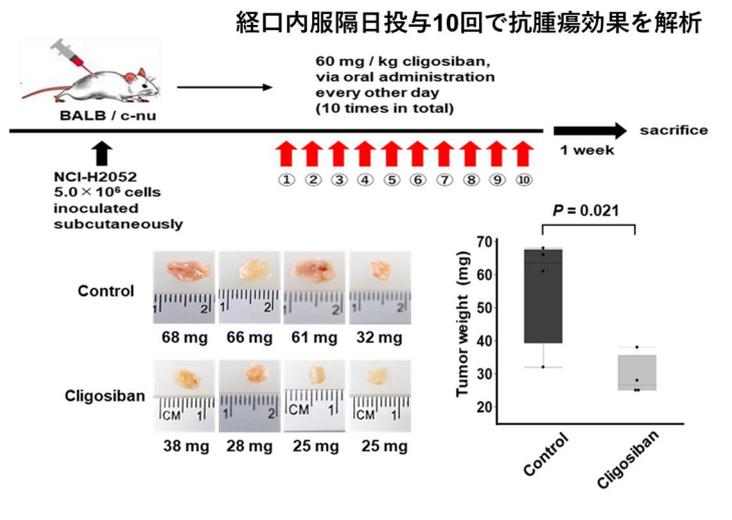


図2 A OXTR阻害剤の中皮腫細胞株に対するIC50 (μM)は、 図2 B
OXTRに対するKi値と正の相関を示す In vitro;クリゴシバンのIC50



*In vivo*の解析では、ヌードマウスの皮下に悪性中皮腫細胞株を移植したモデルを用いた解析において、クリゴシバンの経口隔日10回投与で、顕著な抗腫瘍効果が認められることを突き止めた(図2)。さらに、悪性中皮腫に対する標準化学療法であるシプラチン(CDDP)・ペメトレキセド(PEM)との併用効果についても検討を重ね、*in vitro/vivo*の双方の解析において、クリゴシバンの相加効果が確認された。2021年10月には、オキシトシン受容体阻害剤を用いた治療法を悪性中皮腫に対する新規の抗腫瘍療法として、特許取得のためのPCT出願を行った(出願番号:2020-180412 各国受付番号:C20200196JP#P01)。

図3 OXTR阻害剤(クリゴシバン)の経口投与は、中皮腫の増殖抑制効果があることを発見

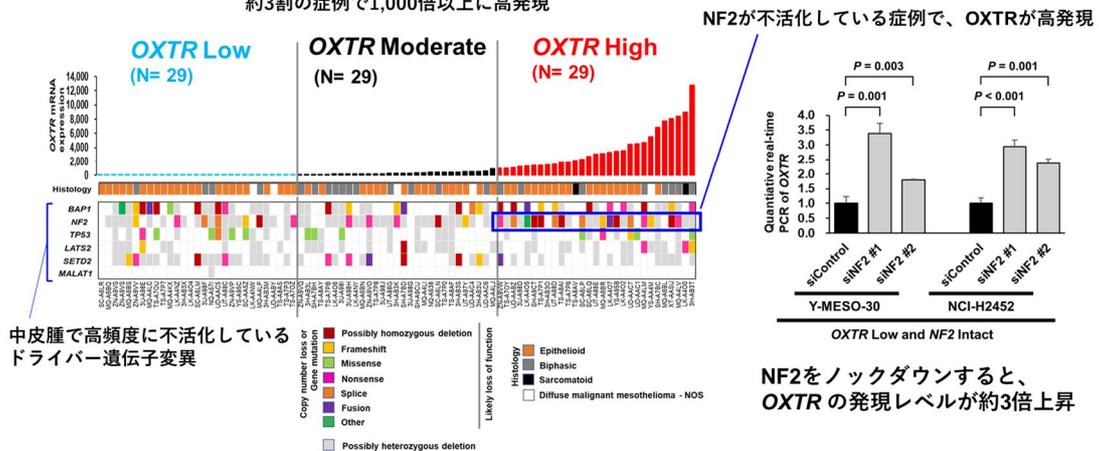


OXTR が悪性中皮腫において高発現している要因についても追及するため、TCGA のデータセットを用いて、OXTR の高発現症例で頻度の高いドライバー遺伝子変異を解析し、

図4 中皮腫組織におけるOXTR mRNAの発現レベル

TCGAを用いた中皮腫組織の解析 N=82 男性:66(80.5%) 女性:16(19.5%)

