

令和 3 年 5 月 5 日現在

機関番号：13601

研究種目：若手研究

研究期間：2018～2020

課題番号：18K16651

研究課題名（和文）Wnt経路を標的とした悪性骨腫瘍の病態解析とスクレロスチンによる治療の臨床応用

研究課題名（英文）ANTITUMOR EFFECT OF SCLEROSTIN AGAINST MALIGNANT BONE TUMOR

研究代表者

岡本 正則（Okamoto, Masanori）

信州大学・医学部附属病院・助教（特定雇用）

研究者番号：50596781

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）： 原発性悪性骨腫瘍の中で最も頻度の高い骨肉腫に対して、骨形成阻害因子であるスクレロスチンがその増殖能と遊走能を抑制した。さらに動物実験において腫瘍体積の増大を抑制し、生存期間を延長させる効果を持つことが明らかになった。30年以上同じ抗がん剤が標準治療として用いられている骨肉腫に対して、新たな治療の選択肢を提示できる可能性が示唆された。スクレロスチンは殺細胞性の薬剤ではないため、ドキソルビシンのような既存の抗がん剤との併用効果の解析が今後の課題である。

研究成果の学術的意義や社会的意義

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。腫瘍の多様性、不均一性が高く、原因遺伝子変異は特定されていない。また骨肉腫に対して有効な治療薬は30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。

骨形成は全ての骨肉腫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。本研究の成果により、スクレロスチンが骨肉腫に対して抗腫瘍効果を持つことが明らかになった。

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。

研究成果の概要（英文）： Sclerostin suppressed the proliferative capacity and migratory ability of osteosarcoma cells. The osteosarcoma model mice showed inhibited tumor growth and prolonged survival periods. Because sclerostin is not a cytotoxic agent, the effect of its combined use with existing anticancer drugs such as doxorubicin should be investigated for future clinical applications.

研究分野： 整形外科学

キーワード： 骨肉腫 悪性骨腫瘍 抗がん剤 Wnt経路 スクレロスチン

## 1. 研究開始当初の背景

悪性腫瘍のうち、非上皮性悪性腫瘍の肉腫(sarcoma)は上皮性悪性腫瘍の癌(cancer)と比較し頻度が少なく、その種類の多さもあり病態・病因解析が進んでいるとは言えない。そのため有効な治療法の確立していない腫瘍も多い。肉腫はさらに、骨などの硬組織発生の悪性骨腫瘍と、軟部組織発生の悪性軟部腫瘍とに分けられる。悪性骨腫瘍に対する治療は、手術と化学療法や放射線治療を組み合わせで行われている。悪性骨腫瘍の中で最も頻度の高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発され、5年生存率は約10%から70%以上にまで改善した。しかし初診時に肺転移を有し手術適応のない症例(5年生存率約50%)や、治療後の早期再発例(3年生存率約0%)など、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。悪性骨腫瘍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。

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することで、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増殖・分化を促進する。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。

古典的Wnt経路に対する阻害因子のひとつ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、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(van Bezooijen RL, J Exp Med. 2004. Moester M, Calcif Tissue Int. 2010. Megan M, Curr Osteoporos Rep. 2014)。これに対する抗体であ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(McClung MR, N Engl J Med. 2014)。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(Kansara M, J Clin Invest 2009)、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。また実際の悪性骨腫瘍症例におけるスクレロスチンの発現についての報告もない。

## 2. 研究の目的

悪性骨腫瘍細胞株を用いて、スクレロスチンの抗腫瘍効果をin vitroで解明する。

悪性骨腫瘍モデルマウスを用いて、スクレロスチンの抗腫瘍効果をin vivoで解明する。

悪性骨腫瘍におけるWnt経路の作用を解析し、スクレロスチンの作用機序を解明する。

上記により、悪性骨腫瘍に対する新規治療薬としてスクレロスチンの臨床応用を目指す。

## 3. 研究の方法

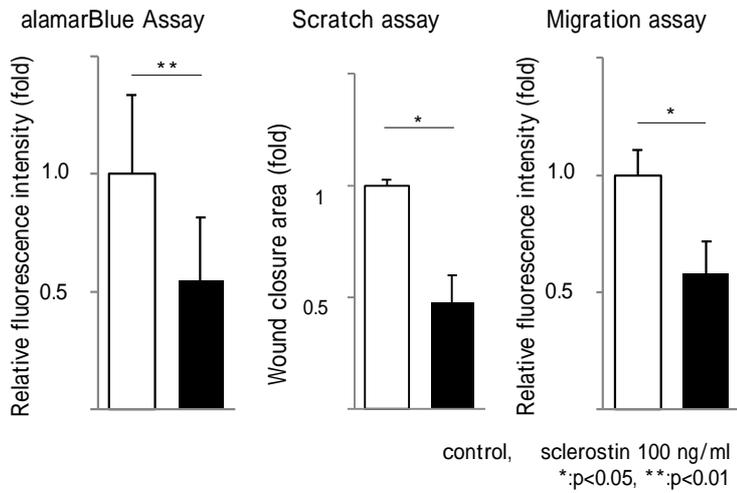
マウスおよびヒト骨肉腫細胞株(LM8、143B)を用いて、骨肉腫に対するスクレロスチンの抗腫瘍効果の検証と、その作用機序の解明を行った。

