

令和 6 年 6 月 3 日現在

機関番号：94416

研究種目：基盤研究(C)（一般）

研究期間：2021～2023

課題番号：21K09338

研究課題名（和文）骨軟部腫瘍の肺転移における治療抵抗性メカニズムの解析

研究課題名（英文）Analysing cellular characterization Analysis of treatment resistance mechanisms in lung metastasis of bone and soft tissue sarcomas

研究代表者

笹川 覚（Sasagawa, Satoru）

医療法人徳洲会野崎徳洲会病院（附属研究所）・研究所・主任研究員

研究者番号：80345115

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）：滑膜肉腫はその治療に利用できる薬剤が少なく、その選択肢の増強は喫緊の課題である。本研究ではHDAC阻害剤に着目し、NK細胞により認識されるMICA/Bの発現を低用量のHDAC阻害剤で誘導できることを示した。滑膜肉腫細胞は3次元培養（スフェロイド形態）条件下では強力な薬剤耐性が顕在化することを見出し、それはTwist1分子が大きく寄与していることを示した。また、薬剤SN38がTwist1の発現を抑制することで薬剤耐性を解除できることを示した。これらの成果は、滑膜肉腫に対する新規薬剤治療法および薬剤耐性回避の道筋の礎となりうる。

研究成果の学術的意義や社会的意義

滑膜肉腫に対する新規薬剤の開発および薬剤耐性メカニズムの解明は臨床現場から強く希求される課題である。本研究ではHDAC阻害剤の新規利用法としてMICA/Bの誘導による自己の免疫による治療アプローチの可能性および、3次元形態で顕在化する薬剤耐性メカニズムを解明した。滑膜肉腫の治療薬としてのHDAC阻害剤の阻害剤の重要性を示したことに加えて、抗がん剤開発基礎研究における標準的な2次元培養に潜むリスクと3次元培養が抗がん剤研究における有効性を持つことを示した点で、その研究波及効果は大きいと考えられる。

研究成果の概要（英文）：There are a few drugs available for synovial sarcoma treatment, and increasing drug choices is an urgent issue in clinical practice. In this study, I focused on an HDAC inhibitor, romidepsin, and showed that the expression of MICA/B, which is recognized by NK cells, can be induced with low-dose romidepsin treatment. We found that synovial sarcoma cells display strong drug resistance under 3D culture (spheroid form) conditions, which was caused by the Twist1 molecule. I also showed that the drug SN38 could release drug resistance by suppressing the expression of Twist1. These results could be the cornerstone of novel drug therapies for synovial sarcoma and pathways to avoid drug resistance.

研究分野：分子腫瘍学

キーワード：滑膜肉腫 Twist1 MICA/B スフェロイド HDAC阻害剤

1. 研究開始当初の背景

滑膜肉腫の治療は集学的治療で行われるが、化学療法で利用可能な薬剤はドキソルビシンとイフォマイドの併用療法が主たるもので、オプション的にベバシズマブやトラベクテジンなどの選択肢が僅かにあるのみであった。抗がん剤の選択肢の少なさは治療方策の制限と直結するため、利用可能な抗がん剤のラインナップの強化は臨床において切実な要請であった。

滑膜肉腫は染色体転座による SS18-SSX 融合遺伝子の形成が発がんの起点とされ、その融合遺伝子産物は SWI/SNF 複合体や BAF 複合体を乗っ取り、クロマチンリモデリングに異常を来すことで悪性化すると考えられている。HDAC 阻害剤は様々ながん種で抗がん剤として用いられ、また HDAC は SWI/SNF 複合体のコンポーネントであることから、滑膜肉腫に対する HDAC 阻害剤の有用性に注目が集まっていた。しかしながら、現在のところ HDAC 阻害剤は滑膜肉腫に対する治療薬のラインナップに加わっていない。本研究では滑膜肉腫に対する HDAC 阻害剤の効能評価、薬剤耐性メカニズム及びその対応策について解析を行った。

