(19)国家知识产权局

(12)发明专利申请

(10)申请公布号 CN 118055777 A
(43)申请公布日 2024.05.17

(21)申请号 202280045125.9
(22)申请日 2022.06.24
(30)优先权数据
2021-106120 2021.06.25 JP
(85)PCT国际申请进入国家阶段日
2023.12.25
(86)PCT国际申请的申请数据
PCT/JP2022/025309 2022.06.24
(87)PCT国际申请的公布数据
WO2022/270621 JA 2022.12.29
(71)申请人 公益财团法人癌研究会
地址 日本东京都
(72)发明人 高木聪 片山量平
(74)专利代理机构 北京尚诚知识产权代理有限公司 11322
专利代理师 龙淳 张岑尧
(51)Int.Cl.
A61K 45/00(2006.01)
G01N 33/53(2006.01)
C12Q 1/68(2018.01)
C12Q 1/02(2006.01)
A61P 35/00(2006.01)
A61K 31/7088(2006.01)
A61K 31/4439(2006.01)
A61K 31/42(2006.01)
A61K 31/40(2006.01)
A61K 31/195(2006.01)
A61K 31/192(2006.01)

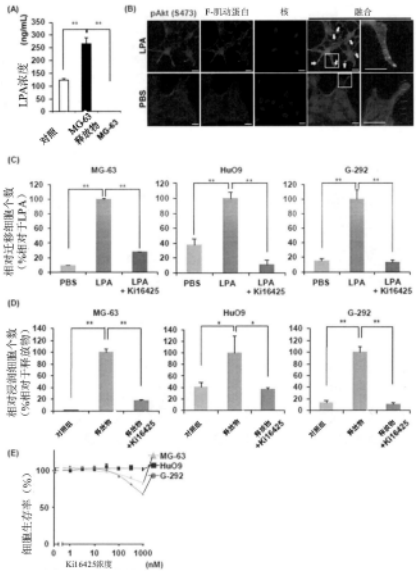
权利要求书1页 说明书9页 附图11页

(54)发明名称

抑制骨肉瘤和神经胶质瘤的转移和增殖的新型治疗药物

(57)摘要

已知溶血磷脂酸(Lysophosphatidic acid,LPA)在骨肉瘤中作为使浸润能力亢进的介体。并且发现,作为LPA的受体的LPAR1在骨肉瘤和神经胶质瘤中存在高表达,LPA-LPAR1相互作用参与了骨肉瘤和神经胶质瘤的转移和增殖。基于这些见解进行了探讨,结果发现,LPAR1拮抗剂可以制成抑制骨肉瘤和神经胶质瘤的转移和增殖的治疗药物。



CN 118055777 A

1.一种用于治疗骨肉瘤或神经胶质瘤的药物组合物,其特征在于,

其以抑制LPAR1表达的化合物为有效成分。

2.如权利要求1所述的用于治疗骨肉瘤或神经胶质瘤的药物组合物,其特征在于,

所述抑制LPAR1表达的化合物为LPAR1拮抗剂或核酸。

3.如权利要求2所述的用于治疗骨肉瘤或神经胶质瘤的药物组合物,其特征在于,

所述LPAR1拮抗剂为低分子化合物。

4.如权利要求3所述的用于治疗骨肉瘤或神经胶质瘤的药物组合物,其特征在于,

所述LPAR1拮抗剂为ONO-7300243、BMS-986020、Ki16425、ONO-3080573、ONO-9780307、ONO-9910539、Ki16198、AM095、AM966、SAR100842、BMS-986278及它们的类似物。

5.一种预后诊断辅助方法,其特征在于,

辅助骨肉瘤患者的预后诊断,

分析从患者得到的疾病组织的LPAR1表达,

在LPAR1表达高的情况下,则判断为转移的风险高。

6.一种药物的选择方法,其特征在于,

分析疾病组织的LPAR1表达,

在检测到LPAR1表达的情况下,则判定为LPAR1拮抗剂的给药对象。

7.一种用于治疗骨肉瘤或神经胶质瘤的药物组合物的筛选方法,其特征在于,包括:

使候选物质与确认到LPAR1表达的细胞接触的工序;以及

测定LPAR1表达的变化的工序。

抑制骨肉瘤和神经胶质瘤的转移和增殖的新型治疗药物

技术领域

[0001] 本发明涉及抑制骨肉瘤和神经胶质瘤的转移和增殖的新型治疗药物。特别是,涉及靶向LPAR1的骨肉瘤和神经胶质瘤的治疗药物。

背景技术

[0002] 骨肉瘤是产生于骨上的恶性肿瘤,在组织学和遗传方面均属于异质性的肿瘤。骨肉瘤虽然是直接产生于骨上的恶性肿瘤中发病频率最高的肿瘤,但在100万人中也仅有1~3人罹患,可以说是一种罕见的癌症。但是,最常见的发病年龄是儿童和AYA一代,由于手术前后给药大量化疗药物,可能会影响生长和生育能力,这是AYA一代特有的问题,并可能引发成年后的新的癌症。一般认为,骨肉瘤首先由于TP53和RB1基因的突变而导致染色体不稳定,然后由于其他致癌突变的产生而发展为伴有转移的多克隆肿瘤(非专利文献1、2)。因此,是一种具有高度异质性的肿瘤,导致治疗难度大。

[0003] 骨肉瘤不仅是一种罕见的癌症,而且如上所述是一种高度异质性的肿瘤,并且转移性骨肉瘤的存活率在过去的40年里没有提高。肺部转移最为常见,10%~20%的患者在初诊时已出现肺部结节,80%以上的患者在复发时出现肺部转移(非专利文献3、4)。

[0004] 虽然随着20世纪70年代化疗药物的引入以及外科手术联合治疗,骨肉瘤患者的存活率有所提高,但伴随骨肉瘤转移的患者的存活率较低,对于伴有肺转移的骨肉瘤患者尚无有效的治疗方法,一般认为仅有19~37%(非专利文献3、5~8)。因此,在骨肉瘤治疗中抑制转移是改善预后的重要课题。

[0005] 另外,作为化学疗法的一次治疗,已经引入了利用高剂量甲氨蝶呤、阿霉素、顺铂和异环磷酰胺的治疗,但对于最佳的联合疗法和针对转移性或复发性骨肉瘤的治疗方法尚未达成共识。如果能够获得靶向在骨肉瘤中特异性表达的分子的治疗药物,将有可能提供新的治疗药物和治疗方法。明确参与骨肉瘤增殖和转移的分子对于建立最佳治疗方法也具有重要意义。

[0006] 另一方面,神经胶质瘤是一种由神经胶质细胞产生的恶性脑肿瘤,恶性程度最高的神经胶质瘤称为胶质母细胞瘤。除了头痛外,根据肿瘤发生或生长的部位,还可能出现四肢麻痹、视野或视力障碍等各种症状。神经胶质瘤被认为是预后较差的肿瘤之一,因为如果肿瘤细胞侵入正常脑组织,很难通过手术将其完全切除。另外,尽管有报道称神经胶质瘤中恶性程度最高的胶质母细胞瘤在IDH、p53具有基因突变等构成原因的基因突变,但尚未报道与治疗相关的分子靶点。

[0007] 神经胶质瘤的治疗方法需要是在保留运动和语言功能的同时尽可能多地切除肿瘤的手术治疗。然而,如上所述,很难切除所有肿瘤,因此需要进行放射治疗和化学治疗以防止复发。虽然还有与放射治疗联合使用替莫唑胺或贝伐珠单抗进行治疗,但许多病例仍会出现复发。因此,需要开发更有效的治疗药物,特别是分子靶向药。

[0008] 现有技术文献

[0009] 非专利文献

[0010] 非专利文献1:Bousquet M,et al.,2016,Ann.Oncol.Vol.27,pp.738-744.
[0011] 非专利文献2:Ribi S,et al.,2015,Oncotarget,Vol.6,pp.7727-7740.
[0012] 非专利文献3:Kager L,et al.,2003,J.Clin.Oncol.Vol.21,pp.2011-2018.
[0013] 非专利文献4:Meyers PA,et al.,1993,J.Clin.Oncol.Vol.11,pp.449-453.
[0014] 非专利文献5:Aljubran AH et al.,2009,Ann.Oncol.Vol.20,pp.1136-1141.
[0015] 非专利文献6:Gok Durnali A,et al.,2016,PLoS One 2016;11:e0152621.
[0016] 非专利文献7:Salah S,et al.,2014,Mol.Clin.Oncol.Vol.2,pp.811-816.
[0017] 非专利文献8:Briccoli A,2010,Surg.Oncol.Vol.19,pp.193-199.
[0018] 非专利文献9:O'Donnell VB et al.,2014,Circ.Res.Vol.114,pp.1185-1203.
[0019] 非专利文献10:Chatterjee M.,2020,J.Thromb.Haemost.Vol.18,pp.543-557.

发明内容

[0020] 发明所要解决的问题

[0021] 本发明的问题在于,提供一种对于骨肉瘤和神经胶质瘤有效的治疗药物和治疗方法。特别是,提供一种抑制转移和肿瘤增殖的治疗药物。骨肉瘤肺转移的几率较高,对于肺转移后的骨肉瘤患者,没有有效的治疗方法,患者大部分因肺转移导致的呼吸衰竭死亡,因此如果能够抑制以肺转移为代表的转移,则有望改善预后。另外,神经胶质瘤难以通过手术治疗完全切除,因此希望开发抑制肿瘤增殖的治疗药物。由于骨肉瘤和神经胶质瘤尚未开发有效的分子靶向药,因此如果能够发现在这些肿瘤中特异性表达的分子,并抑制其功能,则可以开发出新的治疗药物。

[0022] 本发明人等发现骨肉瘤中LPAR1表达高,从而完成了本发明,下面将详细示出。并且,神经胶质瘤中LPAR1表达也很高,因此分析了LPAR1拮抗剂的效果。可以提供一种对于迄今为止尚没有有效治疗药物的骨肉瘤和神经胶质瘤有效的治疗药物。

[0023] 用于解决问题的技术方案

[0024] 本发明涉及以下的药物组合物、预后诊断辅助方法和药物选择方法。

[0025] (1)一种用于治疗骨肉瘤或神经胶质瘤的药物组合物,其以抑制LPAR1表达的化合物为有效成分。

[0026] (2)根据(1)所述的用于治疗骨肉瘤或神经胶质瘤的药物组合物,其特征在于,抑制所述LPAR1表达的化合物为LPAR1拮抗剂或核酸。

[0027] (3)根据(2)所述的用于治疗骨肉瘤或神经胶质瘤的药物组合物,其特征在于,所述LPAR1拮抗剂为低分子化合物。

[0028] (4)根据(3)所述的用于治疗骨肉瘤或神经胶质瘤的药物组合物,其特征在于,所述LPAR1拮抗剂为ONO-7300243、BMS-986020、Ki16425、ONO-3080573、ONO-9780307、ONO-9910539、Ki16198、AM095、AM966、SAR100842、BMS-986278及它们的类似物。

