

令和 4 年 5 月 26 日現在

機関番号：12601

研究種目：若手研究

研究期間：2020～2021

課題番号：20K16325

研究課題名（和文）骨肉腫におけるタンパク糖鎖修飾メカニズムの解明による新規治療法の開発

研究課題名（英文）Development of novel therapy of osteosarcoma targeting the post-transcriptional modification

研究代表者

加登 翔太（Kato, Shota）

東京大学・医学部附属病院・助教

研究者番号：70868257

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）：骨肉腫細胞内で生じる翻訳後タンパク糖鎖修飾が、腫瘍細胞の生存および増殖にどのように関わるかを解明し、またその阻害が新たな治療標的となりうるかを検討するために、計画した研究を遂行した。候補遺伝子のノックダウン前後で生じるリン酸化シグナルタンパクの変化、また遺伝子発現状況の変化についての網羅的な測定を行った。また、免疫抑制マウスにおける生体内で作成した腫瘍に対する候補遺伝子のノックダウン実験を実施した。これらの研究により、候補遺伝子が腫瘍増大に与える重要な役割を解明し、治療標的として有望であることを示した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

骨肉腫の治療成績は長きに渡り向上が乏しく、新規治療開発による予後の向上が強く求められる疾患である。各種の癌腫において遺伝子変異を標的とした新規治療が開発されているが、骨肉腫においてはそのようなアプローチは取りづらいという問題点があった。本研究は発現解析をもとに抽出した新規治療標的の遺伝子に対して、その機能解析と治療標的としての評価を行ったものである。今後の併用薬の選出および動物実験の進行により、将来的には骨肉腫の新規治療法の創出に結びつけることを期待できる。

研究成果の概要（英文）：We conducted the planned experiments to elucidate how post-translational protein glycosylation occurring in osteosarcoma cells is involved in tumor cell survival and proliferation and to examine whether its inhibition could be a new therapeutic target. Comprehensive measurements were made on changes in phosphorylated signaling proteins that occur before and after the knockdown of candidate genes and changes in gene expression status. In addition, candidate gene knockdown experiments were performed on tumors generated in vivo in immunosuppressed mice. These studies have elucidated the critical role of the candidate gene in tumor growth and demonstrated that the gene is a promising therapeutic target.

研究分野：小児がん

キーワード：骨肉腫 糖鎖修飾 発現解析

様式 C-19、F-19-1、Z-19（共通）

1. 研究開始当初の背景

小児・若年成人に好発する骨肉腫の生命予後は、特に再発例では極めて不良であり、治療による晩期合併症も課題である。治療効果の増強および合併症を減弱するための新規治療が強く求められるが、この30年ほど、新たな薬剤治療は成功していない。他の癌腫ではその分子遺伝学的性質の解明による標的治療が創出されているが、骨肉腫に関しては、疾患の希少性のため、大規模な分子生物学的解析の既報は少なく、また候補遺伝子の機能の解明にはつながっていない。我々は、公開データ[1, 2]をもとに遺伝子発現プロファイルの再解析と培養細胞を用いた遺伝子ノックダウンによるスクリーニングを行い、タンパクの糖鎖修飾を制御する遺伝子を候補遺伝子として抽出した。タンパクの糖鎖修飾は一部の癌腫の悪性化に関与する可能性が報告されている[3]。一方で、糖鎖修飾が骨肉腫細胞増殖を増強する具体的なメカニズムや、生体内の骨肉腫に対しこれを阻害する方法は未だ不明である。

2. 研究の目的

上記背景より、糖鎖修飾が骨肉腫細胞においてどのようなメカニズムで細胞増殖をもたらす悪性化につながるのか、さらにどのように生体内でこれを阻害し、治療応用につなげることができるのか、という点を明らかにすることを目的に、本研究を計画した。これにより、未だ治療が困難な骨肉腫に対して新たな治療法を創出し、究極的には疾患予後の改善および合併症の遁滅をもたらすことを目的とした。

3. 研究の方法

上記目的を達成するため、以下4つの研究計画を立てた。

(1) 糖鎖修飾が骨肉腫細胞内の遺伝子発現プロファイルに与える影響の解明

骨肉腫細胞株を用いて、候補遺伝子の発現を操作した際に生じる遺伝子発現の変動を観察する。候補遺伝子のノックダウンの有無により2種のサンプルを作成し、RNAシーケンスによる発現解析を行う。発現変動遺伝子の抽出や、gene set enrichment analysisを行うことで、候補遺伝子が腫瘍細胞内で担当している機能につき考察する。

(2) 細胞内シグナルタンパクの糖鎖修飾状況の解析

予備実験で候補遺伝子の発現状況により一部の細胞内シグナルタンパクの量やリン酸化の変動がみられていたことから、その背景を考察するために、タンパク糖鎖修飾プロファイルを観察する抗体アレイを用いて、候補遺伝子の発現状況と糖鎖修飾の関連を網羅的に観察する。上記(1)と同様に2条件の細胞サンプルを作成し、該当アレイに対してインキュベーションを行う。2種の比較を行うことで、候補遺伝子が修飾に関わる具体的なタンパクの同定を行う。

(3) 糖鎖修飾が生体内で骨肉腫に与える影響のマウスモデルによる検証

細胞株を用いた腫瘍マウスモデルを作成し、生体内でのノックダウンが腫瘍増殖に与える影響を観察する。薬剤誘導性に候補遺伝子のノックダウンが可能になる細胞株を作成し、免疫抑制マウスに皮下注射し腫瘍モデルを作成する。生着後に投薬を行い、候補遺伝子のノックダウンで腫瘍増殖スピードに変化があるかを観察する。

