

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 6 月 21 日現在

機関番号：17701

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2013～2015

課題番号：25462342

研究課題名(和文) 分子標的治療薬による骨肉腫新規治療法研究

研究課題名(英文) Research for Molecular Target of Osteosarcoma treatment

研究代表者

瀬戸口 啓夫 (Setoguchi, Takao)

鹿児島大学・医歯(薬)学総合研究科・特任准教授

研究者番号：40423727

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,900,000円

研究成果の概要(和文)：骨肉腫に対する新規分子標的治療開発を目標として研究を行った。その結果、骨肉腫ではHedgehog pathwayが活性化しており、GLI family zinc finger 2 (GLI2)をノックダウンすると移動・浸潤能は低下、GLI転写阻害剤である三酸化ヒ素処理すると浸潤能が低下した。また骨肉腫細胞株をヌードマウスの膝に移植し、三酸化ヒ素とvismodegib(SMO阻害剤)を併用すると肺転移が減少した。さらに下流のribosomal protein S3を阻害することで骨肉腫の増殖能と転移能が抑制できることを見出した。

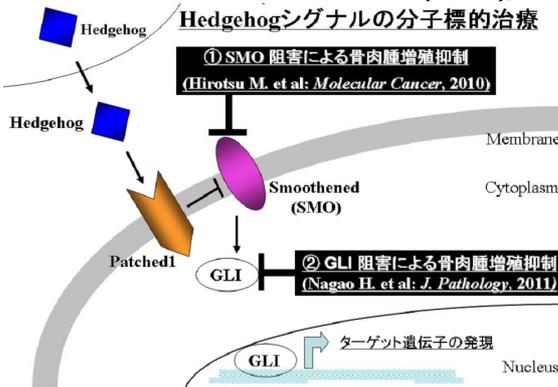
研究成果の概要(英文)：We researched the molecular target for osteosarcoma treatment. We found that Hedgehog pathway is upregulated in human osteosarcoma. Inhibition of GLI family zinc finger 2 (GLI2) prevent osteosarcoma invasion. Invasion assay showed that combination of arsenic trioxide (ATO) and vismodegib (SMO inhibitor) prevented invasion of human osteosarcoma cells. Xenograft model showed that combination of ATO and vismodegib prevented lung metastasis of osteosarcoma. We found that expression of ribosomal protein S3 (RPS3) is regulated by GLI2. RPS3 promoted the invasion of osteosarcoma cells. These findings suggest that GLI2-RPS3 pathway might be a new therapeutic target for osteosarcoma.

研究分野：骨軟部肉腫

キーワード：骨肉腫 Hedgehog GLI2 RPS3 metastasis

1. 研究開始当初の背景

Hedgehog は胎生期において重要な morphogen で中枢神経系・肺・胃腸系、骨・軟骨などの形態形成に関与していることが知られている。一方で Hedgehog の異常活性化が B cell lymphoma、基底細胞癌、髄芽腫、乳癌、卵巣癌、前立腺癌、消化器癌、横紋筋肉腫などの多くの悪性腫瘍に関連していることも報告されている。我々はこれまでに Hedgehog シグナル関連分子である Smoothend (SMO)・GLI family zinc finger 2 (GLI2) をターゲットとして阻害すると、in vitro, in vivo において骨軟部肉腫の増殖抑制作用を示すことを報告した(下図)。



一方で 2011 年に Journal of Clinical Investigation 誌に慢性骨髄性白血病の治療薬として日本でも用いられている Arsenic tri oxide (ATO) が Hedgehog シグナル下流で活性化される転写因子の GLI の転写を阻害することで抗腫瘍効果を発揮することが報告された。

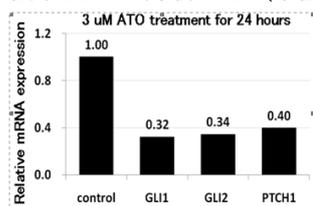
Beauchamp EM. et al. Arsenic trioxide inhibits human cancer cell growth and tumor development in mice by blocking Hedgehog/GLI pathway: The Journal of Clinical Investigation. 2011; 121: 148-160