[0029] (5)一种预后诊断辅助方法,辅助骨肉瘤患者的预后诊断,分析从患者得到的疾病组织的LPAR1表达,在LPAR1表达高的情况下,则认为转移的风险高。

[0030] (6)一种药物选择方法,分析疾病组织的LPAR1表达,在检测到LPAR1表达的情况下,则判定为LPAR1拮抗剂的给药对象。

[0031] (7)一种用于治疗骨肉瘤或神经胶质瘤的药物组合物的筛选方法,其特征在于,包

括如下工序:使候选物质与确认到LPAR1表达的细胞接触;及测定LPAR1表达的变化。

[0032] (8)一种骨肉瘤患者或神经胶质瘤患者的治疗方法,其特征在于,从骨肉瘤患者或神经胶质瘤患者中获得样本,分析LPAR1表达,在确认到LPAR1表达的情况下,判定为抑制LPAR1表达的化合物的给药对象,并给药能够抑制LPAR1表达的化合物。

附图说明

[0033] 图1是示出骨肉瘤细胞具有高血小板聚集能力,由血小板释放出的血小板释放物导致浸润能力增强的图。(A)是示出各种骨肉瘤细胞的血小板聚集能力的图。(B)、(C)是示出由血小板释放出的血小板释放物对于骨肉瘤细胞增强浸润能力的图。(B)是显示浸润后的细胞的显微镜照片,(C)是示出浸润后的细胞的数量的图。

[0034] 图2是示出LPAR1在骨肉瘤中表达增强的图。(A)是使用The Cancer Genome Atlas(TCGA)和TARGET的RNA序列数据对LPAR1的mRNA表达水平进行分析而得到的图。(B)是示出骨肉瘤细胞株中的LPAR1的mRNA表达的qPCR分析结果的图,(C)是示出蛋白质表达的蛋白质印迹分析结果的图。(D)是示出来自骨肉瘤患者的异种移植物中的LPAR1的蛋白质表达的图。

[0035] 图3是示出由活化血小板释放出的LPA对于骨肉瘤细胞的迁移能力和浸润能力至关重要的图。(A)是利用ELISA对通过向血小板悬浮液中添加MG-63骨肉瘤细胞来使血小板释放LPA进行分析而得到的图。(B)是对经LPA刺激的MG-63骨肉瘤细胞的磷酸化AKT、F-肌动蛋白的定位进行分析而得到的荧光显微镜照片。(C)是示出各种骨肉瘤细胞中的LPA对于细胞迁移能力的效果和通过LPAR拮抗剂Ki16425抵消LPA的效果的图,(D)是示出血小板释放物对于浸润能力的效果、以及通过Ki16425抵消血小板释放物的效果的图。(E)是对Ki16425对于骨肉瘤细胞的增殖的影响进行分析而得到的图。

[0036] 图4是示出LPA-LPAR1相互作用对于骨肉瘤细胞的浸润至关重要的图。(A)是示出使用MG-63骨肉瘤细胞建立LPAR1敲除细胞的图。(B)、(C)是示出LPAR1敲除细胞中LPA对于浸润能力的效果的图。(D)、(E)是示出LPAR1敲除细胞中血小板释放物对于浸润能力的效果的图。

[0037] 图5是示出LPAR1对于骨肉瘤的肺转移具有重要作用的图。(A)是示出导入有Akaluc荧光素酶(Akaluc luciferase)的MG-63骨肉瘤细胞(MG-63/Akaluc/sgCTRL)和LPAR1敲除MG-63骨肉瘤细胞(MG-63/Akaluc/sgLPAR#1)的发光的图,(B)是示出细胞增殖能力的图。(C)、(D)是示出由静脉注入MG-63/Akaluc/sgCTRL和MG-63/Akaluc/sgLPAR#1细胞,0天后(注入当天)和7天后给药AkaLumine,并进行体内(in vivo)成像分析后的结果的图。

[0038] 图6是示出通过LPAR1拮抗剂抑制骨肉瘤的肺转移的图。(A)是示出实验的流程的图。(B)、(C)是示出体内成像分析结果的图,体内成像分析结果显示,给药LPAR1拮抗剂ONO-7300243,并注入HuO9/Akaluc骨肉瘤细胞后,抑制了肺转移。

[0039] 图7是示出LPAR1参与骨肉瘤细胞的增殖的图。(A)是示出在敲除骨肉瘤细胞MG-63和G-292clone A141B1(G-292)细胞的LPAR1所获得的克隆株中抑制了细胞增殖的图。(B)是示出在骨肉瘤细胞MG-63和HuO9中通过siRNA敲低LPAR1后,诱导了细胞凋亡的图。

[0040] 图8是示出在骨肉瘤异种移植物模型中LPAR1拮抗剂给药发挥抗肿瘤效果的图。(A)示出LPAR1给药方案,(B)示出肿瘤体积的经时变化。

[0041] 图9是示出胶质母细胞瘤细胞的运动能力在LPA存在下更新的图。

[0042] 图10是示出LPAR1对细胞存活率的影响的图。(A)是示出LPAR1拮抗剂降低胶质母细胞瘤细胞的存活率的图。(B)是示出LPAR1敲低降低胶质母细胞瘤细胞的存活率的图。

[0043] 图11是示出在胶质母细胞瘤异种移植物模型中LPAR1拮抗剂给药发挥抗肿瘤效果的图。(A)是LPAR1拮抗剂给药方案,(B)示出相对肿瘤体积的经时变化。

具体实施方式

[0044] 本发明人等发现骨肉瘤细胞具有高血小板聚集能力,从激活后的血小板中释放出的血小板释放物使骨肉瘤细胞的浸润能力亢进。进一步分析后表明,从活化血小板中释放出的溶血磷脂酸(Lysophosphatidic acid,LPA)用作使骨肉瘤的浸润能力亢进的介体。另外还发现,作为LPA的受体的LPAR1在骨肉瘤细胞和来自患者的异种移植物中表达显著增强,因此推断LPA-LPAR1相互作用参与了骨肉瘤的远端转移。

[0045] 并且还发现,通过使用小鼠模型给药LPAR1拮抗剂(具体为ONO-7300243),可以抑制肺转移;以及可以使用BMS986020抑制肿瘤增殖。另外,敲除或者敲低LPAR1表达后的细胞增殖被抑,并诱导细胞凋亡,因此发现,通过抑制LPAR1表达,能够抑制骨肉瘤的增殖。另外,由于LPAR1在神经胶质瘤中也存在高表达,因此通过分析LPAR1拮抗剂的效果发现,其起到导抗肿瘤效果。

[0046] 如上所述,由于LPA-LPAR1相互作用参与了骨肉瘤和神经胶质瘤的转移和增殖,因此抑制转移和增殖的LPAR1拮抗剂可以使用任意物质。在此,使用了低分子化合物,作为这样的化合物,除此处使用的ONO-7300243、BMS-986020、Ki16425以外、还可以使用例如ONO-3080573、ONO-9780307、ONO-9910539、Ki16198、AM095、AM966、SAR100842、BMS-986278及它们的类似物等。另外,也可以使用与LPAR1结合以抑制其功能的抗体和多肽。并且,还可以通过siRNA、反义RNA、shRNA、miRNA等核酸来抑制LPAR1表达其自身。

[0047] 另外,不仅是现有的LPAR1拮抗剂,还可以筛选使用抑制LPAR1表达的化合物。抑制LPAR1表达的化合物只要向表达LPAR1的细胞(具体为骨肉瘤细胞、神经胶质瘤细胞)的培养液中添加候选物质,并以LPAR1表达的降低为指标筛选即可。

[0048] 并且,在骨肉瘤患者中,由于LPAR1表达与骨转移存在高度相关,通过测定肿瘤组织的LPAR1表达,能够判断远端转移的风险、即能够判断预后情况。具体而言,能够通过手术或活检得到的骨肉瘤组织,并对其LPAR1表达进行检测,在LPAR1表达高的情况下,判断远端转移的可能性高。在远端转移的可能性高的情况下,能够通过进行给药LPAR1拮抗剂等预防性措施来预防远端转移。另外,不仅是骨肉瘤和神经胶质瘤,在其他种类的癌症中LPAR1表达高的情况下,LPAR1抑制药物被认为也是有效的,因此,能够通过检测患者样本的LPAR1表达来判断患者是否应选择LPAR1抑制药物作为治疗药物。

[0049] 以下,示出数据进行说明。有报道指出了血小板与癌症的相互作用、从激活后的血小板中释放生物活性分子在上皮性肿瘤的血行转移中的重要性,但在肉瘤中尚不明确。因此,为了了解骨肉瘤细胞是否与血小板相互作用而活化,使用八种骨肉瘤细胞株进行了血小板聚集测定(图1(A))。人骨肉瘤细胞由ATCC或理研生物资源研究中心、JCRB细胞库获得,分别按照所推荐的方法培养。

[0050] 从至少采血10天前起未服用抗血小板药的健康者处获得血液,通过常规方法分离

血小板。分离后的血小板按照2×10^8/mL悬浮于改良Tyrode缓冲液(137mM NaCl,11.9mM $NaHCO_3$,0.4mM Na_2HPO_4,2.7mM KCl,1.1mM $MgCl_2$,5.6mM葡萄糖),添加1.2mM $CaCl_2$,用于血小板聚集测定。向200μL血小板悬浮液中加入细胞悬浮液(5×10^6细胞/mL的细胞悬浮液10μL)或PBS,在37℃下分析30～60分钟。血小板凝集使用血小板聚集仪(MCM HEMA Tracer 313M,SSR Engineering)测定(图1(A))。

[0051] 与用作阴性对照的肺腺癌细胞A549相比,所有骨肉瘤细胞均具有高血小板活化能力。需要说明的是,胶原蛋白(10μg/mL,添加10μL)为阳性对照。由该结果表明,用于分析的骨肉瘤细胞均具有高血小板聚集能力、即血小板活化能力。

[0052] 研究了从活化血小板中释放出的生物活性分子对骨肉瘤细胞的浸润能力产生影响的可能性。收集进行了血小板聚集测定后的反应液,添加0.5μM前列腺素I_2并离心分离,收集离心上清。将离心上清用作包含从活化血小板中释放出的生物活性分子的血小板释放物。

