

令和 6 年 5 月 24 日現在

機関番号：17102

研究種目：研究活動スタート支援

研究期間：2021～2023

課題番号：21K20838

研究課題名（和文）軟骨肉腫の悪性化機序の解明および新規治療ターゲットの検索

研究課題名（英文）Investigation of the Mechanisms of Malignant Transformation in Chondrosarcoma and Search for Novel Therapeutic Targets

研究代表者

鍋島 央 (Nabeshima, Akira)

九州大学・大学病院・助教

研究者番号：90908683

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 2,400,000 円

研究成果の概要（和文）：脱分化型軟骨肉腫（DDCS）は化学療法、放射線治療に極めて抵抗性であり、予後不良な疾患であるため新規治療法の開発が望まれている。今回我々はDDCSにおけるエピゲノム異常に注目し新治療標的の探索を行った。網羅的に遺伝子解析を行いPRKCZという因子に着目した。DDCSの臨床サンプル、in vitroおよびin vivo実験を行い、DDCSにおいてDNAメチル化の増加とPRKCZの発現低下はATM/CHK2経路の不活性化を介してアポトーシスを阻害することがわかった。デシタピンの投与によりアポトーシスを誘導して細胞増殖を抑制することが示され、PRKCZはDDCSの新規治療標的となり得ると考えられた。

研究成果の学術的意義や社会的意義

脱分化型軟骨肉腫（DDCS）は予後不良な腫瘍であるため新規治療法の開発が望まれている。今回我々はDDCSにおいてDNAメチル化の増加とPRKCZの発現低下はATM/CHK2経路の不活性化を介してアポトーシスを阻害するという新しいメカニズムを解明した。その経路をデシタピンの投与により阻害すると、アポトーシスを誘導して細胞増殖を抑制することが示された。

本研究により軟骨肉腫に対する新しい治療ターゲットが解明された。また、デシタピンは既存薬であるため早期の臨床応用が期待でき、DDCS患者の生存率向上と生活の質の改善に寄与する可能性がある。

研究成果の概要（英文）：Dedifferentiated chondrosarcoma (DDCS) is highly resistant to chemotherapy and radiation therapy, and has a poor prognosis, making the development of new treatments highly desirable. In this study, we focused on epigenomic abnormalities in DDCS to identify new therapeutic targets. Through comprehensive genetic analysis, we focused on a factor called PRKCZ. Clinical samples of DDCS, as well as in vitro and in vivo experiments, revealed that increased DNA methylation and decreased PRKCZ expression in DDCS inhibit apoptosis through the inactivation of the ATM/CHK2 pathway. Administration of decitabine was shown to induce apoptosis and inhibit cell proliferation, suggesting that PRKCZ could be a novel therapeutic target for DDCS.

研究分野：骨軟部腫瘍

キーワード：軟骨肉腫 エピゲノム DNAメチル化 がん治療

1. 研究開始当初の背景

軟骨肉腫(Chondrosarcoma: 以下CS)は、腫瘍性の軟骨を形成するが骨・類骨形成を示さないことを特徴とし、悪性骨腫瘍のなかで2番目の発生頻度を持つ。化学療法、放射線治療に極めて抵抗性であり外科的切除が唯一の治療法である。CSには通常型、脱分化型、間葉型、明細胞型などの組織型が存在する。CSの5年生存率は通常型高悪性度CSの場合約40%、脱分化型の場合は20%以下と現在でも予後不良である。よって、CSの悪性化機構の解明による新規治療法の開発が、CS予後改善のために必要である。

遺伝子の突然変異だけでなくDNAメチル化やヒストン修飾によるエピジェネティックな遺伝子発現制御機構の異常も腫瘍の悪性化に関与しており、エピゲノムを解析することで新たな治療ターゲットの発見につながる。CSの臨床サンプルを用いたマルチオミックス解析研究でDNAメチル化は予後と相関を認めたとの報告があるが、どの遺伝子の高メチル化が特に予後と関与しているかについては不明であった。エピゲノム異常は軟骨肉腫の悪性化に関与し新規治療ターゲットになり得るかという問いについてはいまだ解明されておらず、本研究において解明すべき課題と考える。

2. 研究の目的

DNAメチル化が軟骨肉腫の悪性化に果たす役割を調べ、エピゲノム異常が新規治療ターゲットとなり得るか検討した。

3. 研究の方法

1) バイオインフォマティクス解析で新規治療ターゲット候補となる遺伝子の絞り込み
遺伝子発現・DNAメチル化・臨床情報を含む軟骨肉腫のデータセットをGene Expression OmnibusとArrayExpressのデータベースより抽出しin silico解析を行い、通常型軟骨肉腫(CCS)と悪性度の高い脱分化型軟骨肉腫(DDCS)のDNAメチル化やmRNAの発現量を比較し候補となる遺伝子をPRKCZを含む小数個まで絞り込んだ。

2) 軟骨肉腫細胞株におけるPRKCZ強制発現およびノックダウンによる表現型の解析
DDCSより樹立した細胞増殖の速いNDCS-1とCCSより樹立した細胞増殖の遅いOUMS-27の2つの細胞株を用いて因子Xの表現型に及ぼす影響を検討した。NDCS-1ではOUMS-27と比較して因子Xの発現が有意に低下していることが後述する予備的研究で確認できており、NDCS-1においてはレンチウイルスを用いてPRKCZを強制発現、OUMS-27においてはsiRNAを用いてPRKCZをノックダウンさせ、それぞれ増殖能(proliferation assay, colony formation assay)、遊走能(migration assay)、浸潤能(invasion assay)、アポトーシス(cell cycle analysis)の評価を行った。in vivo実験としてはxenograftモデルとして免疫不全マウス(nudeマウス)にCS細胞株を皮下注射し増殖の変化を検討した。