2. 研究の目的

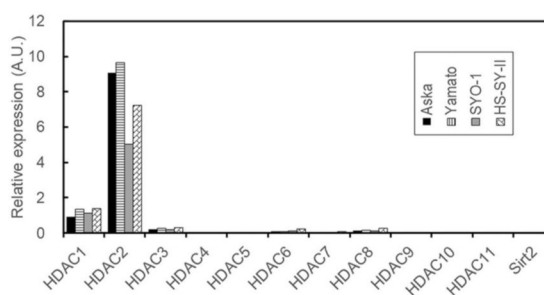
滑膜肉腫発症の原因とされる SS18-SSX 融合遺伝子の遺伝子産物は SWI/SNF 複合体などを機能的に乗っ取る。HDAC はそのコンポーネントであることから、滑膜肉腫に対して HDAC 阻害剤は有効な分子標的治療薬候補として注目されている。一般に、抗がん剤は殺細胞効果を評価軸の中心に据えて研究に用いられるが、生体に対しては様々な副作用やサイドエフェクトが懸念される。一方で、HDAC 阻害剤は殺細胞効果に及ばない低用量でも様々な薬効を示すことが示唆されている。本研究では殺細胞効果だけでなく、低用量で得られる様々な効能について解析することを念頭に解析を進めた。また、より実腫瘍像に近いスフェロイドを用いた解析を並行して行い、薬剤耐性メカニズムの一端を明らかにすることを目的とした。

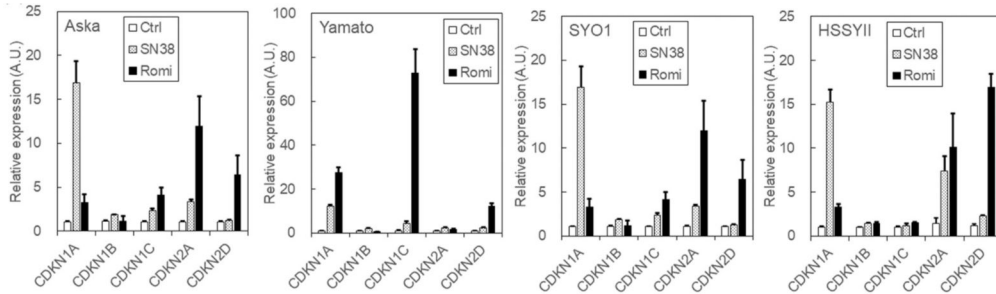
3. 研究の方法

本研究では4種類の滑膜肉腫細胞株 (Aska-SS、Yamato-SS、SYO1、HSSYII) を用いた。細胞培養で一般的な二次元平面培養に加えて、三次元的な細胞集団を形成するスフェロイド培養での解析も並行して実施し、細胞集団で顕在化する特性や薬剤応答性の変化、薬剤耐性メカニズムについて解析を行った。HDAC 阻害剤は、HDAC1 に対する特異性が高く低濃度で薬効を発揮する Romidepsin を主として使用した。解析は分子生物学、生化学、細胞生物学的手法で行った。

4. 研究成果

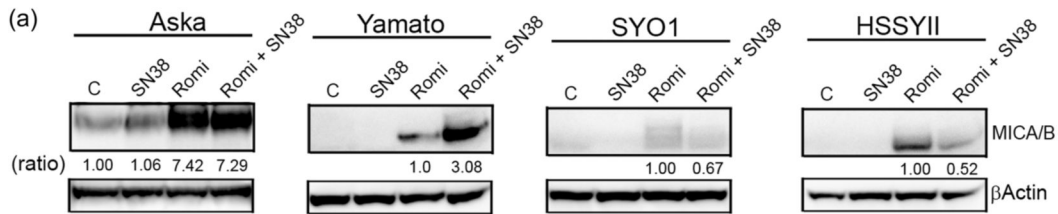
HDAC 阻害剤は様々な腫瘍細胞に対して殺細胞効果を示す。滑膜肉腫細胞においてもその効果は観察されるが、HDAC 阻害剤は殺細胞効果に及ばない低濃度でも多様な影響を及ぼすことが示唆されている。これらの背景を踏まえ、低用量の HDAC 阻害剤の効能について解析を行った。滑膜肉腫細胞では HDAC1,2 がドミナントに発現していたことから(右図)、本研究では HDAC1,2 に対して特異性の高い Romidepsin を HDAC 阻害剤として使用した。ヒストンアセチル化の蓄積を指標にすると、Romidepsin は 5nM からアセチル化の蓄積が WB により検出される。実験系の安定のため閾値よりも少し高い 20nM を実験濃度として設定した。