[0053] 分别按照1.5×10^5细胞/0.5mL向基质胶侵袭室(康宁公司)的小室(顶室)中接种骨肉瘤细胞MG-63、HuO9、G-292,向下室中放入血小板释放物,37℃下静置22～24小时后,完全擦掉小室的上表面的细胞,用4％多聚甲醛固定,将小室的膜的下表面的细胞、即浸润的细胞用1％结晶紫染色(图1(B))。计数浸润细胞数目,将相对细胞比例示于图1(C)。在全部骨肉瘤细胞中,当添加了血小板释放物时,浸润的细胞均显著增加。

[0054] 已知血小板释放物中不仅肽可以用作介体,脂质也可以用作介体。为了分析肽和脂质中哪种介体参与了骨肉瘤细胞的浸润能力,进行95℃、10分钟的热处理,在该条件下几乎所有蛋白质都会变性,在基质胶侵袭室中同样地分析浸润能力(图1(B)、(C))。其结果,热处理也未能使效果消失,因此认为介体是脂质。

[0055] 根据质谱分析报道,激活后的血小板会释放TxA2、S1P、LPA等脂质介体(非专利文献9、10)。在此,虽然未给出数据,但使用TCGA、TARGET数据库的RNA序列数据对各种肿瘤中这些脂质介体受体(TBA2R、S1PR1～5、LPAR1～6)的表达进行了研究。发现LPAR1、LPAR6、S1PR1、S1PR3的表达在骨肉瘤中为高表达。并且,在各种癌症种类中进行比较后确认,骨肉瘤(OS)和肉瘤(SARC)中LPAR1最为高表达(图2(A))。由于TCGA、TARGET的基因表达数据是肿瘤组织的数据,因此除肿瘤细胞以外,也包括间质细胞、上皮细胞、免疫细胞等的数据。因此,在此,虽然未给出数据,但也使用反映癌细胞株的基因表达的癌细胞系百科全书(CCLE,Cancer Cell Line Encyclopedia)数据库进行了研究。多种骨肉瘤细胞株中的LPAR1表达相比尤文肉瘤家族肿瘤、软骨瘤显示出更高的表达。

[0056] 并且,通过qPCR(图2(B))和蛋白质印迹法(图2(C))确认了八种骨肉瘤细胞中的MG-63、HuO9、HuO-3N1、G-292、NY、SJSA-1这6种中LPAR1高表达。另外,通过蛋白质印迹法表明,在从患者建立的来自骨肉瘤的异种移植物样品中,也有约80％(15/19)是LPAR1阳性(图2(D))。

[0057] 通过ELISA(人溶血磷脂酸ELISA试剂盒,Cusabio)分析了LPA是否会因与骨肉瘤细胞的相互作用而从血小板中释放。将血小板悬浮液200μL和5×10^4个MG-63细胞、或者MG-63细胞单独在37℃下静置30分钟。添加前列腺素I_2使其达到0.5μM,离心分离后,通过ELISA检测LPA。如图3(A)所示,在MG-63细胞单独时,上清中未检测到LPA,而在MG-63细胞和血小板混合的情况下,显示包含大量LPA。另外还显示,与未活化的血小板的离心上清(对照)相比,

也明显释放出了LPA。

[0058] 已知LPA受体是G蛋白偶联受体,LPAR1活化$G_{\alpha i/0}$、$G_{\alpha q/11}$、$G\alpha_{12/13}$这三种G蛋白质,并活化包括PI3K/AKT途径的信号转导系统。将MG-63细胞在无血清MEM培养基中培养过夜后,用100nM LPA处理4小时,通过常规方法,使用抗磷酸化AKT抗体(检测S473的磷酸化的抗体)、罗丹明标记鬼笔环肽(与F肌动蛋白结合),Hoechst 33342(染色细胞核)进行免疫染色,通过显微镜观察(图3(B))。在添加了LPA的细胞中,确认到活化后的AKT,如箭头所示,进一步确认到聚集在与F肌动蛋白相同的区域。在此,虽然未示出结果,但为了分析LPA对于骨肉瘤细胞的效果,通过显微镜进行了时间推移分析,结果观察到通过LPA处理使骨肉瘤细胞形成了大量突起(伪足)。另外,不仅是在MG-63细胞中,在HuO9中也观察到,磷酸化AKT和F-肌动蛋白共同聚集在细胞膜的突起部。

[0059] 接着,对LPA带来的迁移能力和其对浸润能力的影响进行了分析(图3(C))。迁移能力使用Transwell小室(康宁公司,8.0μm pore)分析。向小室中接种悬浮在无血清MEM培养基0.3mL中的1×10^5个MG-63、HuO9或G-292细胞,在室下层,向无血清MEM培养基1.25mL中加入10nM LPA作为化学引诱物质,静置4~6小时后固定,分析迁移能力(LPA)。另外,用作为LPAR拮抗剂的Ki16425(Santa Cruz Biotechnology)100nM预处理1小时后,收集细胞,接种于小室,在100nM Ki16425存在下分析迁移能力(LPA+Ki16425)。LPA使得所有细胞的迁移能力均显著增强,但在经Ki16425处理的细胞中,即使添加LPA,也显著抑制了细胞的迁移能力。

[0060] 另外,与图1(C)相同地,使用基质胶侵袭室,对浸润能力也进行分析(图3(D))。在将血小板释放物添加至室下层的情况下,所有的细胞均通过血小板释放物获得了浸润能力。另外,在预先通过Ki16425处理细胞的情况下,显著抑制了浸润能力。如图3(E)所示,添加Ki16425培养72小时后,在G-292、MG-63细胞中,在500nM以上的高浓度,确认到细胞的存活率降低。在迁移能力和浸润能力的测试中,是一种在100nM进行4~6小时(迁移能力)或者22~24小时(浸润能力)的较低浓度且短时间的处理,在该条件下未确认到细胞毒性。因此确认,Ki16425对于迁移能力和浸润能力的抑制并非基于对于细胞的细胞毒性。以上结果显示,血小板释放物中的生物活性分子是LPA,对于骨肉瘤细胞的迁移能力和浸润能力的增强是以LPA为介体。

[0061] Ki16425对于LPAR1、LPAR2和LPAR3均具有抑制效果,但抑制的程度不同。为了确认哪种LPAR对骨肉瘤的浸润能力起作用,使用CRISPR/CAS9系统,对于MG-63细胞建立LPAR1敲除细胞。将所建立的细胞称为sgLPAR1#1~3。在sgLPAR1#1~3中,均通过蛋白质印迹法确认到LPAR1表达消失(图4(A))。

[0062] 使用这些敲除细胞分析了浸润能力。将各细胞按照1×10^5个分别接种于小室,向基质胶侵袭室的室下层添加10nM LPA,22~24小时后固定,用结晶紫染色,计数细胞数目(图4(B)、(C))。与对照相比,所有敲除细胞的浸润能力显著降低。

[0063] 利用从活化血小板中释放出的血小板释放物进行相同的分析。将与10nM LPA同等的血小板释放物添加于室下层,培养22~24小时后进行固定、染色,以进行分析(图4(D)、(E))。所有的敲除细胞均未发现血小板释放物引起浸润能力增强。这些结果表明,骨肉瘤的肺转移是经由LPA-LPAR1相互作用而产生的。

[0064] 接着,使用小鼠模型,在体内分析LPAR1在骨肉瘤的肺转移中的功能。向MG-63/

sgCTRL和MG-63/sgLPAR#1细胞中导入Akaluc荧光素酶,得到Akaluc荧光素酶表达细胞即MG-63/Akaluc/sgCTRL和MG-63/Akaluc/sgLPAR#1细胞。将各细胞按照图5(A)所示的各种细胞数目接种,用50μM AkaLumine-HCL处理,通过Mithras LB940读板器(Berthold Technology)测定发光。确认得到的细胞根据细胞数目以同等的强度进行发光。另外,用CellTiter-Gro reagent(PROMEG)测定细胞增殖。所有细胞的增殖均未见有较大差异(图5(B))。

[0065] 向雌性SCID-beige小鼠(C.B-lgh-1b/GbmsTac-Prkdc^{scid}-Lyst^{bg}N7,日本Charles River株式会社)静脉注入1×10^{6}个MG-63/Akaluc/sgCTRL或MG-63/Akaluc/sgLPAR#1,在3小时后和7天后,向腹腔内注入100μL的5mM AkaLumine-HCL,进行体内发光成像(bioluminescent imaging,BLI)。BLI使用IVIS imaging system(PerkinElmer)进行。图5(C)中示出图像,(D)中示出通过IVIS测得的总流量(Total Flux)。静脉注入细胞当天(day 0),所有细胞均被同等程度地被肺捕捉。但是,7天后(day 7),MG-63/Akaluc/sgCTRL在肺部存活,而LPAR1敲除细胞MG-63/Akaluc/sgLPAR#1则未存活,在总流量中可见显著差异,这表示LPAR1对于肺转移起到重要作用。

[0066] 接着,研究了LPAR1拮抗剂的效果。使用作为LPAR1抑制剂之一的ONO-7300243(Cayman Chemical),通过小鼠模型进行分析。如图6(A)所示,口服给药ONO-7300243后,在30分钟～60分钟期间,静脉注入1×10^{6}个Huo9/Akaluc细胞,同样地进行BLI。将ONO-7300243的给药量改变为10mg/kg、30mg/kg来进行实验。

[0067] 在给药1.5～3小时后、1天后、2天后进行BLI(图6(B))。刚刚给药后观察到,所有给药量下,Huo9/Akaluc细胞均被肺捕捉。经过1天、2天后,与溶剂给药组相比,在ONO-7300243给药组中,确认被肺捕捉的骨肉瘤细胞减少。

[0068] 作为通过IVIS测得的总流量(图6(C)),在细胞注入当天,所有组均未见显著差异,但1天后,溶剂给药组和30mg/kg给药组中可见显著差异,2天后,10mg/kg给药组和30mg/kg给药组之间可见显著差异,并确认被肺捕捉的骨肉瘤细胞随着给药量而减少。

[0069] 如上所示,LPAR1敲除和利用LPAR1拮抗剂处理会抑制转移。接着,分析LPAR1表达对细胞增殖的效果。如图3(E)所示,在利用LPAR1拮抗剂的实验中,未发现对于细胞增殖具有较大效果。因而,使用更灵敏的系统,分析LPAR1表达是否会对细胞增殖产生影响。