2. 研究の目的

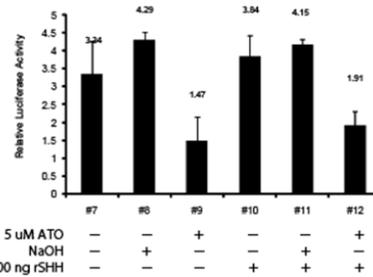
本研究では、これまでの研究成果を臨床の場で患者に還元するための研究を行う。具体的にはすでに臨床応用されている薬剤で Hedgehog シグナル阻害作用がある薬剤の治療応用研究を行う。同時に Hedgehog シグナルの骨・軟部肉腫の転移・浸潤における分子メカニズムを詳細に解析する。

我々は ATO の骨肉腫細胞に対する作用の検討を開始し、下記の結果が得られた。

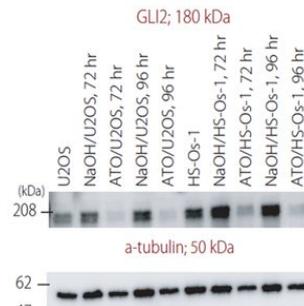
(1) ATO は骨肉腫細胞で GLI のターゲット遺伝子発現を抑制する(下図)。



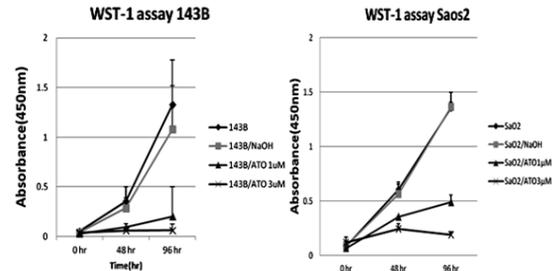
(2) ATO は骨肉腫細胞で GLI の転写阻害作用を示す(下図)。



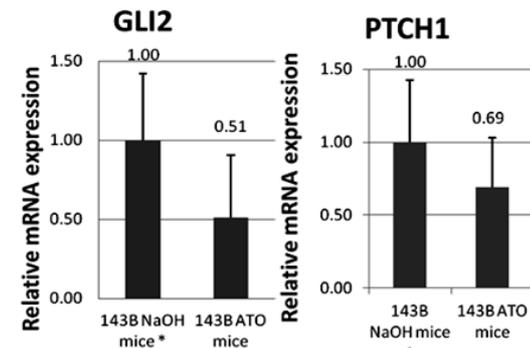
(3) ATO は GLI2 の発現を抑制する(下図)。



(4) ATO は骨肉腫細胞の増殖を抑制する(下図)。



(5) 骨肉腫マウス Xenograft モデルに ATO 投与すると in vivo でも GLI ターゲット遺伝子の発現を抑制する(下図)。



これらの結果より、我々はこれまでの基礎的研究成果を臨床の場で患者に還元するために ATO 等を骨肉腫患者に投与してその治療効果を判定するための研究を行う。申請者らの研究は基礎的研究結果をもとに臨床応用を目指すもので社会的に有益であると考える。

