

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 6 月 10 日現在

機関番号：82606

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2014～2015

課題番号：26861218

研究課題名(和文)メタボリックエラーを標的とした肉腫の新規治療開発

研究課題名(英文)The Development of Novel Therapy Targeting Metabolic Pathway Dysregulation in Doxorubicin-resistant Bone and Soft Tissue Sarcomas

研究代表者

小林 英介(Kobayashi, Eisuke)

国立研究開発法人国立がん研究センター・中央病院・医員

研究者番号：40365292

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,000,000円

研究成果の概要(和文)：肉腫のキードラッグであるドキソルビシン(DOX)抵抗性である類上皮肉腫と胞巣状軟部肉腫及びDOX耐性骨肉腫の細胞株を用いて、非必須アミノ酸であるアルギニン(Arg)生成に不可欠なアルギノコハク酸合成酵素(ASS1)欠損を標的とする新規治療の有用性を検討した。DOX抵抗性肉腫においてASS1の発現低下を認め、Arg枯渇療法が有用であることを明らかにした。また、誘導されるオートファジーを阻害する事でArg枯渇療法に併用できる新規治療法の可能性を見出した。また、新規にASS1がDox耐性に関連する可能性を示唆し、今後のアルギニン代謝を標的とした治療に対して非常に有意義であると考えられた。

研究成果の概要(英文)：We focused on the arginosuccinate synthetase 1 (ASS1), which is essential for generation of arginine with non-essential amino acids in metabolic error of cancer cell metabolism. The expression of ASS1 was reduced in Dox-resistant sarcoma cells. Interestingly, there was an inverse relationship between the expression of ASS1 and the expression of P-gp. Furthermore, the inhibition of cellular proliferation, with G1-arrest, was shown to lead to autophagy with arginine deprivation. The combination of chloroquine plus arginine deprivation was more effective than arginine deprivation alone. In ASS1 reduced cells, the expression of P-gp was upregulated in comparison to negative controls. These results indicate that the reduced expression of ASS1 expression in Dox-resistant sarcomas may contribute to drug resistance. ASS1 deficiency is a potential target for novel drug therapies.

研究分野：整形外科 骨軟部腫瘍

キーワード：肉腫 メタボリックエラー アルギニン オートファジー

1. 研究開始当初の背景

骨軟部肉腫は 1980 年代の化学療法の導入により一定の治療成績の改善は認められたものも、疾患の希少性・組織型の多様性などより、新規治療薬の開発が非常に困難である。胞巣状軟部肉腫は、Christoperson らが 1952 年に初めて提唱した疾患であり、若年者に発生する悪性軟部腫瘍の 1 つで、通常の化学療法に抵抗性を示し、手術不可能な症例の予後は非常に悪い[1, 2]。また、手術適応症例に関しても腫瘍切除後の脳転移が多いなど治療に難渋する。近年では、Kummar らが選択性の高い血管内皮増殖因子受容体チロシンキナーゼ阻害剤である cediranib の有用性について報告したことで、分子標的剤の効果も検討されている[3]。類上皮肉腫は、1970 年に Enzinger らにより提唱され、若年成人に多く、手指に好発する[4]。また、他の悪性腫瘍に比して所属リンパ節転移が多く、胞巣状軟部肉腫と同様に手術不能例や進行例では治療に難渋する腫瘍であり、新規治療法の実用化が強く望まれている[5]。

今回我々は予後マーカー及び新規治療ターゲットの開発にあたり、肉腫細胞代謝におけるメタボリックエラー(代謝酵素欠損)に着目した。“メタボリックエラー”とは、ある特定の非必須アミノ酸を作り出すための代謝酵素の発現が著しく低下している事はがん細胞においてしばしば散見される。このようながん細胞は、非必須アミノ酸を細胞外より輸送する事で代償することが明らかになっている[6]。このメタボリックエラーを利用した代表的治療法として、白血病の寛解導入治療役である L-Asparaginase が知られている[7]。白血病細胞はアスパラギン酸合成酵素を高頻度に欠損し、血中アスパラギン酸を腫瘍細胞内に直接輸送することで代償している。このため体内のアスパラギン酸分解酵素である L-Asparaginase の投与によって、白血病腫瘍細胞増殖が著しく抑制されることが知られている。

共同研究者の小林は骨肉腫を用いた遺伝子発現解析を行い、細胞内のアルギニン生成に必須である Argininosuccinate synthase1(ASS1)が肺転移を起こす予後不良骨肉腫で発現低下し予後不良マーカーになることを報告した[8]。このような ASS1 のメタボリックエラーは、肝細胞がん、メラノーマなどの様々な悪性腫瘍[9, 10]や粘液繊維肉腫[11]などの肉腫においても報告されている。