(4) 薬剤を用いた糖鎖修飾に関連する経路の阻害効果の検証

他の癌腫において候補遺伝子のコードするタンパクに対して阻害作用が報告される化合物を用いて、骨肉腫細胞でも同様な阻害作用が得られるかを検証するとともに、細胞増殖に与える影響を観察する。細胞株に対して当該化合物の投与を行い、ウエスタンブロットでタンパク量の変化を観察するとともに、増殖曲線を作成し細胞毒性を観察する。また、(1)と同様に発現解析を行い、発現プロファイルに与える変化を観察する。

4. 研究成果

上記計画をもとに研究を遂行した。

(1) 糖鎖修飾が骨肉腫細胞内の遺伝子発現プロファイルに与える影響の解明

候補遺伝子の発現の有無による骨肉腫細胞内での発現プロファイルを観察し解析したところ、細胞周期関連遺伝子など、細胞増殖に関連する特定のgene setの変動がみられ、候補遺伝子が細胞周期の維持に重要な役割を果たしている可能性が示唆された。細胞株を用いたノックダウンの有無による細胞周期の状態の観察からも同様な所見がえられることから、候補遺伝子の阻害による細胞増殖の鈍化は細胞周期停止によるものである可能性が考えられた。

(2) 細胞内シグナルタンパクの糖鎖修飾状況の解析

糖鎖アレイを用いた細胞内タンパクの網羅的な観察により、候補遺伝子の発現阻害により糖鎖

修飾状況の全体的なシフトが起こることが確認された。糖鎖修飾状況が変動したタンパクのリスト抽出を行ったが、他のモダリティによるさらなる確認が必要と考えられた。

(3) 糖鎖修飾が生体内で骨肉腫に与える影響のマウスモデルによる検証

腫瘍マウスモデルでの *in vivo* のノックダウンによる腫瘍増殖速度の検証を行ったところ、候補遺伝子のノックダウンによりマウスに生着した腫瘍の増殖速度は有意に低下した。ノックダウンを行わなかった腫瘍のサイズが人道的エンドポイントに達した時点で全例の sacrifice を行い、摘出腫瘍のサイズにも明らかな差が生じていることが確認された。このことから、生体内においても候補遺伝子の発現が腫瘍の増殖に必要であり、治療標的となる可能性があることが示唆された。

(4) 薬剤を用いた糖鎖修飾に関連する経路の阻害効果の検証

他の癌腫において候補遺伝子のコードするタンパクに結合し阻害および減少させることが報告されている化合物を骨肉腫細胞株に投与したところ、ウエスタンブロットにて当該タンパクの減少が確認された。また、骨肉腫細胞株に対する毒性実験により、当該化合物が濃度依存性に骨肉腫細胞の増殖を抑制することが観察された。これらの結果から、当該化合物は候補遺伝子のコードするタンパクを阻害することで治療候補薬になりうることが示唆された。さらに投薬後細胞を用いた発現解析の結果を(1)の結果と組み合わせることにより、候補遺伝子の阻害時に代償的に発現が亢進する遺伝子群の抽出を行い、それを候補遺伝子とともに阻害することによりさらなる治療効果を観察することができた。

今後はこれらの成果をもとに、候補とした遺伝子を標的とした治療の実用化に向けた機能解析をさらにすすめる予定である。

参考文献

- 1 Buddingh EP, Kuijjer ML, Duim RA, Burger H, Agelopoulos K, Myklebost O *et al.* Tumor-infiltrating macrophages are associated with metastasis suppression in high-grade osteosarcoma: a rationale for treatment with macrophage activating agents. *Clin Cancer Res* 2011; 17: 2110-2119.
- 2 Kelly AD, Haibe-Kains B, Janeway KA, Hill KE, Howe E, Goldsmith J *et al.* MicroRNA paraffin-based studies in osteosarcoma reveal reproducible independent prognostic profiles at 14q32. *Genome Med* 2013; 5: 2.
- 3 Ferreira IG, Pucci M, Venturi G, Malagolini N, Chiricolo M, Dall'Olio F. Glycosylation as a Main Regulator of Growth and Death Factor Receptors Signaling. *Int J Mol Sci* 2018; 19.

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計3件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 1件）

1. 発表者名 渡邊健太郎、加登翔太、磯部知弥、緒方瑛人、田坂佳資、上野浩生、南谷泰仁、田中洋子、白石友一、千葉健一、梅田雄嗣、樋渡光輝、宮野悟、小川誠司、滝田順子
2. 発表標題 難治性骨肉腫における糖鎖遺伝子の役割と治療標的としての可能性
3. 学会等名 第79回日本癌学会学術総会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 Kentaro Watanabe, Shota Kato, Tomoya Isobe, Masahiro Sekiguchi, Yasuo Kubota, Eito Ogata, Keisuke Tasaka, Hiroo Ueno, Yasuhito Nannya, Hiroko Tanaka, Yuichi Shiraiishi, Kenichi Chiba, Katsutsugu Umeda, Mitsuteru Hiwatari, Akira Oka, Satoru Miyano, Seishi Ogawa, Junko Takita
2. 発表標題 The impact of a glycosylation-related gene on osteosarcoma cells and its potential as a novel therapeutic target
3. 学会等名 The 52nd Congress of the International Society of Pediatric Oncology (SIOP) (国際学会)
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 渡邊健太郎、加登翔太、緒方瑛人、田坂佳資、上野浩生、梅田雄嗣、樋渡光輝、宮野悟、小川誠司、滝田順子
2. 発表標題 糖鎖修飾遺伝子の骨肉腫細胞における役割と、治療応用への可能性
3. 学会等名 第62回日本小児血液・がん学会学術集会
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
---------------------------	-----------------------	----

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