今回の期待される研究成果では特に下記二点が特に優れていると言える。

- (1) 骨軟部腫瘍新規薬物治療法の速やかな臨床応用が期待できる
- (2) 骨軟部腫瘍患者での致命的病変となる肺転移の分子メカニズムの解明

3. 研究の方法

(1) ATO や他の薬剤による Hedgehog シグナル阻害作用の検討

(2) ATO などによる骨軟部肉腫増殖抑制の検討

(3) ATO 投与予定骨軟部肉腫患者より切除した腫瘍組織より樹立した ATO による骨軟部肉腫増殖・転移能への効果の *in vivo* での検討

(4) ATO などによる骨肉腫細胞株の増殖阻害作用の *in vivo* での検討

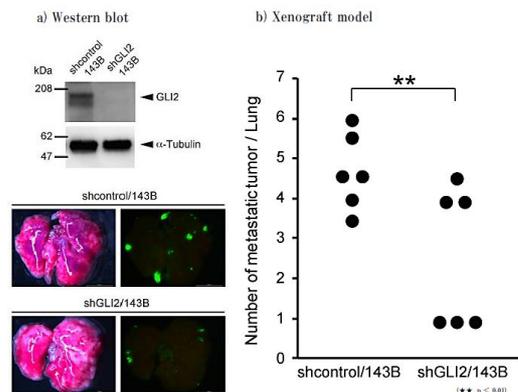
(5) ATO などの投与により細胞の浸潤能の低下に關与する因子の解析

(6) ATO などによる骨軟部肉腫増殖・転移能への効果の *in vivo* での検討

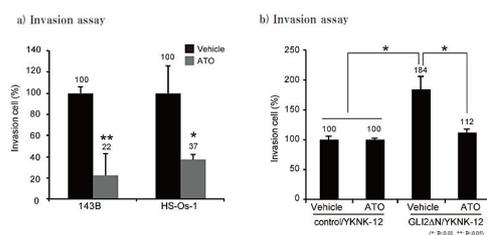
(7) ATO などにより、発現や活性が制御される増殖因子関連遺伝子の抑制による骨軟部肉腫増殖抑制の検討

4. 研究成果

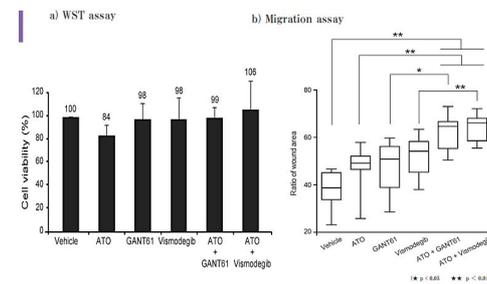
GLI2 をノックダウンした骨肉腫細胞株をヌードマウスの膝に移植すると肺転移率の数が減少した。



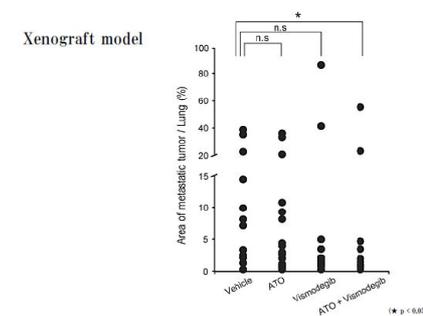
GLI 転写阻害剤である三酸化ヒ素 (ATO) は、骨肉腫細胞株及び、GLI2 過剰発現間葉系幹細胞の浸潤能を抑制する。



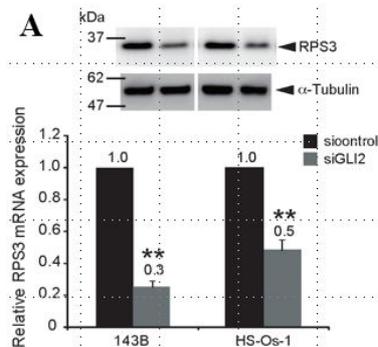
ATO と SMO 抑制剤である vismodegib 併用は、骨肉腫の移動能を相乗的に抑制する



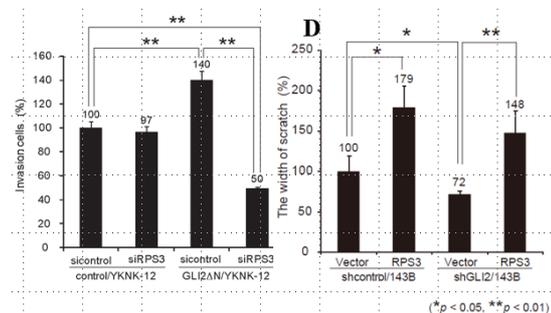
骨肉腫細胞株をヌードマウスの膝に移植し、三酸化ヒ素 (GLI 阻害剤) と vismodegib (SMO 阻害剤) を併用すると肺転移が減少した。