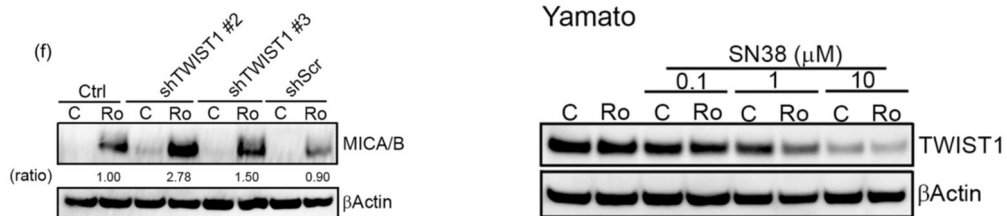


20nM の Romidepsin を 4 種類の滑膜肉腫細胞に投与すると、応答パターンは異なるものの、細胞周期抑制に寄与する複数の分子が誘導された(上図)。また、Cleaved-Caspase3 の誘導を指標として細胞死誘導を観察すると、20nM の濃度で細胞死が誘導される HDAC 阻害剤感受性の高い群(SYO1, HSSYII)と、細胞死が誘導されにくい HDAC 阻害剤感受性の低い群(Aska, Yamato)に分かれた。現在のところ、感受性を規定する分子やメカニズムについては不明である。

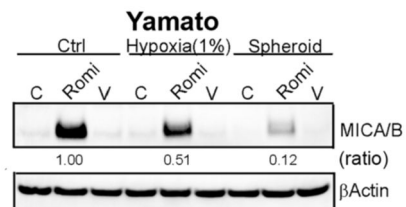
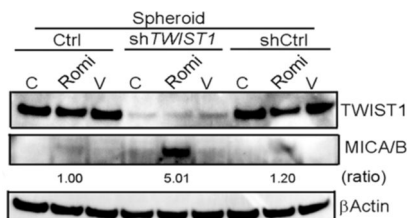
滑膜肉腫細胞の多くは NK 細胞によって認識される細胞表面抗原 MICA/B の発現が低下している。いくつかの上皮系腫瘍細胞で、HDAC 阻害剤が MICA/B の発現を誘導するとの報告があり、これに基づいて滑膜肉腫細胞に対して 20nM の Romidepsin を投与した結果、顕著に MICA/B の発現が誘導された(下図)。



また、抗がん剤イリノテカンの代謝産物である SN38 が Romidepsin による MICA/B 発現誘導量を増加させることを示した。SN38 による MICA/B の発現誘導の上昇についてそのメカニズムを探索した結果、滑膜肉腫細胞における MICA/B の発現誘導は Twist1 の存在により阻害されていることが判明し(下左図)、SN38 は Twist1 の発現を抑制することで MICA/B の発現増進に寄与することを明らかにした(下右図)。

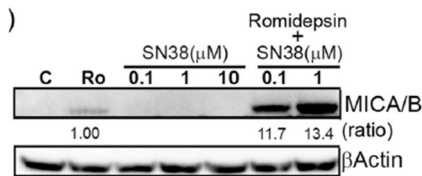


通常、培養細胞を用いた実験は培養皿にバラバラに細胞が接着した 2 次元的な環境下で行われる。しかしながら、実際の腫瘍は 3 次元的に細胞が集合した構造体を取っている。薬剤の評価では培養細胞とマウス CDX モデルや実際の患者の腫瘍とで乖離が観察されることが少なからずあり、問題となっている。この 3 次元的な構造を模倣するアプローチとして、スフェロイド培養を行った。このスフェロイドに対して Romidepsin を投与した結果、Yamato スフェロイドで MICA/B の誘導が著しく低下していることが判明した。(右図)。スフェロイド内部には低酸素領域が形成され、HIF1 が安定化する。Twist1 は薬剤抵抗性因子として知られ、HIF1 によって誘導されることから、Yamato スフェロイドにおける Romidepsin の薬効低下の要因は Twist1 の発現増加によるものではないかと推測した。この仮説を確認するため、shRNA による Twist1 の発現を抑制した Yamato 細胞でスフェロイドを形成し、Romidepsin を投与した。その結果、Twist1 を抑制したスフェロイドでは MICA/B の発現誘導が回復した(左図)。



