

研 究 報 告 書
平成30年度：A課題

2020年 4月 29 日

公益財団法人 がん研究振興財団

理事長 堀 田 知 光 殿

研究施設 千葉県がんセンター研究所

住 所 千葉県千葉市中央区仁戸名町 666-2

研究者氏名 木下英幸



(研究課題)

骨肉腫の肺転移における Apoptosis signal-regulating kinase 1 (ASK1) の分子機序
解明と新規治療薬の探索

平成31年 3月 1日付助成金交付のあった標記A課題について研究が終了致しました
のでご報告いたします。

はじめに：

AYA 世代のがんである骨肉腫の診断・治療は飛躍的に進み、初診時肺転移のない症例の5年生存率は60-70%と比較的良好である一方、肺転移症例では15-35%と依然として予後不良である。治療は手術と共に化学療法となるが、現在用いられている薬剤は従来の殺細胞剤であり、副作用が強く、骨肉腫に有効な分子標的薬は存在しないという問題点があり、骨肉腫の腫瘍進展と肺転移を抑制する副作用の少ない新規分子標的薬の早期開発が望まれる。一方、mitogen-activated protein kinase (MAPK) 経路のkey moleculeであるApoptosis signal-regulating kinase 1 (ASK1)は様々ながんにおいてoncogeneとして報告されている。さらに当共同研究グループはASK1が悪性黒色腫の肺転移を制御することを報告した。本研究の目的は、骨肉腫の腫瘍進展および肺転移におけるASK1の関与およびASK1阻害剤の効果・副作用の検討を行うことにより、骨肉腫の分子メカニズムを解明し、新規分子標的薬開発につなげ、がん患者のQOLを改善させることである。

方法：

in vitro においてマウス高肺転移骨肉腫細胞株(LM8)とその親株におけるASK1の発現および活性化と下流のMAPK (p38, JNK)の活性化をウェスタンブロッティングにて評価した。さらにLM8にASK1 knockdown (KD)およびASK1阻害剤を投与することによるMAPK活性化への効果をウェスタンブロッティングにて評価した。また同様の系で増殖能についてMTT assayにて評価した。さらにASK1の恒常的抑制タンパク質であるチオレドキシシン(Trx)のKDおよび阻害剤(PX-12)についても上記と同様の実験にて評価した。*in vivo* においてはLM8をC3H/Heマウスの皮下に移植・尾静注を行い、増殖能および肺転移能を評価した。さらに、骨肉腫患者からの手術検体に対し、リン酸化ショットガン解析を行った。

結果：

LM8では親株と比較し、ASK1の活性化および下流のMPAKの活性化が亢進していた。ASK1 KDおよびASK1阻害剤投与にてMAPKの活性化が減弱していた。LM8の増殖能に関してはASK1 KDおよびASK1阻害剤投与にて増殖が促進された。Trx KDおよびTrx阻害剤(PX-12)投与にてASK1およびMAPKの活性化が亢進していた。増殖能に関しては、Trx KDおよびPX-12投与にてLM8の増殖を抑制していた。さらにLM8を皮下移植および尾静注により局所の腫瘍増悪および肺転移による結節を確認した。

考察：

ASK1はMAPK pathwayのMAPKKKであり、生存シグナルよりも主にアポトーシスを制御している。ASK1はがんにおけるoncogeneとしても注目されているが、種々のがん腫において腫瘍増悪もしくは腫瘍抑制の両者の報告がある。本研究ではASK1 KDおよびASK1阻害剤投与により増殖促進が認められたために、ASK1の恒常的抑制タン

パク質である Trx に着目して検討を進めた. Trx の検討では KD および阻害剤により腫瘍進展が抑制されており, Trx-ASK1 というレドックス制御が骨肉腫の腫瘍進展および肺転移においても重要な役割を担っていることが示唆された. *in vivo* における皮下移植および尾静注による予備実験にて局所増悪および肺転移が確認できたので, 今後これらに対し Trx 阻害剤 (PX-12) の効果を確認するとともに, Human cell line およびヒト検体や Patient-derived xenografts でも検討を進めていく予定である. また現在, 上記のように骨肉腫患者からの手術検体に対し, リン酸化ショットガンの解析を進めており, ヒト骨肉腫患者におけるリン酸化タンパク質の網羅的な解析を行っている. 現在注目しているタンパク質の関与および, 新規標的タンパク質となりうる他のリン酸化タンパク質を同定し, 今後 pathway 解析などを行う.