[0070] 使用CRISPR/Cas9系统敲除骨肉瘤细胞MG-63和G-292的LPAR1后,获得各细胞的克隆株,并比较细胞增殖能力(图7(A))。使用任意细胞株时,在LPAR1敲除细胞株中,均确认到细胞增殖被抑制。

[0071] 发明人研究了细胞增殖被抑制是经由何种机制。使用靶向LPAR的siRNA(Dharmacon),在MG-63和Huo9细胞中敲低LPAR1。通过敲低LPAR1,确认到作为细胞凋亡标志物的切割型PARP(Cl-PARP)增加,因此认为敲低LPAR1会诱导细胞凋亡。因此认为,不仅是LPAR1拮抗剂,通过siRNA抑制LPAR1表达也会诱导骨肉瘤细胞的细胞凋亡,从而起到抗肿瘤效果。

[0072] 根据上述结果,通过利用拮抗剂抑制LPAR1,有望诱导细胞凋亡,进而抑制骨肉瘤的增殖。因此,研究了通过给药LPAR1拮抗剂是否会抑制小鼠皮下移植的骨肉瘤细胞增殖(图8)。

[0073] 将骨肉瘤细胞G-292向雌性SCID-beige小鼠的皮下进行8.2×10^{5}细胞移植

(Day0),按照从移植次日(Day1)起,连续五天给药LPAR1拮抗剂BMS-986020 30mg/kg,停药两天的施药方案口服给药(图8(A))。测量肿瘤的长径和短径,作为长径(mm)×[短径(mm)]^2×1/2算出肿瘤体积,从而分析肿瘤的增殖。

[0074] 虽然是从肿瘤移植后第14天起测定肿瘤体积,但在LPAR1拮抗剂给药组中,从第14天起则确认到显著的肿瘤增殖抑制效果(图8(B))。由于确认到LPAR1拮抗剂具有抗肿瘤效果,因此,其不仅抑制骨肉瘤的肺转移,还可能具有缓解效果。

[0075] 如图2(A)所示,继骨肉瘤和肉瘤后,胶质母细胞瘤(GBM)和神经胶质瘤(LGG)中LPAR1也高表达。因此,对于神经胶质瘤而言,也有望通过LPAR1拮抗剂来抑制转移和细胞增殖。如上所述,胶质母细胞瘤是神经胶质瘤中恶性度最高的肿瘤,因此,使用胶质母细胞瘤细胞株分析了添加LPA所引起的迁移能力。分析了胶质母细胞瘤细胞的运动能力是否在LPA存在下亢奋。分别将1×10^{5}个人胶质母细胞瘤细胞Onda7(由JCRB细胞库获得)、YKG-1(由JCRB细胞库获得)、42-MG-BA(由DSMZ获得)接种于Transwell小室,向室下层添加作为趋化因子的100nM LPA,24小时后,将移动至室下层的细胞用结晶紫染色定量。另外,在收集细胞前,用作为LPAR拮抗剂的100nM Ki16425预处理1小时,再于100nM Ki16425存在下分析迁移能力。虽然LPA使得全部细胞的迁移能力均显著增强,但在经Ki16425预处理的细胞中,即使添加LPA,也显著抑制了细胞的迁移能力(图9)。

[0076] 接着,研究了LPAR1拮抗剂会对胶质母细胞瘤细胞的存活率起效果。将1500至3000个人胶质母细胞瘤细胞Onda7、YKG-1、42-MG-BA接种于96孔板,改变LPAR1拮抗剂Ki16425、BMS-986020、ONO-7300243的浓度进行处理,通过CellTiter-Gro reagent测定72小时后的细胞存活率(图10(A))。确认了所有LPAR1拮抗剂使所有细胞的存活率降低。

[0077] 接着,通过胶质母细胞瘤细胞分析了LPAR1敲低所带来的存活率(图10(B))。接种Onda7、YKG-1细胞后,用靶向LPAR1的两种siRNA(Dharmacon)进行处理,通过CellTiter-Gro reagent测定4天后的细胞存活率。在通过siRNA抑制了LPAR1表达的情况下,在所有细胞中均确认到存活率显著降低。另外,还确认到作为细胞凋亡标志物的切割型PARP(Cl-PARP)增加,这表明LPAR1敲低诱导了细胞凋亡。根据这些结果,即使在胶质母细胞瘤中,通过降低LPAR1表达,也有望具有抑制转移、抑制细胞增殖的效果。即可以认为,能够将LPAR1拮抗剂作为分子靶向药用于治疗。

[0078] 对LPAR1拮抗剂在胶质母细胞瘤中是否也起到抗肿瘤效果进行了研究。将导入有Akaluc荧光素酶的Onda7细胞2×10^{5}个颅内植入至雌性SCID-beige小鼠。从移植3周后起,按照连续5天给药LPAR1拮抗剂BMS-986020 50mg/kg或100mg/kg,停药两天的施药方案口服给药(图11(A))。作为肿瘤体积,通过IVIS成像系统对在Onda7细胞中稳定表达的AkaLuc荧光素酶的酶活性进行定量(图11(B))。

[0079] BMS-986020给药组即使是50mg/kg给药,从给药开始2周后(移植后5周后)起,也确认到了胶质母细胞瘤细胞的增殖抑制,显示出与移植时几乎同等的相对肿瘤体积,移植后第7周以后,与对照相比,可见显著差异。可见LPAR1拮抗剂对于胶质母细胞瘤也显示抗肿瘤效果。

[0080] 如上所示,本发明人等揭示了在骨肉瘤的转移机制中LPAR1起到很大作用。并且,基于对转移机制的揭示,通过小鼠模型证明了,通过给药LPAR1拮抗剂能够抑制转移。如上所述,骨肉瘤的肺转移几率很高,对于肺转移的骨肉瘤患者没有有效的治疗方法,患者大部

分因肺转移导致的呼吸衰竭而死亡。考虑到这一点,通过LPAR1拮抗剂可以抑制骨肉瘤的肺转移的结果,本发明能够提供一种对于骨肉瘤的新型治疗方法,对于改善预后非常有用。另外还证明了,通过抑制LPAR1表达,可以抑制骨肉瘤细胞增殖、可以诱导细胞凋亡。即,通过给药LPAR1拮抗剂,不仅能够抑制转移,还能够抑制骨肉瘤增殖。通过抑制LPA-LPAR1相互作用对于骨肉瘤的治疗被认为是一种能够抑制骨肉瘤的转移和增殖的新型治疗方法。

[0081] 并且,还表明LPAR1拮抗剂不仅对于骨肉瘤有效,对于同样高表达LPAR1的神经胶质瘤也有效。在一些部位产生的神经胶质瘤由于难以进行外科治疗,而且也难以完全切除肿瘤细胞,是一种难治性肿瘤。LPAR1拮抗剂被认为对于神经胶质瘤也提供了新的治疗选项。

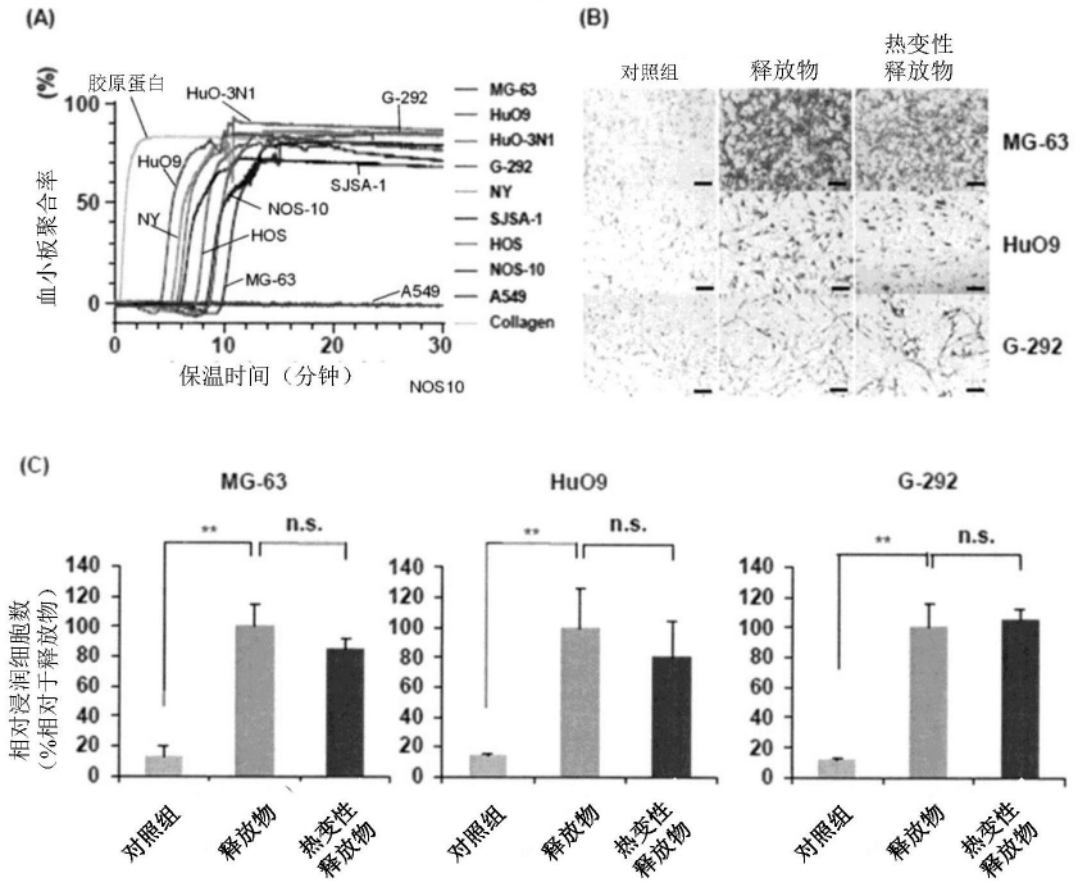

(A)
(%)
胶原蛋白
HuO-3N1
G-292
HuO9
SJSA-1
NY
NOS-10
HOS
MG-63
A549
血小板聚合率
保温时间（分钟）
NOS10
MG-63
HuO9
HuO-3N1
G-292
NY
SJSA-1
HOS
NOS-10
A549
Collagen
(B)
对照组
释放物
热变性
释放物
MG-63
HuO9
G-292
(C)
MG-63
HuO9
G-292
**
n.s.
相对浸润细胞数
（%相对于释放物）
对照组
释放物
热变性
释放物