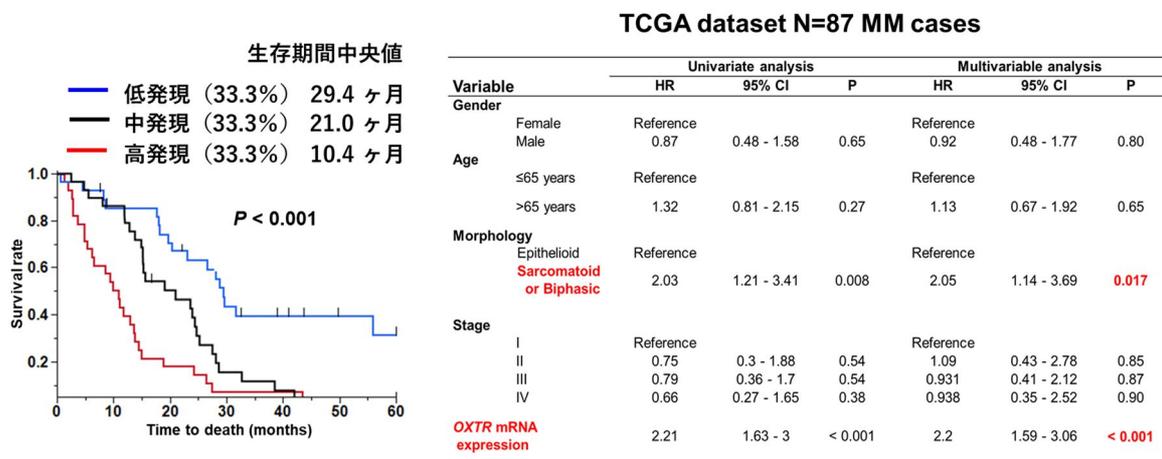
低発現の症例と比較し、約3割の症例で1,000倍以上に高発現



悪性中皮腫で特異的に不活化している腫瘍抑制遺伝子 Neurofibromatosis type 2 (NF2) の変異の割合が多いことを発見した。中皮腫細胞株を用いて NF2 をノックダウンすると、OXTR の mRNA の発現が3倍程度に上昇することを突き止めた(図4)。しかし、OXTR 低発現株と高発現株では、mRNA レベルで100倍近く発現差があり、TCGA のデータでは、1000倍以上発現に差が生じているため、悪性中皮腫における OXTR 高発現の原因を追究するためには、さらなる検討が必要と考えられる。

OXTR の発現増強が悪性中皮腫の予後に与える影響を解析するため、TCGA のデータで、全生存期間との関連を追求した。計87症例を OXTR-mRNA の発現レベルに応じて3群に分類し、 Kaplan-Meier 法では、OXTR 高発現群の予後が最も悪いことを発見した。さらに組織型やステージを加えた多変量解析においても、OXTR 発現レベルは独立した予後予測因子になることを同定し、これらの解析結果は、日本癌学会の機関誌である Cancer Science に報告した(Cancer Sci. 2021 Sep;112:3520-3532.)。

図5 OXTR の発現レベルは、中皮腫の予後と相関



多変量解析では、独立した予後予測因子 ($p < 0.001$) として同定 (HR for death, 2.2; 95% CI, 1.60-3.07; $P < .001$)

OXTR を恒常的にノックダウン後の中皮腫細胞株2株の LC-MS 分析により、プロテオーム解析及びリン酸化プロテオーム解析の解析結果から、悪性中皮腫における OXTR の下流シグナル経路の候補分子について詳細な解析を行った。OXTR をノックダウンした際に、変動が顕著であった細胞周期に関連する因子を複数選出し、同因子を標的とするレンチウイルスで恒常的にノックダウンして細胞増殖アッセイで解析したところ、OXTR をノックダウンした場合に相当する抑制効果を認める因子を新たに発見した。また、OXTR ノックダウン後にウェスタンブロッティング法で同因子の発現低下を確認し、LC-MS 分析の解析結果と完全に一致する結果を得た。さらに、同標的因子の阻害剤を用いて、複数の中皮腫細胞株の IC-50 を解析したところ、OXTR 阻害剤よりも低濃度で細胞増殖抑制効果を示した。これらの解析結果から、新たに同定した OXTR の下流に位置する因子は、悪性中皮腫において新規の治療標的となる可能性を見出した。

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 Kodama Yuta, Tanaka Ichidai, Sato Tatsuhiro, Hori Kazumi, Gen Soei, Morise Masahiro, Matsubara Daisuke, Sato Mitsuo, Sekido Yoshitaka, Hashimoto Naozumi	4. 巻 112
2. 論文標題 Oxytocin receptor is a promising therapeutic target of malignant mesothelioma	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Cancer Science	6. 最初と最後の頁 3520 ~ 3532
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1111/cas.15025	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4件（うち招待講演 0件/うち国際学会 1件）

1. 発表者名 小玉 勇太, 田中 一大, 佐藤 龍洋, 玄 崇永, 堀 和美, 森瀬 昌宏, 佐藤 光夫, 関戸 好孝
2. 発表標題 悪性中皮腫におけるオキシトシン受容体(OXTR)を標的とした新規治療法の開発
3. 学会等名 第62回日本肺癌学会学術集会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 田中 一大
2. 発表標題 Oxytocin receptor is a promising therapeutic target of malignant mesothelioma
3. 学会等名 第25回アジア太平洋呼吸器学会学術集会（国際学会）
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 田中 一大, 佐藤 龍洋, 佐藤 光夫, 関戸 好孝
2. 発表標題 悪性中皮腫におけるオキシトシン受容体を標的とした新規治療戦略
3. 学会等名 第81回日本癌学会学術総会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 田中 一大、小玉 勇太、佐藤 龍洋、玄 宗栄、森瀬 昌宏、佐藤 光夫、関戸 好孝、石井 誠
2. 発表標題 オキシトシン受容体を標的とした悪性中皮腫に対する新規治療法の開発
3. 学会等名 第63回日本呼吸器学会学術総会
4. 発表年 2023年

〔図書〕 計0件

〔出願〕 計1件

産業財産権の名称 悪性中皮腫の治療剤および悪性中皮腫患者の選択方法	発明者 田中一大、小玉勇太	権利者 東海国立大学機構
産業財産権の種類、番号 特許、2020-180412	出願年 2021年	国内・外国の別 国内

〔取得〕 計0件

〔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	関戸 好孝 (Sekido Yoshitaka) (00311712)	愛知県がんセンター(研究所)・分子腫瘍学分野・副所長兼 分野長 (83901)	
研究分担者	森瀬 昌宏 (Morise Masahiro) (00612756)	名古屋大学・医学系研究科・講師 (13901)	
研究分担者	佐藤 光夫 (Sato Mitsuo) (70467281)	名古屋大学・医学系研究科(保健)・教授 (13901)	
研究分担者	松原 大祐 (Matsubara Daisuke) (80415554)	筑波大学・医学医療系・教授 (12102)	

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