

令和 6 年 6 月 7 日現在

機関番号：13601
研究種目：基盤研究(C)（一般）
研究期間：2021～2023
課題番号：21K09319
研究課題名（和文）新規骨肉腫治療薬の開発 スクレロスチンの作用機序・作用点・抗癌剤との併用効果解析
研究課題名（英文）Development of a Novel Osteosarcoma Treatment: Mechanism of Action, Target Sites, and Synergistic Effects with Chemotherapeutic Agents of Sclerostin
研究代表者
岡本 正則（Okamoto, Masanori）
信州大学・医学部附属病院・講師
研究者番号：50596781
交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,300,000円

研究成果の概要（和文）：骨肉腫に対する新規治療薬の候補として骨形成阻害因子であるスクレロスチンの評価を行った。スクレロスチンは古典的Wnt経路の阻害因子であり、マウスおよびヒト骨肉腫細胞株内の「カτεニン」タンパクの量を減少させた。Wnt経路以外のがんシグナル伝達経路への影響を評価するためにCancer Signaling Phospho Antibody Array (Full Moon BioSystems) を用いて解析をしたが、スクレロスチン刺激によって他のがんシグナル伝達経路に有意な変化は認めなかった。

研究成果の学術的意義や社会的意義

悪性骨腫瘍で最も頻度の高い骨肉腫は、腫瘍性の類骨、骨を形成する悪性腫瘍と定義される。骨肉腫は多様性、不均一性が高く、共通の原因遺伝子は特定されていない。骨肉腫に対する標準治療は、1970年代に開発された薬剤が現在も使用され続けており、新規治療薬の開発が切望されている。

全ての骨肉腫に共通する現象である骨形成を阻害する因子であるスクレロスチンは、骨肉腫に対して抗腫瘍効果を持つことが明らかになっている。この作用を利用した新規治療薬の開発を目指して研究を継続している。

研究成果の概要（英文）：We evaluated sclerostin, an inhibitor of bone formation, as a candidate for a novel therapeutic agent against osteosarcoma. Sclerostin is an inhibitor of the canonical Wnt pathway and reduced the levels of β -catenin protein in mouse and human osteosarcoma cell lines. To assess its impact on other cancer signaling pathways, we conducted analysis using the Cancer Signaling Phospho Antibody Array (Full Moon BioSystems), but no significant changes were observed in other cancer signaling pathways upon stimulation with sclerostin.

研究分野：整形外科

キーワード：骨肉腫 スクレロスチン

1. 研究開始当初の背景

【背景 1：骨肉腫に対する抗がん剤】

悪性骨腫瘍の中で最も頻度の高い骨肉腫は、組織学的に腫瘍性の類骨・骨を形成する悪性腫瘍と定義される。数多くの原因遺伝子の候補が報告されているが、腫瘍の多様性、不均一性が高く、診断に有用な遺伝子変異は存在しない。骨肉腫に対しては 1990 年代に現行の抗がん剤の多剤併用療法が開始され、5 年生存率は約 10% から 70% 以上にまで改善した。しかし初診時進行例や早期再発例など、小児を含め予後不良な症例が数多く存在する。近年、他のがん腫に対する化学療法は分子標的薬などの新規薬剤が多数開発されているが、悪性骨腫瘍に対する適応はなく、その効果も限定的である。骨肉腫に対して有効な治療薬は 20 年以上新規開発がなされておらず、新規抗がん剤の開発が切望されている。

【背景 2：Wnt 経路と悪性腫瘍】

Wnt 経路は発生、成長、幹細胞の維持・分化、恒常性の維持など生体内の様々な現象を全身の組織で調節する。Wnt 経路には カテニンを介する古典的 Wnt 経路と、それを介さない非古典的 Wnt 経路とが存在する。古典的 Wnt 経路は受容体 Frizzled と共受容体 Lrp5/6 の受容体複合体を介して細胞内にシグナルを伝え、カテニンを介して標的遺伝子の発現を調節し、多くの細胞の増殖・分化を促進する。またその異常な活性化は腫瘍細胞の発生・増殖を促進する。非古典的 Wnt 経路は細胞運動や極性決定に関与し、その異常な活性化は腫瘍の細胞運動、浸潤能、転移を促進する。これまでにスクレロスチンを除く多くの Wnt 阻害剤が臨床応用を目指して研究されているが、全身の組織に作用するためその副作用の大きさが問題となっている。

