

科学研究費助成事業 研究成果報告書

令和 5 年 6 月 21 日現在

機関番号：32620

研究種目：研究活動スタート支援

研究期間：2020～2022

課題番号：20K22963

研究課題名(和文) 骨肉腫における小胞体ストレス応答の解明に基づいた新規治療法開発

研究課題名(英文) Development of new target therapy in osteosarcoma based on endoplasmic reticulum stress response.

研究代表者

栗原 大聖 (Taisei, Kurihara)

順天堂大学・医学部・非常勤助教

研究者番号：20887880

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,200,000円

研究成果の概要(和文)：骨肉腫細胞株では小胞体ストレス応答の3つの経路(IRE1、PERK、ATF6)のうちIRE1-XBP1経路、PERK経路の活性化が示唆され、阻害剤やsiRNAを用いた実験/検証を行った。IRE1経路の阻害剤としてToyocamycinを用い、PERK経路の阻害剤としてGSK2606414とISRIBを用いた。Toyocamycinは全ての細胞株に細胞増殖抑制効果を示し、XBP1に対するsiRNAも増殖抑制効果を示した。一方、PERK経路阻害剤のGSK2606414、ISRIBはともに効果を示さず、PERK経路の中のATF4およびEIF2Aに対するsiRNAも増殖抑制効果は示さなかった。

研究成果の学術的意義や社会的意義

骨肉腫細胞株ではIRE1-XBP1経路がストレス応答に重要な役割を果たしている可能性が示唆された。IRE1-XBP1経路阻害剤がEwing's肉腫細胞株に加え、骨肉腫細胞株においても抗腫瘍効果を示すことが示され、難治性肉腫における新たな治療選択としての可能性が示された。また、骨肉腫臨床検体を用いた検証でも、XBP1s/XBP1uの発現傾向は細胞株と同様であり、細胞株と同様の効果が期待できる可能性が示された。一方、同時に行った実験では滑膜肉腫細胞株では全く抗腫瘍効果を示さず、肉腫横断的な治療選択とはならなかった。

研究成果の概要(英文)：Osteosarcoma (OS) is the most common primary malignant bone tumor. We investigated the functions of endoplasmic reticulum (ER) stress activities in OS and elucidated whether ER stress inhibitors could exert antitumor effects. We performed both siRNA and inhibitor assays focusing on IRE1-XBP1 and PERK pathways. All OS cell lines showed resistance to PERK inhibitors. ATF4 and EIF2A inhibition by siRNA did not affect the survival of OS cell lines. IRE1-XBP1 inhibition by toyocamycin suppressed OS cell growth and cell viability was suppressed in all OS cell lines by siRNA for XBP1. The expression of XBP1s and XBP1u in OS cell lines and OS surgical samples were confirmed using qPCR. In MG63 and U2OS, toyocamycin decreased the expression level of XBP1s induced by tunicamycin. In 143B and KHOS, stimulation by toyocamycin did not clearly change the expression level of XBP1s induced by tunicamycin. Inhibition of the IRE1-XBP1s pathway is expected to be a new target in a subset of OS.

研究分野：骨軟部腫瘍

キーワード：肉腫 治療標的 小胞体ストレス応答 XBP1 PERK経路

1. 研究開始当初の背景

骨肉腫は小児/若年成人と 50 代以降の成人において最も多い悪性骨腫瘍である。化学療法と手術という骨肉腫の標準的な治療指針は 30 年ほど前に定まったが、それ以降はその治療効果において大きな進歩がないのが現状である。初診時進行した症例の予後は極めて悪く、そのため骨肉腫において分子病理学的プロファイルに基づいた効果的で革新的な新規治療法や分子治療標的等の選択肢が広がることが期待されている。近年、小胞体ストレス応答を標的とした阻害剤が様座な腫瘍において有効であることが示されてきた。研究代表者のグループはタンパク発現解析により悪性骨腫瘍であるユーイング肉腫において、その臨床像と小胞体ストレス応答の関係を示し、またユーイング肉腫細胞株において小胞体ストレス応答の経路の 1 つである IRE1 阻害剤が抗腫瘍効果を示すことを示した。しかしながら、他の悪性骨軟部腫瘍における小胞体ストレス応答の役割についてはよくわかっていない。

2. 研究の目的

悪性骨軟部腫瘍の中でも患者数の多い骨肉腫に着目し、小胞体ストレス応答に関わる遺伝子発現を調べることにより活性化されている経路を見出し、その経路の阻害剤の抗腫瘍効果を調べた。