リアルタイムPCRやウエスタンブロッティングを用いて、骨肉腫におけるWnt経路やスクレロスチンの活性を解析した。In vitroでの腫瘍細胞の増殖能はalarBlue assayやScratch assayにて、遊走能はMigration assayにて解析した。In vivoでのスクレロスチンの効果を $\mu$ CTや免疫染色、リアルタイムPCR、ウエスタンブロッティングなどで解析し、生存曲線はカプランマイヤー法にて作成した。

## 4. 研究成果

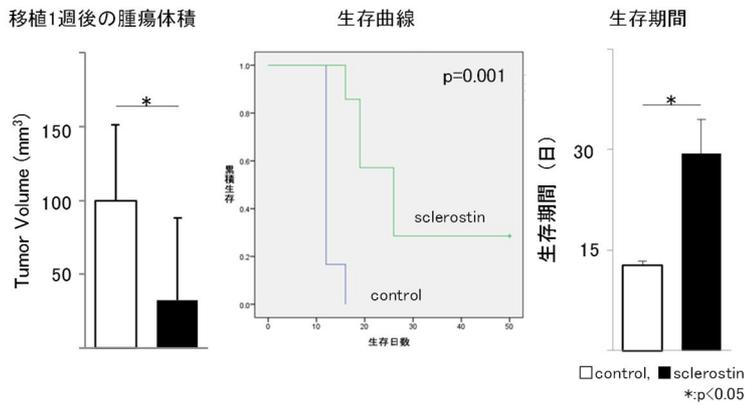
古典的Wnt経路阻害因子のスクレロスチンは、骨肉腫細胞株においてもカテニンの発現( Wnt古典経路)を抑制した。またスクレロスチンは骨肉腫細胞株の増殖能と遊走能を抑制する効果を持つことが明らかになった。

## スクレロスチンは骨肉腫細胞株の増殖能と遊走能を抑制する



マウス背部皮下に骨肉腫細胞株を移植したモデルマウスを用いた動物実験により、スクレロスチンは骨肉腫腫瘍体積の増大を抑制し、モデルマウスの生存期間を延長することが明らかになった。

## スクレロスチンは骨肉腫モデルマウスの腫瘍体積の増大を抑制し、生存期間を延長する



本研究により骨形成を阻害す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た。骨肉腫に対する有望な治療標的となることが示唆され、臨床応用に向けてさらなる検討を行う予定である。さらに骨肉腫以外の他の悪性骨腫瘍に対する作用も引き続き検討していく。

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 Okamoto Masanori, Matsuoka Masatake, Soma Tamotsu, Arai Ryuta, Kato Hidenori, Harabayashi Toru, Adachi Hirohumi, Shinohara Toshiki, Sagawa Tamotsu, Nishiyama Noriaki, Nambu Toshikazu, Sakai Wataru, Suzuki Hiroaki, Kato Hiroyuki, Hiraga Hiroaki	4. 巻 9
2. 論文標題 Metastases of soft tissue sarcoma to the liver: A Historical Cohort Study from a Hospital based Cancer Registry	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Cancer Medicine	6. 最初と最後の頁 6159 ~ 6165
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1002/cam4.3304	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6件（うち招待講演 1件/うち国際学会 4件）

1. 発表者名 Masanori Okamoto, Kazushige Yoshida, Jun Sasaki, Kaoru Aoki, Munehisa Kito, Yasuo Yoshimura, Shuichiro Suzuki, Atsushi Tanaka, Akira Takazawa, Hisao Haniu, Takashi Takizawa, Atsushi Sobajima, Takayuki Kamanaka, Naoto Saito, Hiroyuki Kato
2. 発表標題 THERAPEUTIC EFFECT OF SCLEROSTIN ON OSTEOSARCOMA
3. 学会等名 RCOST 2019(The 41st Annual Meeting of the Royal College of Orthopaedic Surgeons of Thailand) (招待講演) (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 岡本正則
2. 発表標題 骨肉腫に対する古典的Wntシグナル阻害因子スクレロスタチンの抗腫瘍効果
3. 学会等名 第51回日本整形外科学会骨・軟部腫瘍学術集会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 Masanori Okamoto
2. 発表標題 Antitumor effect of sclerostin against osteosarcoma
3. 学会等名 EMSOS 2018 (31st Annual Meeting of The European Musculo-Skeletal Oncology Society) (国際学会)
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 Masanori Okamoto
2. 発表標題 Antitumor effect of sclerostin against osteosarcoma
3. 学会等名 APMSTS 2018 (12th Asia Pacific Musculo Skeletal Tumor Society meeting) (国際学会)
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 Masanori Okamoto
2. 発表標題 THERAPEUTIC EFFECT OF SCLEROSTIN ON OSTEOSARCOMA
3. 学会等名 CTOS 2018 (2018 Connective Tissue Oncology Society Annual Meeting) (国際学会)
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 岡本正則
2. 発表標題 古典的Wntシグナル阻害因子スクレロスチンによる骨肉腫治療
3. 学会等名 第33回日本整形外科学会基礎学術集会
4. 発表年 2018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
研究協力者	吉田 和薫  (Yoshida Kazushige)		

6. 研究組織（つづき）

	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
研究協力者	佐々木 純  (Sasaki Jun)		
研究協力者	出田 宏和  (Ideta Hirokazu)		

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