通常、培養細胞を用いた実験は培養皿にバラバラに細胞が接着した 2 次元的な環境下で行われる。しかしながら、実際の腫瘍は 3 次元的に細胞が集合した構造体を取っている。薬剤の評価では培養細胞とマウス CDX モデルや実際の患者の腫瘍とで乖離が観察されることが少なからずあり、問題となっている。この 3 次元的な構造を模倣するアプローチとして、スフェロイド培養を行った。このスフェロイドに対して Romidepsin を投与した結果、Yamato スフェロイドで MICA/B の誘導が著しく低下していることが判明した。(右図)。スフェロイド内部には低酸素領域が形成され、HIF1 が安定化する。Twist1 は薬剤抵抗性因子として知られ、HIF1 によって誘導されることから、Yamato スフェロイドにおける Romidepsin の薬効低下の要因は Twist1 の発現増加によるものではないかと推測した。この仮説を確認するため、shRNA による Twist1 の発現を抑制した Yamato 細胞でスフェロイドを形成し、Romidepsin を投与した。その結果、Twist1 を抑制したスフェロイドでは MICA/B の発現誘導が回復した(左図)。

Twist1 が Romidepsin の薬効を阻害していることから、SN38を Romidepsin と併用することで Romidepsin の薬効を回復させることができると期待される。Yamato スフェロイドに対してこれらの薬剤を併用投与した結果、期待通りに MICA/B の発現誘導が回復した(右図)。



5. まとめ

以上の結果を統括すると、滑膜肉腫細胞は 2 次元培養条件下では見られなかった HDAC 阻害剤に対する抵抗性を、腫瘍環境に近いスフェロイド培養条件下で発揮する可能性がある。このスフェロイド培養条件下で顕在化する HDAC 阻害剤に対する薬剤抵抗性は Twist1 を介したものであることが示された。本研究で明らかにした Twist1 の抑制活性を持つイリノテカン代謝産物である SN38 は shRNA による Twist1 の発現抑制と同様の細胞作用が観察され、HDAC 阻害剤と SN38 の併用投与は顕著な HDAC 阻害剤の薬効回復を示した。

本研究成果は滑膜肉腫に対する HDAC 阻害剤の有効性を指示するものである。特に低用量での薬効について生化学、細胞生物学的に示したことから、HDAC 阻害剤に対する薬剤抵抗性メカニズム及びその解除法を提示できたことは、HDAC 阻害剤に阻害剤の滑膜肉腫治療への適用を強く後押しするものと考えられる。本研究成果は Cancer Innovation に受理された (doi.org/10.1002/cai2.113)。

6. 今後の研究の方向性

本研究では、2次元培養では観察されなかった薬剤抵抗性が3次元培養(スフェロイド)で顕在化する可能性を提示した。近年、2次元培養は薬効研究や薬剤スクリーニングにおいては単純化されすぎたアッセイ系であるとの見方が強まっており、in vitro(細胞培養)と in vivo(動物実験、臨床試験)の間の薬効の乖離を生み出すことが問題視されている。本研究ではスフェロイドの構造的特性が低酸素状態を誘導し、それが Twist1 の発現を上昇させることで薬剤抵抗性を顕在化させることを示した。これに加えて、3次元培養条件下で GPx4 の発現が上昇し、フェロトーシス誘導に対して抵抗性を示す可能性を見出した。ドラッグリポジショニングを狙って、旧リウマチ薬であるオーラノフィンによるフェロトーシス誘導を滑膜肉腫細胞に対して行ったところ、2次元培養条件下では実用的な濃度範囲で細胞死が誘導されたが、スフェロイド培養条件下ではほとんど細胞死が誘導されなかった。2次元培養条件下でオーラノフィンは顕著に GPx4 の発現を抑制していたが、スフェロイド培養条件下では GPx4 の発現を抑制していなかった。研究用試薬として GPx4 を抑制する RSL3 も同様の結果であった。興味深いことに、スフェロイドにおける GPx4 の発現上昇は遺伝子発現制御を介しておらず、タンパク質翻訳制御によるものであった。また、GPx4 発現上昇の下流でタンパク質翻訳制御に関わる 4EBP1 の発現も上昇することを確認しているが、この 4EBP1 の発現上昇も遺伝子発現生後を介していなかった。これらのデータは、DNA、RNA ベースの網羅的解析アプローチでは捉えられない現象であると推察され、3次元培養条件下で顕在化する様々な薬剤抵抗性の分子基盤を読み解く鍵になると期待している。

