

平成 30 年 6 月 19 日現在

機関番号：17501

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2016～2017

課題番号：16K20063

研究課題名(和文)骨肉腫細胞に対するHSP90阻害剤とドキソルビシン併用による抗腫瘍効果の増強

研究課題名(英文)The antitumor effect of 17-DMAG combined with Doxorubicin in osteosarcoma cells.

研究代表者

岩崎 達也(Iwasaki, Tatsuya)

大分大学・医学部・助教

研究者番号：30769427

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)：近年、分子シャペロン的一种であるHeat shock protein 90 (HSP90) が癌関連蛋白の構造を安定化させる機能があるためHSP90の阻害は重要な治療標的として注目されている。我々は骨肉腫細胞株の遺伝子発現を網羅的に解析したところ、HSP90のクライアント蛋白的一种であるMETの発現が共通に上昇していることを突き止めた。そこで本研究において我々は、骨肉腫細胞に対しHSP90 inhibitorである17-DMAGを投与することでMETのシグナル活性の変化および抗腫瘍効果についての検証を行った。

研究成果の概要(英文)：Recently, inhibition of heat shock protein 90 (HSP90), a type of molecular chaperone, has attracted attention as an important treatment target, because HSP90 has the function of stabilizing the structure of cancer-associated proteins. When we comprehensively analyzed the gene expression of osteosarcoma cell lines, we ascertained that the expression of MET, a type of HSP90 client protein, was universally elevated. MET is a tyrosine kinase receptor that may possibly acquire proliferation and anti-apoptotic ability through activation from the MET protein constructed by HSP90. So, in this study, we verified the changes in MET signal activity and anti-tumor effect by administering the HSP90 inhibitor 17-DMAG to osteosarcoma cells.

研究分野：骨軟部腫瘍

キーワード：骨肉腫 Heat shock protein 90 MET

### 1. 研究開始当初の背景

Heat shock protein 90 (HSP90) はチロシンキナーゼ活性を持つ分子シャペロン的一种であり、細胞内の様々な蛋白質の輸送・活性化に関わっている。悪性腫瘍においては HSP90 により様々な制御機構が破綻状態になっていることが知られているため、マルチキナーゼ阻害剤である HSP90 inhibitor(HSP90i)が新たな抗癌剤として注目されている。正常細胞と比較して腫瘍細胞内の HSP90 の活性は高いため HSP90i は選択性にも優れている。我々は骨肉腫細胞株の遺伝子発現を網羅的に解析したところ、HSP90 のクライアント蛋白の一種である MET の発現が共通に上昇していることを突き止めた。MET はチロシンキナーゼ型レセプターであり、HSP90 によって構築される MET タンパクからの活性化を通じて増殖や抗アポトーシス能を獲得している可能性がある。そこで本研究において我々は、骨肉腫細胞に対し HSP90 inhibitor である 17-DMAG を投与することで MET のシグナル活性の変化および抗腫瘍効果についての検証を行った。

### 2. 研究の目的

骨肉腫は原発性骨腫瘍で最も頻度が高く、化学療法と手術療法の組み合わせが標準的な治療とされている。化学療法などの進歩にも関わらず、肺転移などにより悲惨な結果となる症例も多く存在する。骨肉腫に対する標準治療は手術療法と化学療法だが、化学療法で用いられる薬剤は 1970 年代から用いられてきた抗癌剤が中心である。他の癌腫では様々な分子標的治療薬が開発されている中で、悪性骨腫瘍に対する新規の薬剤はまだ登場していない。HSP90 はチロシンキナーゼ活性を持つ分子シャペロン的一种であり、細胞内の様々な蛋白質の輸送・活性化に関わっている。悪性腫瘍においては HSP90 により様々な制御機構が破綻状態になっていることが知られているため、マルチキナーゼ阻害剤である HSP90 inhibitor(HSP90i)が新たな抗癌剤として注目されている。正常細胞と比較して腫瘍細胞内の HSP90 の活性は高いため HSP90i は選択性にも優れている。今回我々は繊維芽細胞株と比較して 4 種類の骨肉腫細胞株が共通に上昇している因子をマイクロアレイにて抽出した。その中で HSP90 のクライアントタンパクでもある MET がすべての骨肉腫細胞株で上昇していることを突き止めた。MET は肝細胞増殖因子(HGF)をリガンドとする受容体型チロシンキナーゼをコードするがん遺伝子であり、HGF/c-MET シグナルの活性化は細胞の増殖、生存、運動性を増加させることで腫瘍形成に関与していると考えられており MET パスウェイの異常な活性化は胃癌や肝癌を含む様々な腫瘍で確認されている。また MET は細胞増殖や抗アポトーシスに関与している