【背景 3：Wnt 阻害因子スクレロスチン】

古典的 Wnt 経路に対する阻害因子であるスクレロスチンは、骨細胞から分泌されるタンパク質である。骨組織に特異性が高く、骨芽細胞の古典的 Wnt 経路を阻害することにより骨形成を抑制し骨粗鬆症の原因となる。これに対する抗スクレロスチン抗体は、骨形成促進剤として海外ではすでに骨粗鬆症治療に臨床応用されている。しかし、骨形成促進剤は過量投与により悪性骨腫瘍(骨肉腫)形成の危険性が報告されており、抗スクレロスチン抗体も悪性骨腫瘍形成の危険性が危惧される。これらのことから抗スクレロスチン抗体と逆の作用を持つスクレロスチンは、悪性骨腫瘍に対して抑制的に作用し、腫瘍の増大や転移を抑制する作用を持つことが推測された。これまでの我々の研究において、スクレロスチンが骨肉腫の増殖能・遊走能を抑制し、骨肉腫マウス皮下移植モデルの腫瘍の増大を抑制し、生命予後の改善が確認されている。しかしがん細胞におけるスクレロスチンの Wnt 経路阻害作用に関する報告は皆無である。

2. 研究の目的

骨形成は多様性・不均一性の高い骨肉腫の全てに唯一共通する現象であり、スクレロスチンはその骨形成を抑制する。最終目標は、骨形成阻害因子のスクレロスチンの性質・骨組織特異性を逆手に取り、骨肉腫に対する創薬研究にブレークスルーを起こし、骨肉腫に対しての新規治療薬の開発を目指すことである。本研究では、骨肉腫に対するスクレロスチンの抗腫瘍効果のメカニズム、作用点の解明を目的とした。

3. 研究の方法

(1) スクレロスチンによる骨肉腫細胞株への作用の解析

各種骨肉腫細胞株(143B ヒトおよび LM8 マウス)にスクレロスチン 10~1000ng/ml を投与し、古典的 Wnt 経路活性を示すカテニンのタンパク量の変化をウェスタンブロットにて評価する。また骨形成マーカーの ALP や転写因子の Runx2 や Osterix の発現の変化をリアルタイム PCR にて評価する。

(2) スクレロスチンを細分化したペプチド合成

スクレロスチンは 213 アミノ酸からなり、3 つのループ構造を持つことが知られている。特にループ 2 に含まれる NX1 motif (アミノ酸配列 PNAIG) を介して LRP5/6 と相互作用することが報告されている(G Holdsworth, J Biol Chem, 2012)。そこでループごとに 3 分割したペプチドを作製し、骨肉腫に対する抗腫瘍効果を in vitro で評価する。

(3) がんシグナル伝達経路リン酸化抗体アレイ

スクレロスチンは古典的 Wnt 経路の阻害因子として知られているが、Wnt 経路以外のシグナル伝達経路への作用を評価するため、Cancer Signaling Phospho Antibody Array(Full Moon BioSystems)を用いて、マウス骨肉腫細胞株 LM8 に対してスクレロスチン 100ng/ml を投与した際の変化を評価する。

(4) リコンビナントスクレロスチンタンパク質の合成と精製

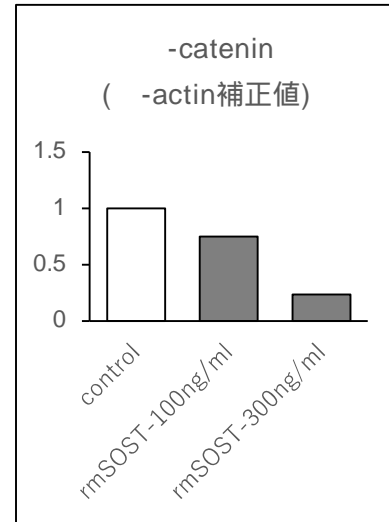
これまでは市販のリコンビナントスクレロスチンタンパク質を使用していたが、今後も *in vivo* 実験などで多量のスクレロスチンが必要となるため、スクレロスチンの合成と精製を行った。

4. 研究成果

(1) スクレロスチンによる骨肉腫細胞株への作用の解析

in vitro において各種骨肉腫細胞株 (143B ヒトおよび LM8 マウス) にスクレロスチンを投与し、古典的 Wnt 経路活性を示す カテニンのタンパク量の変化をウェスタンブロットにて評価した。既知の骨芽細胞における作用と同様に、骨肉腫細胞株においてもスクレロスチン投与により カテニンの蓄積量は減少した。

骨形成マーカーの ALP や転写因子の Runx2 や Osterix の発現の変化をリアルタイム PCR にて評価した。骨肉腫細胞株においてはスクレロスチン投与により骨形成マーカーや転写因子の発現に有意な変化は認めなかった。



(2) スクレロスチンを細分化したペプチド合成

それぞれのアミノ酸配列は、ループ 1 : CRELHFTRYVTDGPCRSKPVTELVLC、ループ 2 : CGPARLLPNAIGRGKWWRPSGPDFRC、ループ 3 : CPGGEAPRARKVRLVASC とし、PNAIG 配列を含むループ 2 は PNAIG 配列を含みさらに細分化したペプチド (アミノ酸配列 CLPNAIGRGKWC) も作製した。