このような知見のもとに、希少な肉腫細胞株を用いて、ASS1 をはじめとするメタボリックエラーが関わるメカニズムも解明するとともに、将来的には肉腫の新規バイオマーカーや新規治療薬としての臨床応用を目標としている。

2. 研究の目的

本研究は、難治性かつ「希少がん」である骨軟部肉腫の生命予後の改善及び治療標的の開発を目的として行うものである。“がん細胞代謝におけるメタボリックエラー(代謝酵素の欠損)”に着目して研究を進め、骨軟部肉腫の治療抵抗の解明と新規治療薬の開発(特に治療抵抗性のある肉腫に対する新規治療薬)を行う。本研究では、臨床学的に肉腫の key drug である Doxorubicin(Dox) 抵抗性である類上皮肉腫(ES-X, VAESBJ)と胞巣状軟部肉腫(ASPS-KY)の細胞株及び Dox 抵抗性骨肉腫(KHOSR2)の細胞株を用いて、アルギニン生成に必須である代謝酵素の Argininosuccinate synthase(ASS1)に注目し、ASS1 を標的とした新規治療法を探索した。

3. 研究の方法

方法としては、各種細胞株が Dox 抵抗性である事を確認するために、Dox の IC50(The 50% inhibitory concentration)測定及び、薬剤耐性関連タンパク質である P-glycoprotein(P-gp)の発現解析を行った。次に ASS1 発現解析を行い、アルギニン枯渇による抗腫瘍効果を確認するためにアルギニン枯渇環境下での細胞増殖及びフローサイトメトリーを用いた細胞周期を解析した。それに加え、アルギニン枯渇環境でのオートファジー解析及び、アルギニン枯渇環境下でのオートファジー阻害剤の有用性の検討を行い、また、ASS1 発現低下と薬剤耐性に関して、いくつかのがん種で報告されている[12]。そのため、本研究においても、薬剤耐性との関連を調べるために、ASS1 発現を強制抑制することによる P-gp の発現解析を行った。

4. 研究成果

Dox 抵抗性細胞株である VAESBJ, ES-X, APSS-KY, KHOSR2 では、コントロールである Dox 感受性のある乳がん細胞株(MCF-7)、骨肉腫細胞株(KHOS)に比べて、Dox の IC50 が優位に高値であった。次に、薬剤抵抗性関連タンパク質である P-glycoprotein(P-gp)の発現解析を行うと、Dox 抵抗性肉腫細胞株では、P-gp が高発現であった。(Fig.1a) 次に ASS1 の発現解析を行ったところ、Dox 抵抗性肉腫では低発現であり、P-gp 発現とは逆相関の傾向を示した。(Fig, 1b, c)

Dox 抵抗性肉腫において ASS1 発現が低下していたため、アルギニン細胞代謝を利用した Arg 枯渇環境下での抗腫瘍効果を検討した。Arg 枯渇培地を作成し、Arg 含有の通常培地との細胞増殖を比較したところ、ASS1 低発現である DOX 抵抗性肉腫細胞株においては、Arg 枯渇環境下での細胞増殖が、優位に抑制された。(Fig.2a) 一方で、ASS1 高発現である MCF-7, KHOS では、Arg 含有、Arg 枯渇培地の両者でも細胞増殖に優位な差はみられなかった。次にフローサイトメトリーを用いた細胞

胞周期解析を行ったところ、ASS1 低発現である DOX 抵抗性肉腫細胞株においては、Arg 枯渇培地では G1 期停止が誘導された。一方で、ASS1 高発現である MCF-7、KHOS では、Arg 含有及び Arg 枯渇培地の両方で優位な差はみられなかった。(Fig. 2b) この結果により G1 arrest による細胞増殖抑制が起こっている事が確認された。

次に、アミノ酸飢餓状態に誘導される事が知られているオートファジーについて検討した。Arg 枯渇培地において、ASS1 低発現である DOX 抵抗性肉腫細胞株のオートファジー解析を行ったところ、オートファジー関連タンパクである p62 の時間依存性の消費及び LC3 から II への変換がみられたため、オートファジーが誘導されている事が確認された。(Fig. 3)

また、アルギニン枯渇培地において、オートファジー阻害剤であるクロロキンの有用性について検討した。Dox 抵抗性肉腫細胞株において、アルギニン枯渇培地にクロロキンを投与すると、アルギニン枯渇単独療法よりも優位に細胞増殖抑制をみとめた。(Fig. 4) このことにより Arg 枯渇療法との併用療法との可能性が示唆された。

最後に ASS1 と薬剤抵抗性の関連を検討した。siRNA を用いて ASS1 発現を抑制し、P-gp の発現解析を行ったところ、P-gp 発現が上昇した。(Fig. 5) この結果により、ASS1 発現と P-gp 関連薬剤耐性との関連が示唆された。