图1

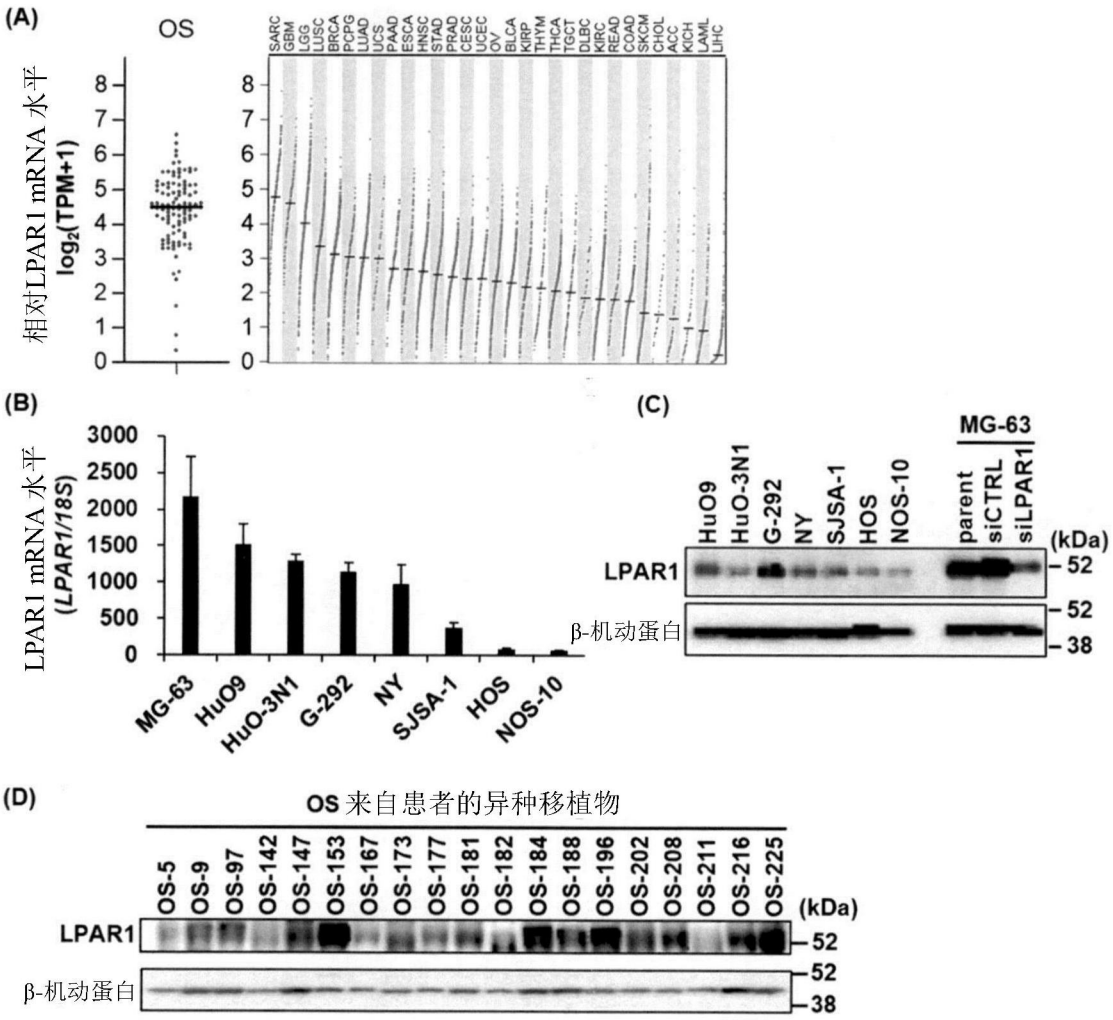

(A)
OS
相对LPAR1 mRNA 水平
log2(TPM+1)
SARC GBM LGG LUSC BRCA PCPG LUAD UCS PAAD ESCA HNSC STAD PRAD CESC UCEC OV BLCA KIRP THYM THCA TGCT DLBC KIRC READ COAD SKCM CHOL ACC KICH LAML UHC
(B)
LPAR1 mRNA 水平
(LPAR1/18S)
MG-63 HuO9 HuO-3N1 G-292 NY SJSA-1 HOS NOS-10
(C)
MG-63
HuO9 HuO-3N1 G-292 NY SJSA-1 HOS NOS-10 parent siCTRL siLPAR1
(kDa)
LPAR1
52
β-机动蛋白
52
38
(D)
OS 来自患者的异种移植物
OS-5 OS-9 OS-97 OS-142 OS-147 OS-153 OS-167 OS-173 OS-177 OS-181 OS-182 OS-184 OS-188 OS-196 OS-202 OS-208 OS-211 OS-216 OS-225
(kDa)
LPAR1
52
β-机动蛋白
52
38

图2

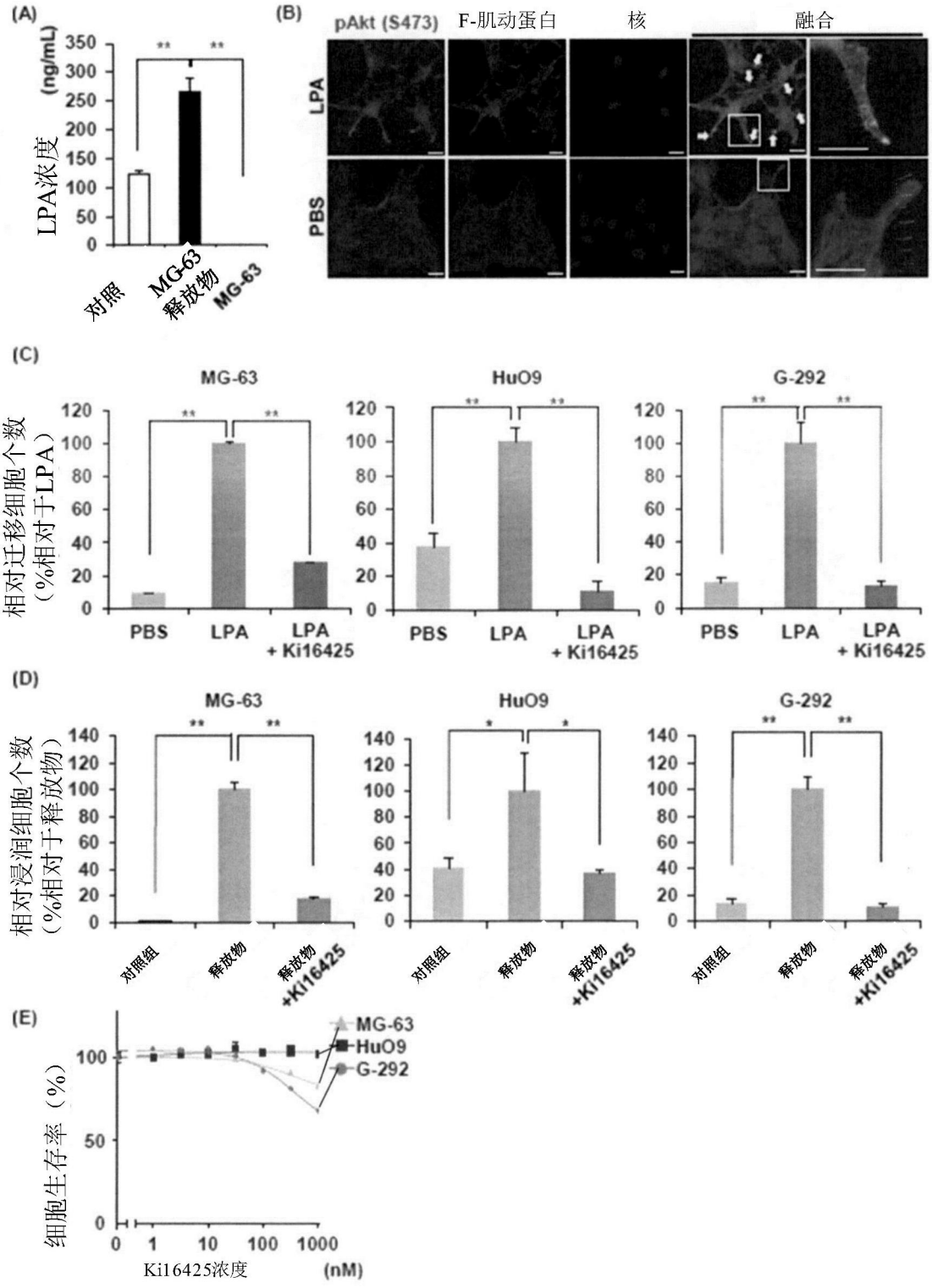

(A)
LPA浓度 (ng/mL)
对照
MG-63释放物
MG-63
(B)
pAkt (S473)
F-肌动蛋白
核
融合
LPA
PBS
(C)
MG-63
HuO9
G-292
相对迁移细胞个数（%相对于LPA）
PBS
LPA
LPA + Ki16425
(D)
相对浸润细胞个数（%相对于释放物）
对照组
释放物
释放物+Ki16425
(E)
细胞生存率（%）
MG-63
HuO9
G-292
Ki16425浓度 (nM)