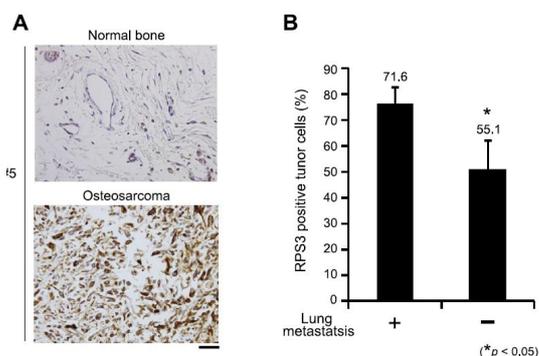
GLI2 のノックダウンにより発現が変化する遺伝子の探索をマイクロアレイで行った結果、ribosomal protein S3 (RPS3) が GLI2 のターゲット遺伝子であることが示された。



RPS3 のノックダウンで骨肉腫の移動能・浸潤能は低下し、逆に間葉系幹細胞に RPS3 を強制発現させると移動能・浸潤能は亢進した。



骨肉腫患者組織で RPS3 が強発現しており、肺転移患者組織で発現が高い。GLI2、RPS3 は骨肉腫増殖・転移抑制の治療標的分子となり得ることが示唆された。



また ATO, vismodegib は骨肉腫の治療薬として期待できる。

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文](計3件)

以下の論文は全て査読されています

Combination of Hedgehog inhibitors and standard anticancer agents synergistically prevent osteosarcoma growth.

Saitoh Y, Setoguchi T, Nagata M, Tsuru A, Nakamura S, Nagano S, Ishidou Y, Nagao-Kitamoto H, Yokouchi M, Maeda S, Tanimoto A, Furukawa T, Komiya S.
Int J Oncol. 2016 Jan;48(1):235-42.

GLI2 is a novel therapeutic target for metastasis of osteosarcoma.

Nagao-Kitamoto H, Nagata M, Nagano S, Kitamoto S, Ishidou Y, Yamamoto T, Nakamura S, Tsuru A, Abematsu M, Fujimoto Y, Yokouchi M, Kitajima S, Yoshioka T, Maeda S, Yonezawa S, Komiya S, Setoguchi T.
Int J Cancer. 2015 Mar 15;136(6):1276-84.

Ribosomal protein S3 regulates GLI2-mediated osteosarcoma invasion.

Nagao-Kitamoto H, Setoguchi T, Kitamoto S, Nakamura S, Tsuru A, Nagata M, Nagano S, Ishidou Y, Yokouchi M, Kitajima S, Yoshioka T, Maeda S, Yonezawa S, Komiya S.
Cancer Lett. 2015 Jan 28;356(2 Pt B):855-61.

[学会発表](計3件)

Combination use of Hedgehog inhibitors prevent osteosarcoma growth synergistically
Saitoh Y., Setoguchi T., Nagata M.,

Nakamura S., Nagano S., Ishidou Y., Komiya S.

62th Annual Meeting of the Orthopaedic Research Society
2016. 3 (Orland, USA)

Inhibition of GLI2 and SMO by clinical agents prevents osteosarcoma metastasis.

Nagata M., Setoguchi T., Nagao-Kitamoto H., Nakamura S., Nagano S., Ishidou Y., Komiya S.

61th Annual Meeting of the Orthopaedic Research Society
2015. 3(Las Vegas, USA)

Inhibition of GLI2 prevents invasion of osteosarcoma via down-regulation of ribosomal protein S3.

Setoguchi T., Komiya S.

Australian and New Zealand Bone and Mineral Society 23rd Annual Scientific Meeting
2013, 9(Melbourne, Australia)

6. 研究組織

(1)研究代表者

瀬戸口 啓夫 (SETOGUCHI Takao)

鹿児島大学・歯学部総合研究科・特任准教授

研究者番号：40423727

(2)研究分担者

小宮 節郎 (KOMIYA Setsuro)

鹿児島大学・歯学部医学系・教授

研究者番号：30178371

永野 聡 (NAGANO Satoshi)

鹿児島大学・歯学部医学系・准教授

研究者番号：50373139