3. 研究の方法

骨肉腫細胞株 4 種類を用いて実験を行った。各細胞株より RNA を抽出し、小胞体ストレス応答に関わる様々な遺伝子が搭載された PCR パネルを用いて、骨肉腫細胞株における小胞体ストレス応答に関わる遺伝子の発現解析を行った。また、小胞体ストレスの 3 つの経路に関わる複数の遺伝子を siRNA を用いてノックダウンし、その細胞増殖能への影響を調べた。また、各経路に関わる阻害剤の骨肉腫細胞株に対する抗腫瘍効果も調べた。

4. 研究成果

腫瘍発生に関与する小胞体ストレス応答に関わるパネルを用いた遺伝子発現解析の結果、3 つの腫瘍経路 (IRE1、PERK、ATF6) のうち PERK 経路と IRE1 経路が腫瘍発生・進展に関与している可能性が示唆されたため、この 2 つの経路についてさらに調べた。まず PERK 経路の阻害剤 2 つは骨肉腫細胞株の細胞増殖能を抑制しなかった (Figure 1)。一方 IRE1-XBP1 経路の阻害剤である toyocamycin は濃度依存性に骨肉腫細胞株の細胞増殖能を抑制した (Figure 2)。次に骨肉腫細胞株および骨肉腫臨床検体における XBP1s (spliced variant)/XBP1u (unspliced variant) の発現の割合を調べた。XBP1s はストレス応答によって発現の亢進してくることが知られている。XBP1s/XBP1u の比率を骨肉腫細胞株および骨肉腫臨床検体において調べたところ、面白いことにすべての細胞株が同じ発現パターンを示した (Figure 3)。また、骨肉腫臨床検体も細胞株と同様のパターンを示し、これは術前化学療法施行の有無によらなかった。次に、骨肉腫細胞株の生存と IRE1-XBP1 経路の関係を調べるために、siRNA を用いて 4 種類の骨肉腫細胞株の XBP1 の発現を落としてみた。XBP1s、XBP1u の両方とも発現の低下が観察され、骨肉腫細胞株の増殖活性は KHOS 細胞株を除いていずれも低下した (Figure 4)。このことから、骨肉腫細胞株における XBP1 の発現と細胞増殖活性の間に強い相関があることが確認された。さらに、骨肉腫細胞株に Tunicamycin を加えて細胞に強いストレスを加えると、経時的に XBP1 のスプライシングが亢進し、XBP1u 発現の低下/XBP1s 発現の亢進がみられることを確認した。ここに選択的 IRE1 阻害剤である toyocamycin を加えると、2 つの細胞株では XBP1s の発現低下がみられたが、残り

の2つの細胞株では XBP1s の発現に大きな変化は見られなかった(Figure 5)。これら XBP1s の発現に変化のみられなかった2つの細胞株には形態学的にアポトーシス様の変化がみられた。