Peptide a~d を岡山大学共同実験室に、Peptide A~D、B (環状構造)、D (環状構造) を Sigma Aldrich 社に依頼して作製した。

Peptide a : CRELHFTRYVTDGPCRSKPVTELVLC-CONH2
Peptide b : CGPARLLPNAIGRGKWWRPSGPDFRC-CONH2
Peptide c : CPGGEAPRARKVRLVASC-CONH2
Peptide d : CLPNAIGRGKWC-CONH2

Peptide A : Ac-RELHFTRYVTDGPCRSKPVTELV-NH2
Peptide B : Ac-GPARLLPNAIGRGKWWRPSGPDFR-NH2
Peptide C : Ac-PGGEAPRARKVRLVAS-NH2
Peptide D : Ac-LPNAIGRGKW-NH2
Peptide B (環状構造) : Ac-CGPARLLPNAIGRGKWWRPSGPDFRC-NH2(Cys&Cys bridge)
Peptide D (環状構造) : Ac-CLPNAIGRGKWC-NH2(Cys&Cys bridge)

マウス骨肉腫細胞株 LM8 とヒト骨肉腫細胞株 143B に対して、それぞれの Peptide を投与し、ウェスタンブロットにて カテニンのタンパク量を、alarBlue assay で増殖能を、Migration assay で遊走能の変化を評価したが、再現性のある結果は得られなかった。

(3) がんシグナル伝達経路リン酸化抗体アレイ

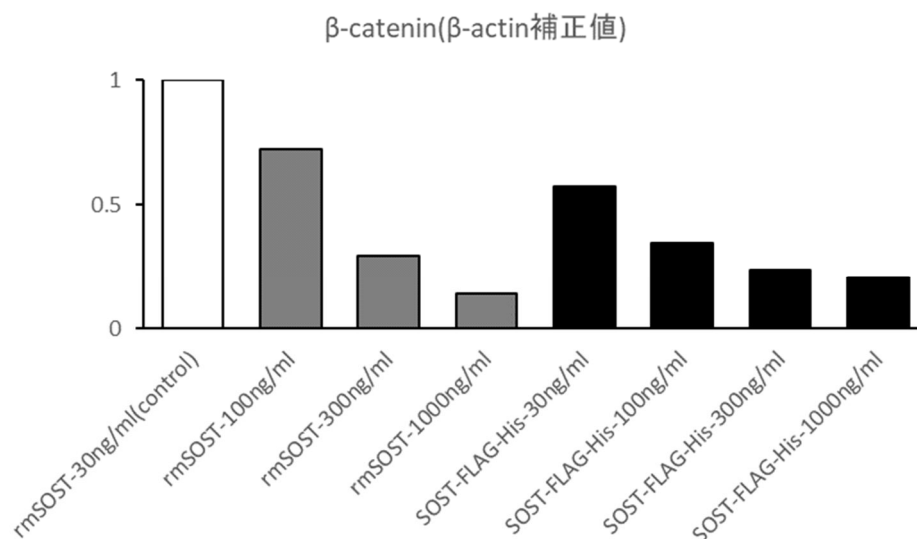
Cancer Signaling Phospho Antibody Array (Full Moon BioSystems) はがんシグナル伝達経路に重要な 269 の特異性の高い抗体を特徴としている。タンパク質のリン酸化を定性的にプロファイリングするための ELISA ベースのハイスループット抗体アレイであり、正常サンプルと治療・疾患サンプルの比較、バイオマーカー候補の同定を目的として設計されている。このアレイに含まれる 269 種類の抗体により、スクレロスチン投与による AKT シグナル伝達、アポトーシス、EGF/EGFR シグナル伝達、ERK/MAPK、p53 シグナル伝達などを含む複数のがん細胞経路の主要タンパク質の変化を解析した。

Name	SOST	Control	Ratio	log2Ratio	Name	SOST	Control	Ratio	log2Ratio
STAT4 (Phospho-Tyr693)	1.54	2.52	0.60979	-0.71361	4E-BP1 (Ab-36)	1.19	0.93	1.27742	0.35324
Myc (Phospho-Thr358)	0.80	1.17	0.68372	-0.54851	Empty	0.87	0.68	1.27371	0.34904
Myc (Phospho-Ser373)	0.98	1.36	0.72240	-0.46914	GAPDH	0.75	0.59	1.26592	0.34018
Myc (Phospho-Thr58)	0.68	0.92	0.74298	-0.42860	ERK3 (Ab-189)	0.92	0.73	1.26356	0.33750
VEGFR2 (Ab-951)	1.47	1.83	0.80645	-0.31034	HSF1 (Ab-303)	0.86	0.70	1.23340	0.30265
PDK1 (Phospho-Ser241)	1.34	1.65	0.81421	-0.29652	Caspase 3 (Ab-150)	0.88	0.71	1.22933	0.29787
FAK (Phospho-Tyr861)	0.86	1.05	0.81464	-0.29576	SHP-2 (Phospho-Tyr580)	1.18	0.97	1.21179	0.27714
STAT1 (Phospho-Tyr701)	0.86	1.06	0.81582	-0.29368	p53 (Ab-6)	0.86	0.71	1.21163	0.27695
Raf1 (Phospho-Ser259)	0.90	1.10	0.81834	-0.28922	Caspase 9 (Ab-125)	1.22	1.01	1.20894	0.27374
STAT6 (Phospho-Tyr641)	0.84	1.03	0.81925	-0.28762	p27Kip1 (Ab-10)	0.77	0.64	1.20336	0.26707