本研究では、臨床的に Dox 耐性肉腫と言われている類上皮肉腫、包巣状軟部肉腫及び Dox 耐性骨肉腫において、IC50、P-gp 発現の結果により *in vitro* でも化学療法抵抗性である事を初めて証明した。また、Dox 耐性肉腫において ASS1 の発現低下を認め、Dox 抵抗性肉腫においても Arg 枯渇療法が新規治療法になりうることを明らかにした。それに加え、肉腫領域において初めて、アルギニン枯渇によりオートファジーが誘導される事を証明し、誘導されるオートファジーを阻害する事で、アルギニン枯渇療法に併用できる新規治療法の可能性を見出した。また、新規に ASS1 が Dox 耐性に関連する可能性を示唆した事は、今後のアルギニン代謝を標的とした治療に対して非常に有意義であると考えられた。

Figure 1.

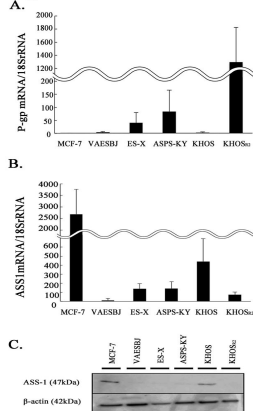


Figure 2.

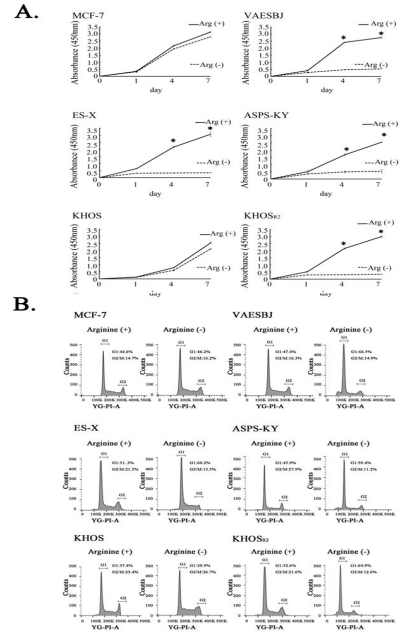


Figure 3.

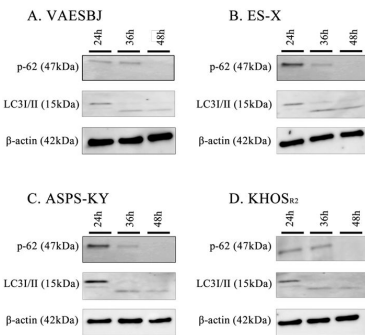


Figure 4.

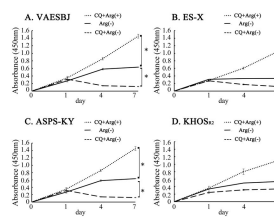
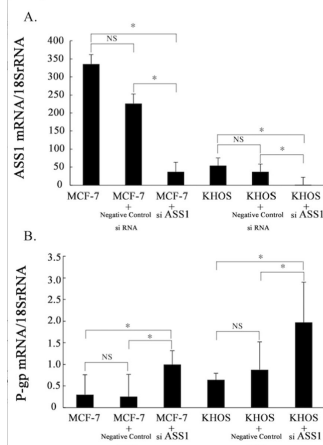


Figure 5.