Fig. 1

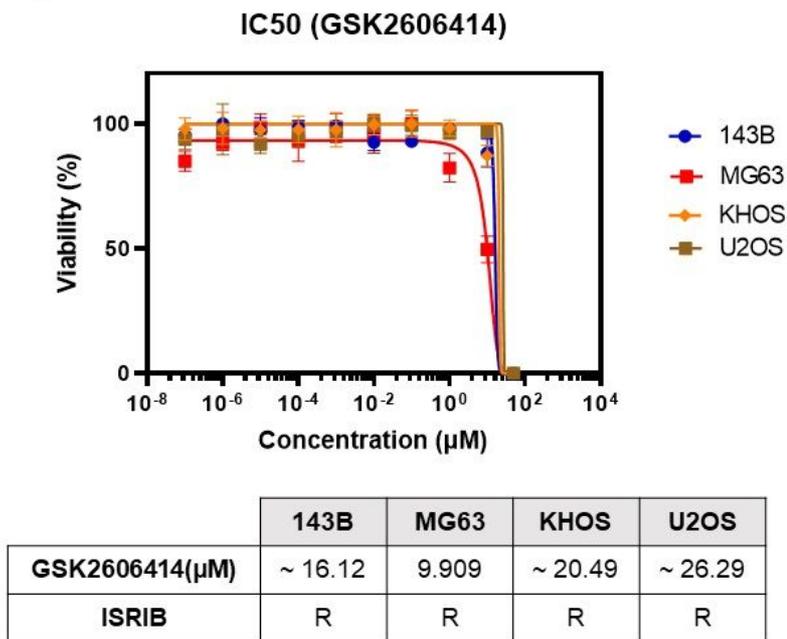


Fig. 2

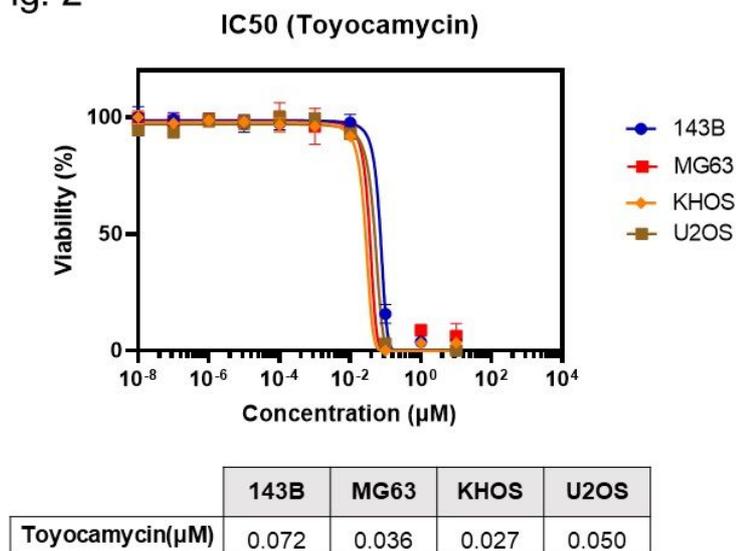
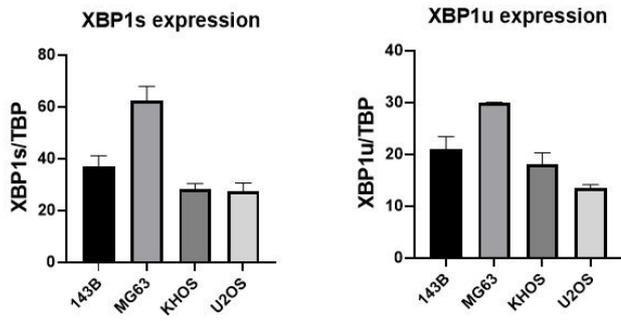


Fig. 3

(A) Cell lines



(B) Surgical materials

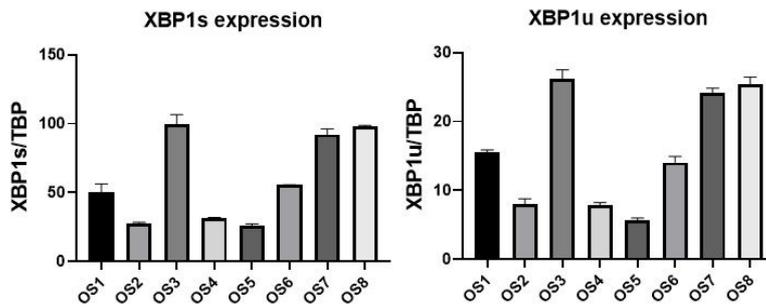
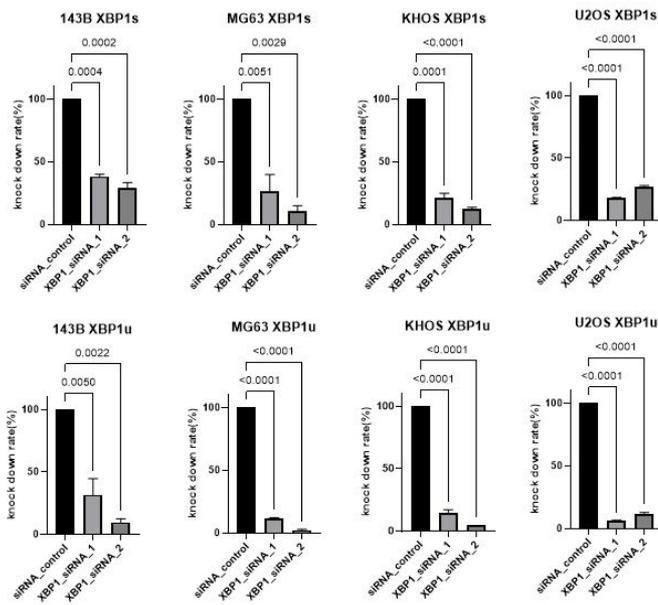