图3

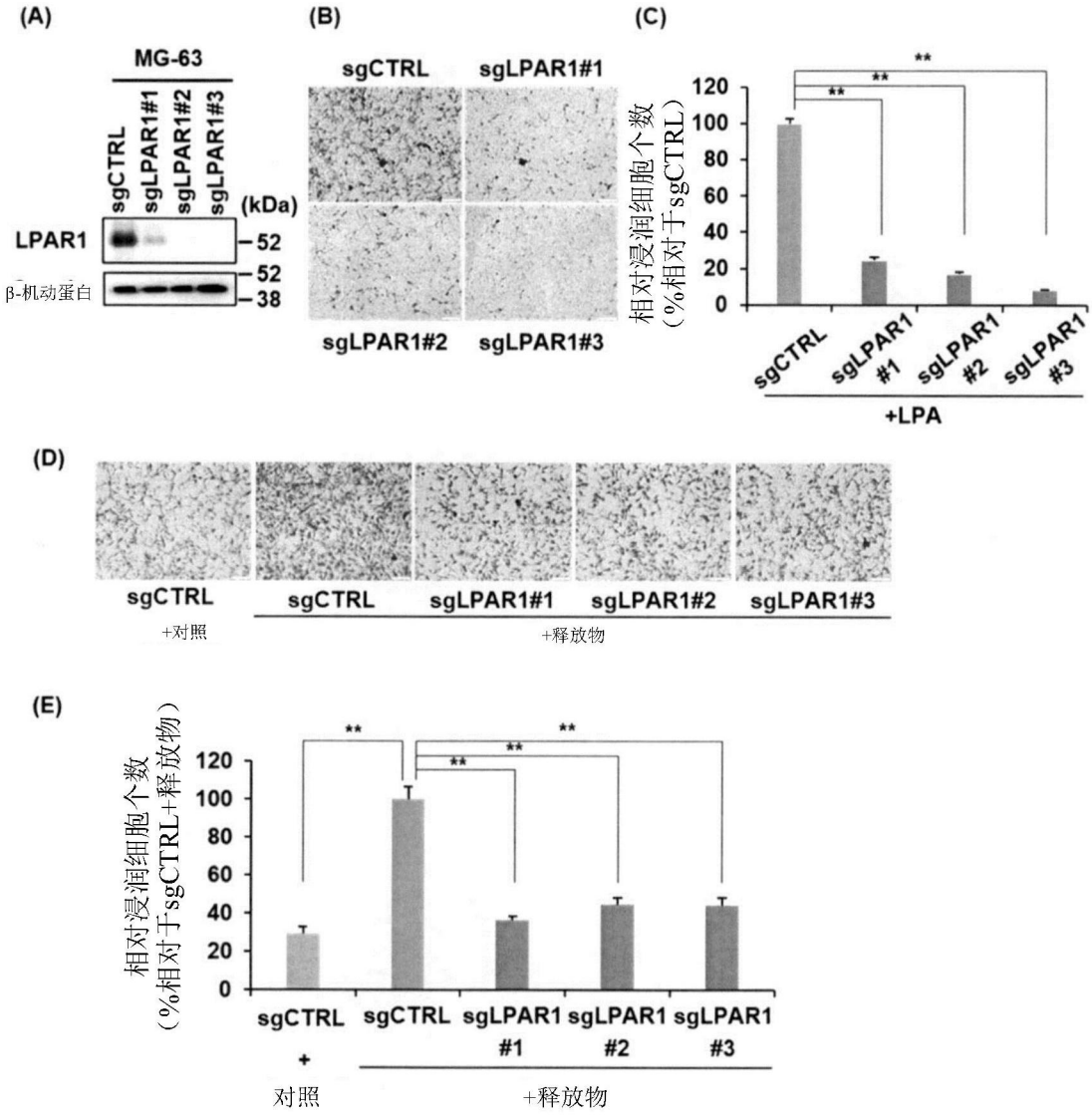

(A)
MG-63
sgCTRL
sgLPAR1#1
sgLPAR1#2
sgLPAR1#3
(kDa)
LPAR1
52
β-机动蛋白
52
38
(B)
sgCTRL
sgLPAR1#1
sgLPAR1#2
sgLPAR1#3
(C)
相对浸润细胞个数
（%相对于sgCTRL）
120
100
80
60
40
20
0
**
**
**
sgCTRL
sgLPAR1 #1
sgLPAR1 #2
sgLPAR1 #3
+LPA
(D)
sgCTRL
+对照
sgCTRL
sgLPAR1#1
sgLPAR1#2
sgLPAR1#3
+释放物
(E)
相对浸润细胞个数
（%相对于sgCTRL+释放物）
120
100
80
60
40
20
0
**
**
**
**
sgCTRL
+
对照
sgCTRL
sgLPAR1 #1
sgLPAR1 #2
sgLPAR1 #3
+释放物

图4

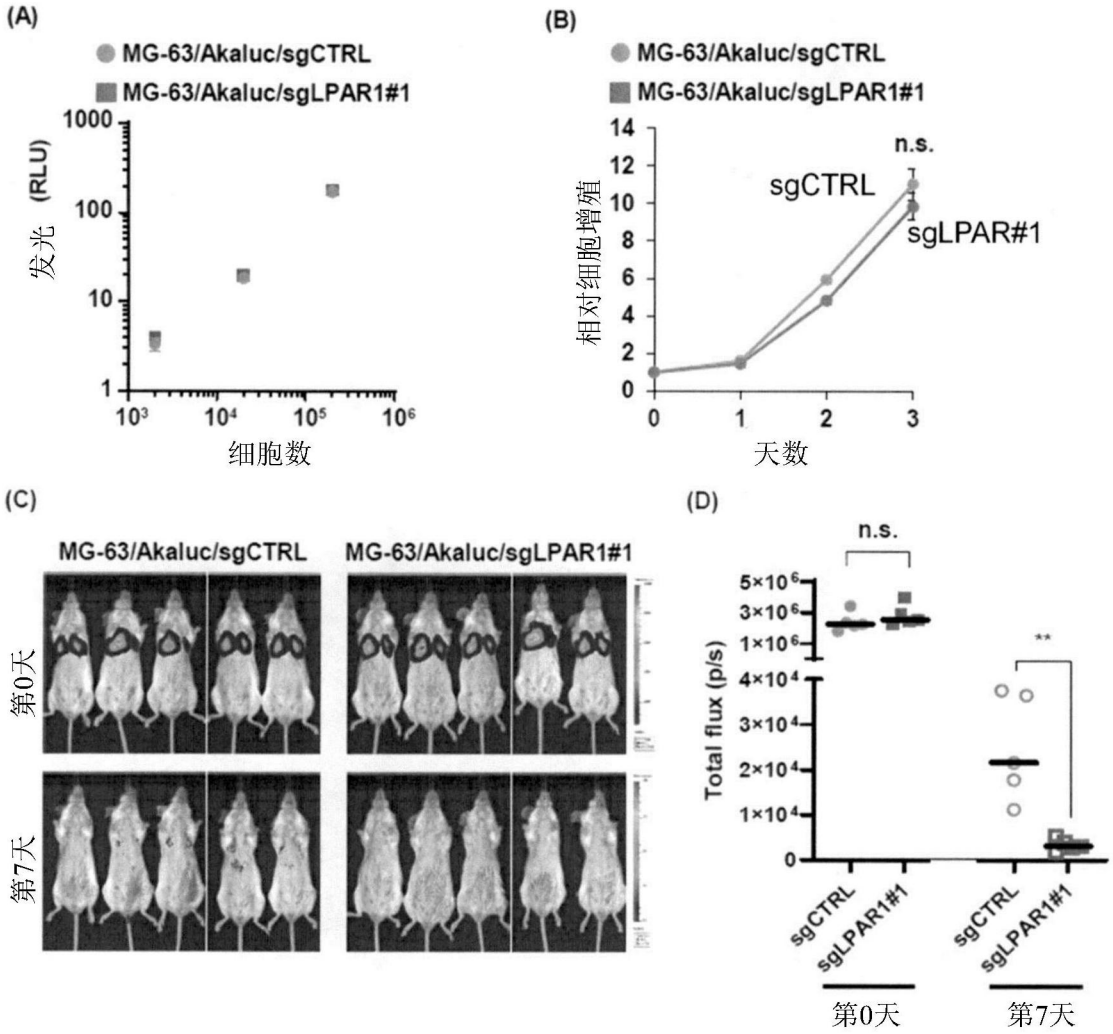

(A)
MG-63/Akaluc/sgCTRL
MG-63/Akaluc/sgLPAR1#1
发光 (RLU)
细胞数
(B)
MG-63/Akaluc/sgCTRL
MG-63/Akaluc/sgLPAR1#1
相对细胞增殖
n.s.
sgCTRL
sgLPAR#1
天数
(C)
MG-63/Akaluc/sgCTRL
MG-63/Akaluc/sgLPAR1#1
第0天
第7天
(D)
n.s.
**
Total flux (p/s)
sgCTRL
sgLPAR1#1
sgCTRL
sgLPAR1#1
第0天
第7天

图5

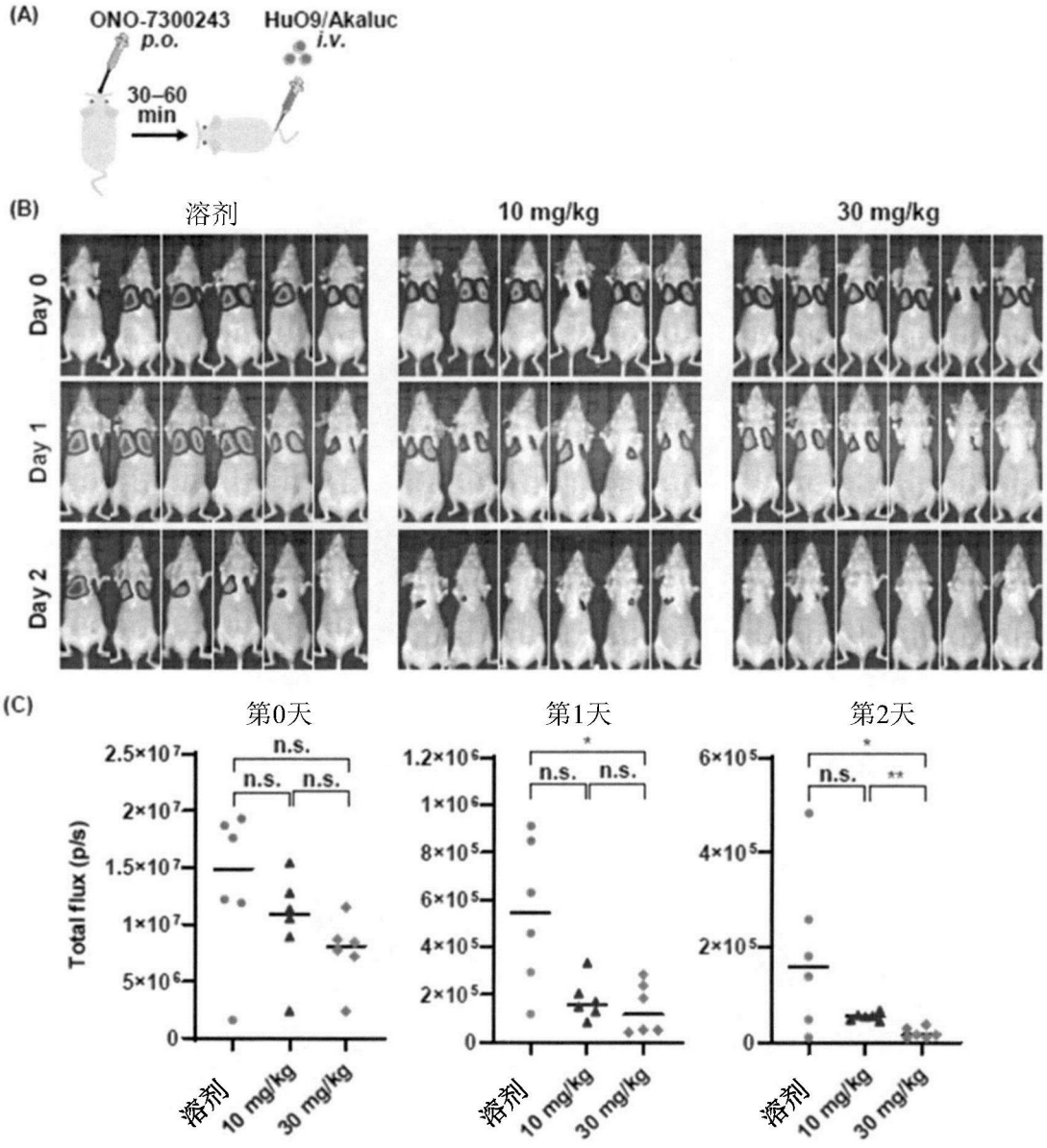

(A)
ONO-7300243
p.o.
HuO9/Akaluc
i.v.
30–60
min
(B)
溶剂
10 mg/kg
30 mg/kg
Day 0
Day 1
Day 2
(C)
第0天
第1天
第2天
Total flux (p/s)
n.s.
*
**
溶剂
10 mg/kg
30 mg/kg