参考文献

1. Christopherson WM, Foote FW, Jr. and Stewart FW. Alveolar soft-part sarcomas; structurally characteristic tumors of uncertain histogenesis. *Cancer*. 1952; 5(1):100-111.
2. Reichardt P, Lindner T, Pink D, Thuss-Patience PC, Kretzschmar A and Dorken B. Chemotherapy in alveolar soft part sarcomas. What do we know? *European journal of cancer (Oxford, England : 1990)*. 2003; 39(11):1511-1516.
3. Kummar S, Allen D, Monks A, Polley EC, Hose CD, Ivy SP, Turkbey IB, Lawrence S, Kinders RJ, Choyke P, Simon R, Steinberg SM, Doroshow JH and Helman L. Cediranib for metastatic alveolar soft part sarcoma. *Journal of clinical oncology : official journal of the American Society of Clinical Oncology*. 2013; 31(18):2296-2302.
4. Enzinger FM. Epithelioid sarcoma. A sarcoma simulating a granuloma or a carcinoma. *Cancer*. 1970; 26(5):1029-1041.
5. Asano N, Yoshida A, Ogura K, Kobayashi E, Susa M, Morioka H, Iwata S, Ishii T, Hiruma T, Chuman H and Kawai A. Prognostic Value of Relevant Clinicopathologic Variables in Epithelioid Sarcoma: A Multi-Institutional Retrospective Study of 44 Patients. *Annals of surgical oncology*. 2015; 22(8):2624-2632.
6. Wu G and Morris SM, Jr. Arginine metabolism: nitric oxide and beyond. *The Biochemical journal*. 1998; 336 (Pt 1):1-17.
7. Oettgen HF, Old LJ, Boyse EA, Campbell HA, Philips FS, Clarkson BD, Tallal L, Leeper RD, Schwartz MK and Kim JH. Inhibition of leukemias in man by L-asparaginase. *Cancer research*. 1967; 27(12):2619-2631.
8. Kobayashi E, Masuda M, Nakayama R, Ichikawa H, Satow R, Shitashige M, Honda K, Yamaguchi U, Shoji A, Tochigi N, Morioka H, Toyama Y, Hirohashi S, Kawai A and Yamada T. Reduced argininosuccinate synthetase is a predictive biomarker for the development of pulmonary metastasis in patients with osteosarcoma. *Molecular cancer therapeutics*. 2010; 9(3):535-544.
9. Wu L, Li L, Meng S, Qi R, Mao Z and Lin M. Expression of argininosuccinate synthetase in patients with hepatocellular carcinoma. *Journal of gastroenterology and hepatology*. 2013; 28(2):365-368.
10. Targeting argininosuccinate synthetase negative melanomas using combination of arginine degrading enzyme and cisplatin. *Oncotarget*. 2015.
11. Huang HY, Wu WR, Wang YH, Wang JW, Fang FM, Tsai JW, Li SH, Hung HC, Yu SC, Lan J, Shiu YL, Hsing CH, Chen LT and Li CF. ASS1 as a novel tumor suppressor gene in myxofibrosarcomas: aberrant loss via epigenetic DNA methylation confers aggressive phenotypes, negative prognostic impact, and therapeutic relevance. *Clinical cancer research : an official journal of the American Association for Cancer Research*. 2013; 19(11):2861-2872.
12. Liu J, Ma J, Wu Z, Li W, Zhang D, Han L, Wang F, Reindl KM, Wu E and Ma Q. Arginine deiminase augments the chemosensitivity of argininosuccinate synthetase-deficient pancreatic cancer cells to gemcitabine via inhibition of NF-kappaB signaling. *BMC Cancer*. 2014; 14:686.

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2件)

1. Involvement of reduced ASS1 expression and drug resistance in Dox-resistant sarcomas (in submission)

Yongji Kim, Eisuke Kobayashi, Daisuke Kubota, Kenta Mukaiyama, Keisuke Akaike, Yoshiyuki Suehara, Ayumu Itou, Kazuo Kaneko, Hirokazu Chuman, Akira Kawai, Shigehisa Kitano

2. メタボリックエラー

小林 英介

整形外科 67 巻 p28 2016 年

〔学会発表〕(計5件)

1. 10th AACR-JCA Joint Conference on Breakthroughs in Cancer Research: From Biology to Therapeutics
(Maui, Hawaii, USA February 2016)

Yongji Kim, Eisuke Kobayashi, Daisuke Kubota, Yoshiyuki Suehara, Tatsuya Takagi, Kazuo Kaneko, Akira Kawai, Shigehisa Kitano

The Development of Novel Therapy Targeting Metabolic Pathway Dysregulation in Doxorubicin-resistant Bone and Soft Tissue Sarcomas

2. Orthopaedic Research Society 2016
(Orlando, Florida, USA March 2016)

Eisuke Kobayashi, Yongji Kim, Daisuke Kubota, Yoshiyuki Suehara, Tatsuya Takagi, Kazuo Kaneko, Akira Kawai, Shigehisa Kitano

The Development of Novel Therapy Targeting Metabolic Pathway Dysregulation in Doxorubicin-resistant Bone and Soft Tissue Sarcomas

3. 第49回 日本整形外科学会骨軟部腫瘍学会
(2016年7月 高松市)

メタボリックエラーを利用したドキソルビシン耐性肉腫に対する新規治療開発.

金栄智, 小林英介, 窪田大介, 末原義之, 高木辰哉, 金子和夫, 川井章, 中馬広一, 北野滋久

4. 第30回 日本整形外科学会基礎学術集会
(2016年11月 富山市)

メタボリックエラーを利用したドキソルビシン耐性肉腫に対する新規治療開発.

金栄智, 小林英介, 窪田大介, 末原義之, 高木辰哉, 金子和夫, 川井章, 中馬広一, 北野滋久

〔図書〕(計0件)

〔産業財産権〕

出願状況(計0件)

取得状況(計0件)

〔その他〕
ホームページ等: なし

6. 研究組織
(1)研究代表者

小林 英介(KOBAYASHI EISUKE)
国立がん研究センター中央病院・骨軟部腫瘍科・医員

研究者番号: 40365292

(2)研究分担者
なし

研究者番号:
なし