3) 軟骨肉腫の臨床検体を用いた検討

CSの臨床サンプルを抗PRKCZ抗体で免疫染色を行い、実臨床においてその発現と予後に関して相関を認めるか検討した。また、通常型CSの悪性グレードや組織型間でのPRKCZの発現との相関関係についても検討した。

4) PRKCZの分子的働きの解析

PRKCZはプロテインキナーゼの一つであり、プロテインキナーゼは下流のタンパク質をリン酸化させシグナル伝達を行うことで細胞の働きの調整を行っている。リン酸化キナーゼ抗体アレイを用いてリン酸化したタンパク質を網羅的に評価し、因子Xを強制発現もしくはノックダウンさせた細胞株とコントロール群間の比較を行いどのシグナル経路が最も関与しているかを解析した。また、シグナル経路の中でも因子Xが直接関与している因子を免疫沈降アッセイ等を用いて同定した。

5) DNAメチル化阻害薬の効果検討

DNA高メチル化によりPRKCZの発現が低下し増殖能が促進していると予想され、メチル化阻害薬を投与することでPRKCZの発現回復および増殖能への効果を検討した。具体的には、NDCS-1細胞株にメチル化阻害薬を投与し、細胞増殖能の変化やPRKCZおよびその下流の因子の発現をmRNA・タンパクレベルで確認した。またxenograftモデルを用いたin vivo実験にてメチル化阻害薬の腫瘍縮小効果を検討した。

4. 研究成果

DNAメチル化により脱分化型軟骨肉腫(DDCS)と通常型軟骨肉腫(CCS)で発現低下する遺伝子をバイオインフォマティクス手法を用いて網羅的に検索しターゲット因子の同定を行い、PRKCZと

いう因子に着目した。DDCS の臨床サンプルでその発現を検証したところ、DNA メチル化によって PRKCZ の発現は抑制されており、PRKCZ の発現が低い群では予後不良であった。

次に複数の軟骨肉腫細胞株を用いて PRKCZ の分子機能を検討した。レンチウイルスを用いて PRKCZ を過剰に発現させると軟骨肉腫細胞株の細胞増殖を抑制し、アポトーシスが増加していた。また、Xenograft マウスモデルにおいても PRKCZ 過剰発現株の増殖は抑制されていた。

PRKCZ はプロテインキナーゼの一つであり、プロテインキナーゼは下流のタンパク質をリン酸化させシグナル伝達を行うことで細胞の働きの調整を行っている。リン酸化キナーゼ抗体アレイを用いてリン酸化したタンパク質を網羅的に評価したところ、PRKCZ は ATM に直接結合して活性化し、CHK2 のリン酸化とそれに続くアポトーシスを引き起こしていることがわかった。

また、DNA メチル化酵素阻害剤であるデシタビンの治療効果を *in vitro* および *in vivo* で評価した。デシタビンは PRKCZ のプロモーター領域を脱メチル化することで PRKCZ の発現を増加させ、ATM/CHK2 経路を活性化し、アポトーシスを誘導して細胞増殖を抑制することが示された。

以上より、脱分化軟骨肉腫において DNA メチル化の増加と PRKCZ の発現低下は ATM/CHK2 経路の不活性化を介してアポトーシスを阻害することがわかった。デシタビンの投与により PRKCZ のプロモーター領域を脱メチル化することで PRKCZ の発現を増加させ、ATM/CHK2 経路を活性化し、アポトーシスを誘導して細胞増殖を抑制することが示され、PRKCZ は脱分化型軟骨肉腫の新規治療ターゲットとなり得ると考えられた。

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 Shimada Eijiro, Matsumoto Yoshihiro, Nakagawa Makoto, Susuki Yosuke, Endo Makoto, Setsu Nokitaka, Fujiwara Toshifumi, Iida Keiichiro, Nabeshima Akira, Yahiro Kenichiro, Kimura Atsushi, Hirose Takeshi, Kanahori Masaya, Oyama Ryunosuke, Oda Yoshinao, Nakashima Yasuharu	4. 巻 126
2. 論文標題 Methylation-mediated silencing of protein kinase C zeta induces apoptosis avoidance through ATM/CHK2 inactivation in dedifferentiated chondrosarcoma	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 British Journal of Cancer	6. 最初と最後の頁 1289 ~ 1300
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1038/s41416-021-01695-1	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1件（うち招待講演 0件/うち国際学会 1件）

1. 発表者名 Eijiro Shimada; Yoshihiro Matsumoto; Makoto Nakagawa; Yosuke Susuki; Makoto Endo; Nokitaka Setsu; Toshifumi Fujiwara; Keiichiro Iida; Akira Nabeshima; Kenichiro Yahiro; Atsushi Kimura; Takeshi Hirose; Masaya Kanahori; Ryunosuke Oyama; Yoshinao Oda; Yasuharu Nakashima
2. 発表標題 Methylation Mediated Silencing Of Protein Kinase C Zeta Induces Apoptosis Avoidance Through ATM/CHK2 Inactivation In Dedifferentiated Chondrosarcoma
3. 学会等名 ORS Annual Meeting（国際学会）
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
---------	---------