图6

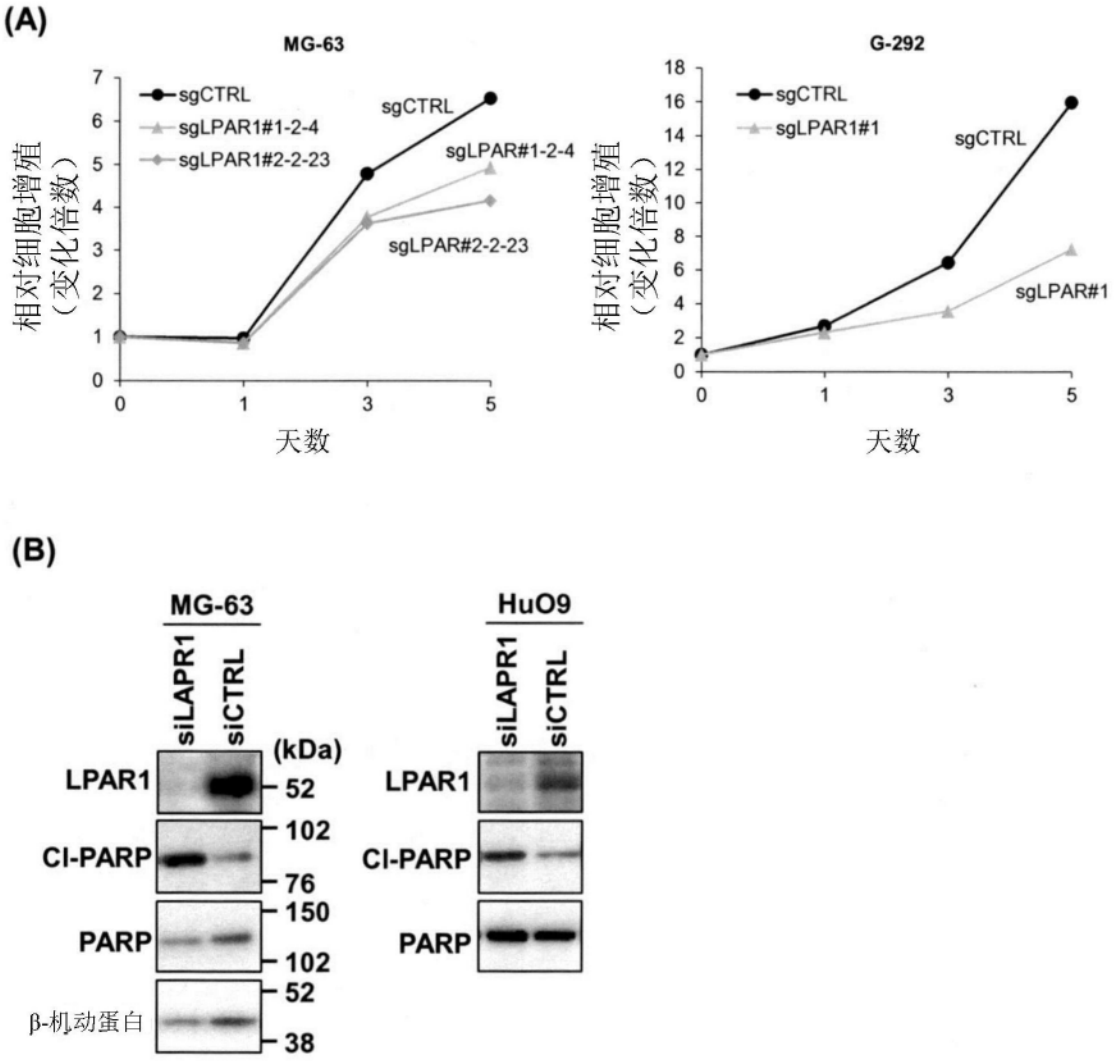

(A)
MG-63
sgCTRL
sgLPAR1#1-2-4
sgLPAR1#2-2-23
sgCTRL
sgLPAR#1-2-4
sgLPAR#2-2-23
相对细胞增殖
（变化倍数）
天数
G-292
sgCTRL
sgLPAR1#1
sgCTRL
sgLPAR#1
相对细胞增殖
（变化倍数）
天数
(B)
MG-63
HuO9
siLAPR1
siCTRL
siLAPR1
siCTRL
(kDa)
LPAR1
52
CI-PARP
102
76
PARP
150
102
β-机动蛋白
52
38
LPAR1
CI-PARP
PARP

图7

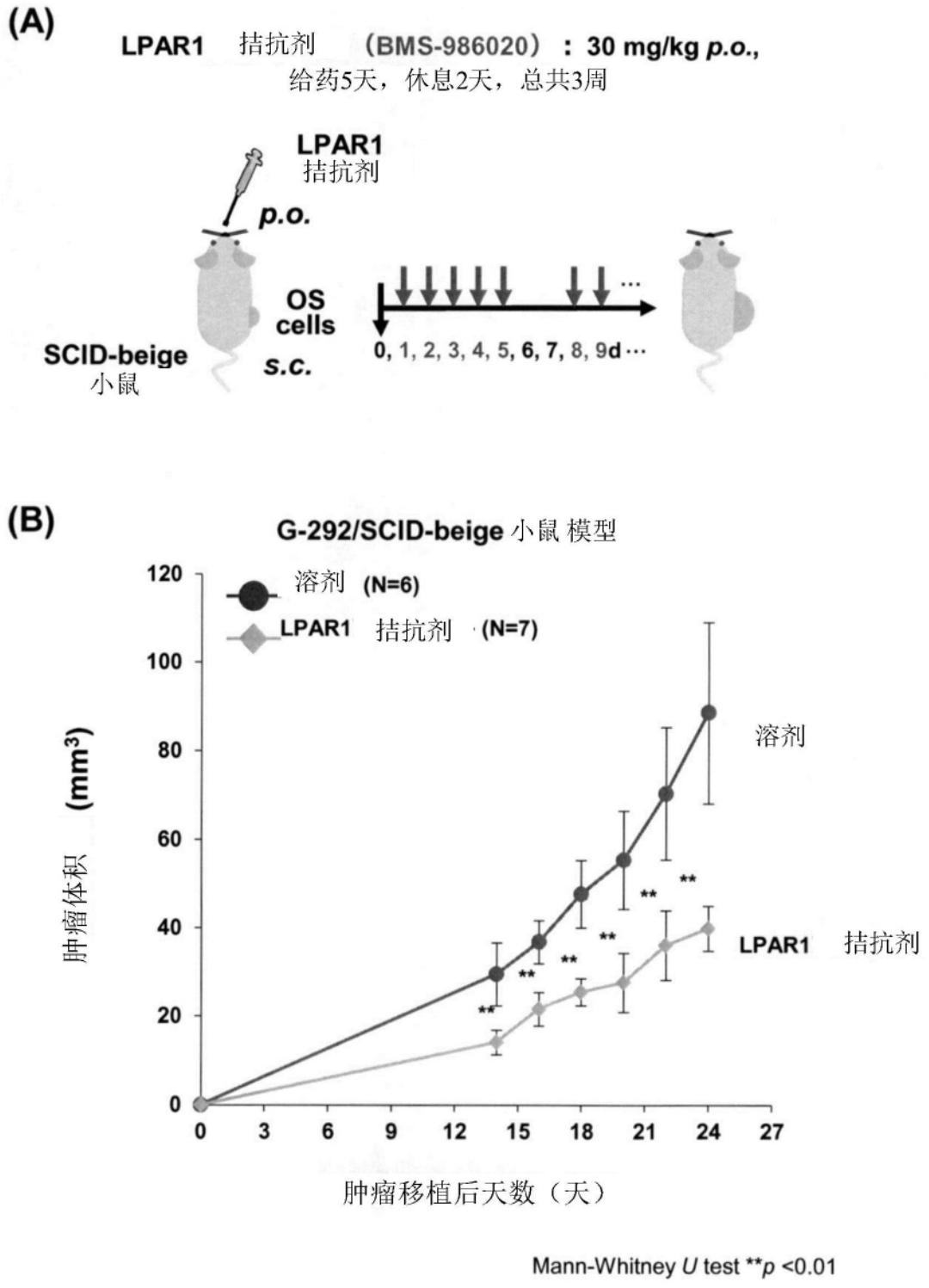

(A)
LPAR1 拮抗剂 (BMS-986020) : 30 mg/kg p.o.,
给药5天，休息2天，总共3周
LPAR1
拮抗剂
p.o.
OS
cells
s.c.
SCID-beige
小鼠
0, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9d…
(B)
G-292/SCID-beige 小鼠 模型
溶剂 (N=6)
LPAR1 拮抗剂 (N=7)
肿瘤体积 (mm3)
溶剂
LPAR1 拮抗剂
肿瘤移植后天数（天）
Mann-Whitney U test **p <0.01