各種シグナル伝達経路に有意な変化は認められなかった。

(4) リコンビナントスクレロスチンタンパク質の合成と精製

スクレロスチンの DNA 断片を C57BL/6 マウスから抽出した total RNA をテンプレートにプライマー 5'- TCGACGCCACCATGCTCGAGGCCACCATGCAGCCCTCACTAG -3' および 5'-CTTTGTAGTCGGATCCGTAGCGTTCTCCAG -3'を用いた RT-PCR により増幅した。その後 GeneArt Seamless Cloning and Assembly Kit を用いて pEBMulti-linker -FLAG-His の XhoI 部位にクローニングして pEBMulti-Sclerostin-FLAG-His を作成した。pEBMulti-Sclerostin-FLAG-His を FreeStyle 293 細胞 (2.5-3.0 × 10⁶ 個/ml) に transfection した。OPTI-MEM とポリエチレンイミン (PEI) を同量で調節した 0.5 μg/ml の PEI 液と OPTI-MEM と pEBMulti-Sclerostin-FLAG-His (1 μg/ml) を同量で調節した 0.5 μg/ml の DNA 液をそれぞれ作成した後に 2 : 1 の割合で細胞に添加して 37 °C で 24 時間インキュベートした。その後、培地を追加し倍にしてペニシリン-ストレプトマイシン-アムホテリシン B 懸濁液を添加して 24 時間インキュベートした。さらに培地を追加して 6 日間インキュベートした。4 °C, 3000rpm で 10 分間遠心し上清を回収、さらに 4 °C, 9000rpm で 30 分間遠心し回収した上清を 0.22 μm のフィルターで濾過した。得られた濾過液を GE Kwick Cassette concentrator (10 kD, GE Healthcare) を使用しておよそ 20 倍に濃縮させる。得られた濃縮液 25 ml に対して Talon metal affinity resin (Clontech) 2 ml と塩化マグネシウムを終濃度 2 mM で混合し 4 °C で 2 時間転倒混和した。カラムに充填して、bed volumes の 3 倍の PBS(-) で 3 回洗浄、bed volumes の 1 倍の Wash buffer (10 mM imidazole, 150 mM NaCl, 100 mM Tris-HCl (pH 8.0)) で 1 回洗浄した。Elution buffer (250 mM imidazole, 150 mM NaCl, 100 mM Tris-HCl (pH 7.2)) 1 ml による溶出を 10 回行い、それぞれで得られた溶液を Bradford 法でタンパク量を確認した。タンパク量の多いものを複数選択し、PBS(-) による透析 8 時間を 3 回行った。透析後の溶液を 4 °C, 12000rpm で 30 分遠心後上清を回収し、精製を終了とした。得られたリコンビナントスクレロスチンの活性確認は、マウス骨肉腫細胞株 LM8 に投与し、カテニンの減少をウェスタンブロットで評価した。



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 1件）

1. 著者名 Ideta Hirokazu, Yoshida Kazushige, Okamoto Masanori, Sasaki Jun, Kito Munehisa, Aoki Kaoru, Yoshimura Yasuo, Suzuki Shuichiro, Tanaka Atsushi, Takazawa Akira, Haniu Hisao, Uemura Takeshi, Takizawa Takashi, Sobajima Atsushi, Kamanaka Takayuki, Takahashi Jun, Kato Hiroyuki, Saito Naoto	4. 巻 13
2. 論文標題 Antitumor Effect of Sclerostin against Osteosarcoma	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Cancers	6. 最初と最後の頁 6015 ~ 6015
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3390/cancers13236015	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1件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 出田宏和, 吉田和薫, 岡本正則, 青木薫, 鬼頭宗久, 田中厚誌, 小松幸子, 高橋淳, 齋藤直人
2. 発表標題 骨肉腫に対するスクレロスチンの抗腫瘍効果
3. 学会等名 第37回日本整形外科学会基礎学術集会
4. 発表年 2022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	出田 宏和 (Ideta Hirokazu) (00838534)	信州大学・医学部附属病院・医員 (13601)	

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