Fig. 4

(A) XBP1 expression



(B) Cell proliferation

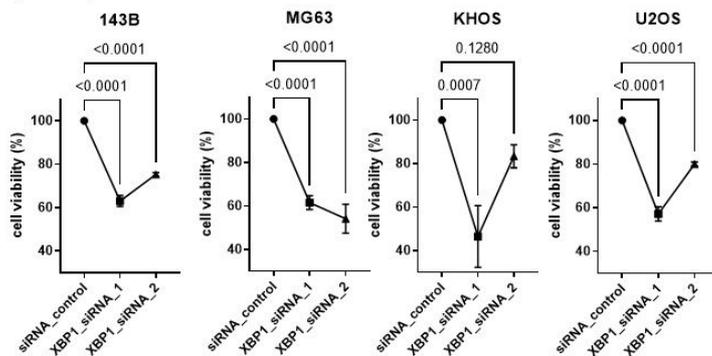
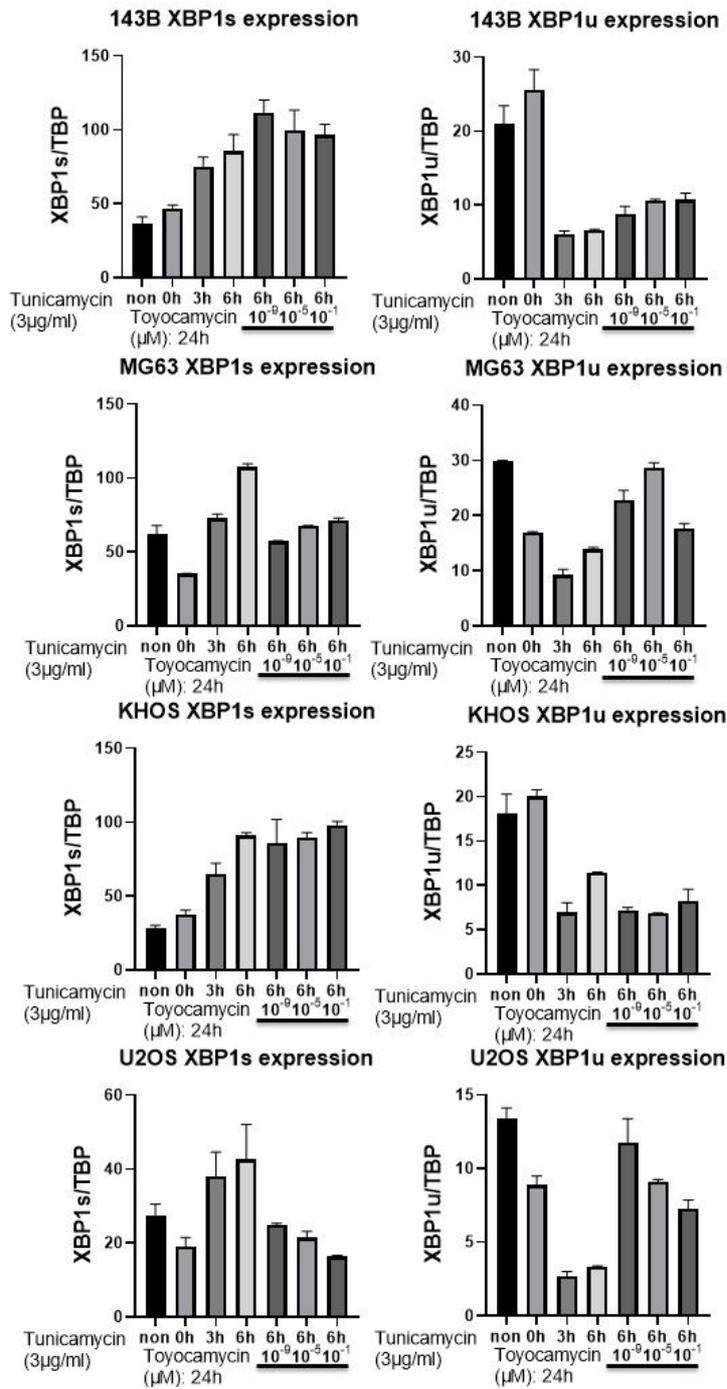


Fig. 5



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 1件）

1. 著者名 Sasa K, Saito T, Kurihara T, Hasegawa N, Sano K, Kubota D, Akaike K, Okubo T, Hayashi T, Takagi T, Yao T, Ishijima M, Suehara Y.	4. 巻 7
2. 論文標題 Endoplasmic Reticulum Stress in Osteosarcoma: IRE1 -XBP1 Inhibition Exerts Anti-Tumor Activity	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 Journal of Oncology Research and Therapy	6. 最初と最後の頁 10157-10165
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.29011/2574-710X.10157	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0件

〔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
---------	---------