图8

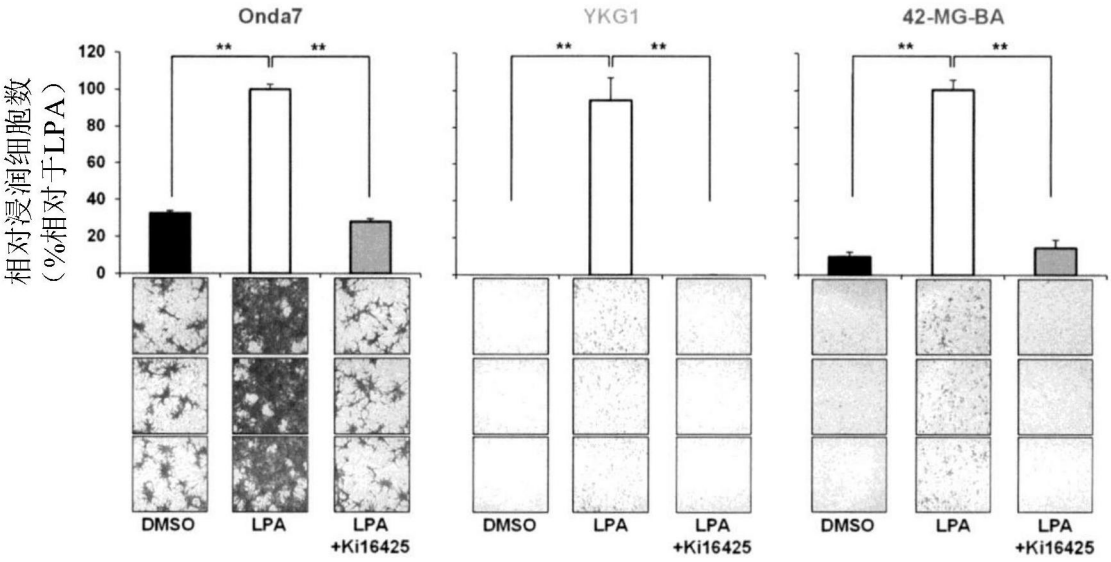

Onda7
YKG1
42-MG-BA
相对浸润细胞数
（%相对于LPA）
120
100
80
60
40
20
0
**
**
DMSO
LPA
LPA
+Ki16425

图9

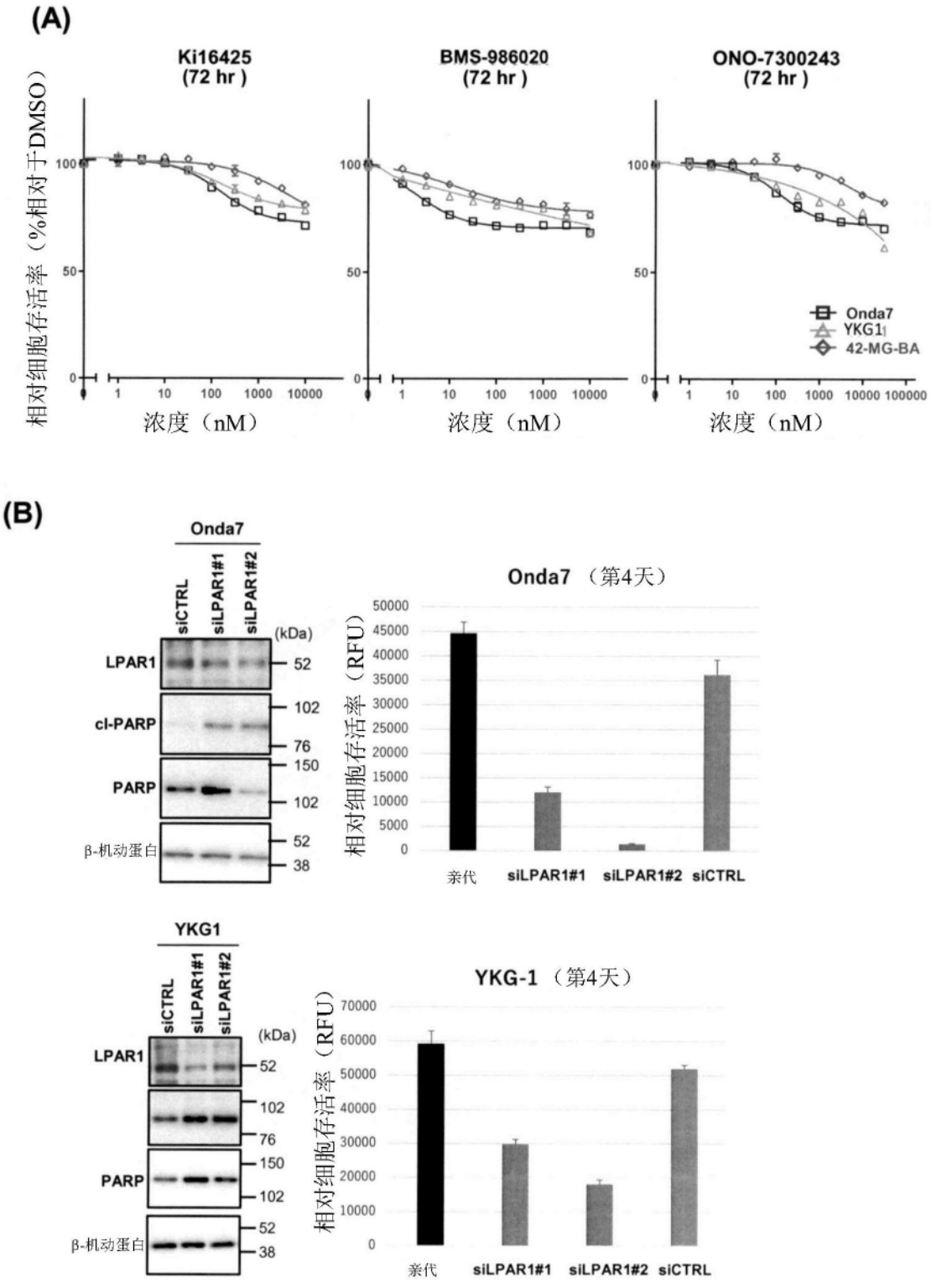

(A)
Ki16425
(72 hr)
BMS-986020
(72 hr)
ONO-7300243
(72 hr)
相对细胞存活率（%相对于DMSO）
浓度（nM）
浓度（nM）
浓度（nM）
Onda7
YKG1
42-MG-BA
(B)
Onda7
siCTRL
siLPAR1#1
siLPAR1#2
(kDa)
LPAR1
cl-PARP
PARP
β-机动蛋白
Onda7 （第4天）
相对细胞存活率（RFU）
亲代
siLPAR1#1
siLPAR1#2
siCTRL
YKG1
YKG-1 （第4天）

图10

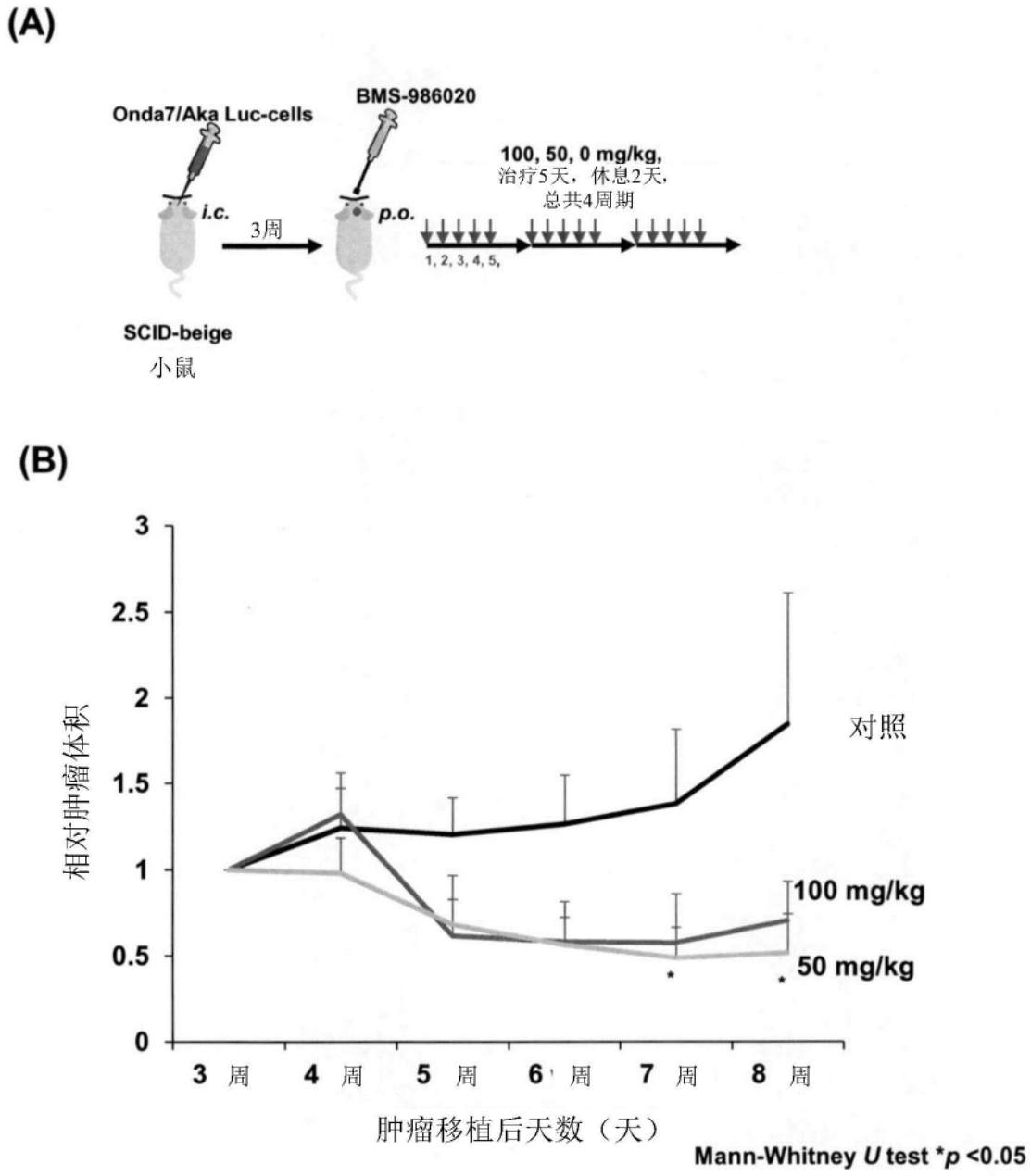

(A)
Onda7/Aka Luc-cells
BMS-986020
i.c.
3周
p.o.
100, 50, 0 mg/kg,
治疗5天，休息2天，
总共4周期
1, 2, 3, 4, 5,
SCID-beige
小鼠
(B)
相对肿瘤体积
3
2.5
2
1.5
1
0.5
0
对照
100 mg/kg
50 mg/kg
3 周
4 周
5 周
6 周
7 周
8 周
肿瘤移植后天数（天）
Mann-Whitney U test *p <0.05

图11