これらのパイロットデータは、抗がん剤研究における3次元培養の重要性を示しており、in vitro(細胞培養)と in vivo(動物実験、臨床試験)の間の乖離を埋めるものであることを強く示唆している。本研究の遂行過程で培った技術と知見をベースに、滑膜肉腫だけにとどまらない、広範ながん種における薬剤抵抗性メカニズムとその対抗策について研究を深化させていきたい。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計6件（うち査読付論文 6件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 4件）

1. 著者名 Yui Yoshihiro, Kumai Jun, Watanabe Kenta, Wakamatsu Toru, Sasagawa Satoru	4. 巻 151
2. 論文標題 Lung fibrosis is a novel therapeutic target to suppress lung metastasis of osteosarcoma	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 International Journal of Cancer	6. 最初と最後の頁 739 ~ 751
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1002/ijc.34008	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 Wakamatsu Toru, Ogawa Hisataka, Yoshida Keiichi, Matsuoka Yukiko, Shizuma Kazuko, Imura Yoshinori, Tamiya Hironari, Nakai Sho, Yagi Toshinari, Nagata Shigenori, Yui Yoshihiro, Sasagawa Satoru, Takenaka Satoshi	4. 巻 12
2. 論文標題 Establishment of Organoids From Human Epithelioid Sarcoma With the Air-Liquid Interface Organoid Cultures	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Frontiers in Oncology	6. 最初と最後の頁 893592
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3389/fonc.2022.893592	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 Amari Keigo, Sasagawa Satoru, Imayoshi Natsuki, Toda Yuki, Hosogi Shigekuni, Imamura Toshihiko, Ashihara Eishi	4. 巻 588
2. 論文標題 The CDK4/6-UCL5-BRD4 axis confers resistance to BET inhibitors in MLL-rearranged leukemia cells by suppressing BRD4 protein degradation	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Biochemical and Biophysical Research Communications	6. 最初と最後の頁 147 ~ 153
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.bbrc.2021.12.063	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 Suzuki Rie, Wakamatsu Toru, Yoshida Keiichi, Matsuoka Yukiko, Takami Haruna, Nakai Sho, Tamiya Hironari, Kakunaga Shigeki, Yagi Toshinari, Yoshida Ken-ichi, Imura Yoshinori, Yui Yoshihiro, Sasagawa Satoru, Takenaka Satoshi	4. 巻 41
2. 論文標題 Genetic characterization of a novel organoid from human malignant giant-cell tumor	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 Journal of Bone Oncology	6. 最初と最後の頁 100486 ~ 100486
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.jbo.2023.100486	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 Kishi Shingo, Mori Shiori, Fujiwara-Tani Rina, Ogata Ruiko, Sasaki Rika, Ikemoto Ayaka, Goto Kei, Sasaki Takamitsu, Miyake Makito, Sasagawa Satoru, Kawaichi Masashi, Luo Yi, Bhawal Ujjal Kumar, Fujimoto Kiyohide, Nakagawa Hidemitsu, Kuniyasu Hiroki	4. 巻 24
2. 論文標題 ERVK13-1/miR-873-5p/GNMT Axis Promotes Metastatic Potential in Human Bladder Cancer through Sarcosine Production	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 International Journal of Molecular Sciences	6. 最初と最後の頁 16367 ~ 16367
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3390/ijms242216367	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 Sasagawa Satoru, Kumai Jun, Wakamatsu Toru, Yui Yoshihiro	4. 巻 3
2. 論文標題 Improvement of histone deacetylase inhibitor efficacy by SN38 through TWIST1 suppression in synovial sarcoma	5. 発行年 2024年
3. 雑誌名 Cancer Innovation	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1002/cai2.113	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 笹川 寛
2. 発表標題 滑膜肉腫細胞に対するHDAC阻害剤とSN38の併用効果
3. 学会等名 第26回 日本がん分子標的治療学会学術集会
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
---------	---------------------------	-----------------------	----

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