ということも報告されており、骨肉腫細胞株においても腫瘍細胞の増殖やアポトーシス抵抗性に大きく関与している可能性がある。本研究の目的は、骨肉腫細胞に対する 17-DMAG の抗腫瘍効果について検証することである。HSP90 のクライアントタンパクの一種である MET が 17-DMAG によりその活性化を抑制することができれば増殖能や高アポトーシス状態を変化させ抗腫瘍効果が得られる可能性がある。本研究において、骨肉腫細胞において 17-DMAG が MET のチロシンキナーゼ活性および下流のシグナル伝達機能を阻害することによる抗腫瘍効果が確認することで、骨肉腫の標準治療に抵抗する症例に関して新たな治療戦略の開発につながると考えている。

### 3. 研究の方法

4 種類のヒト骨肉腫細胞株 (HOS, Saos, MG63, NY) およびヒト繊維芽細胞株 (MRC5) から RNA を抽出、cDNA array を行った。MRC と比較し骨肉腫細胞に特異的な発現異常を検索した結果、全ての骨肉腫細胞株に共通して MET 遺伝子の発現上昇を認めた。骨肉腫細胞株に 17-DMAG を投与し、1) 細胞増殖、2) 細胞周期、3) western blot による MET および下流シグナルの発現変化、4) ヌードマウスでの腫瘍増殖、について解析した。

### 4. 研究成果

1) 骨肉腫細胞株における遺伝子発現の網羅的解析; マイクロアレイにて MRC5 をコントロールとして 4 種類の骨肉腫細胞株の mRNA を cDNA アレイにて網羅的に解析した。MRC5 と比較し骨肉腫細胞株に共通して 2 倍以上の上昇を 745 個で、1/2 以下の低下は 241 個であった。MRC5 と比較して 4 種の骨肉腫細胞株では共通に MET の発現が高値であることが分かった。

2) 17-DMAG は骨肉腫細胞の増殖を抑制する; 17-DMAG を骨肉腫細胞株 (MG63, Saos, HOS, NY) とヒト繊維芽細胞株 (MRC5) に投与し、細胞増殖および viability を調査した。MTT アッセイにて 100 nM の 17-DMAG 投与にて骨肉腫細胞株がいずれも有意に Viability が低下したが同濃度の 17-DMAG 投与でも MRC5 の viability は変化なかった。17-DMAG における各細胞株の増殖変化を 24 時間、48 時間、72 時間の反応時間でそれぞれ調査した。24 時間経過後、MG63 は、Saos は、HOS は、NY は、MRC と有意差をもって低下していた。48 時間経過後、MG63 は、Saos は、HOS は、NY は、MRC と有意差をもって低下していた。72 時間経過後、MG63 は、Saos は、HOS は、NY は、MRC と有意差をもって低下していた。

3) HGF 投与による MET の活性化および 17-DMAG 投与による MET のリン酸化抑制; HSP90 のクライアントタンパクである MET のリガンドである HGF によって MET と下

流因子のリン酸化を認めるか反応時間を12時間と一定にして濃度を变化させて調べた。まずレセプタータンパクであるMETは100nMで蛋白の発現が低下した。METのリン酸化において17-DMAGの用量依存性であるか調査した。HGFを投与するとチロシンキナーゼレセプターであるMETは有意差をもってリン酸化した。HGF投与下に17-DMAGを反応させると50nMおよび100nMでそれぞれMETのリン酸化が低下していた。HGF投与下に17-DMAGを反応させると50nMおよび100nMでそれぞれPI3Kのリン酸化が低下していた。HGF投与下に17-DMAGを反応させると50nMおよび100nMでそれぞれAKTのリン酸化が低下していた。AKTタンパクの発現は17-DMAGの濃度変化による影響はなかった。次に17-DMAGを50nMに設定し時間依存性にMETのリン酸化がどのように変化するかタンパクの発現を調べた。17-DMAGは50nMよりMETの下流シグナルのリン酸化が低下することが判明した。17-DMAGの濃度を50nMで一定にして、反応時間依存的にMETと下流シグナルのリン酸化が低下するか調査した。HGF投与下に50nMの17-DMAGを反応させると24時間投与群と比較し48時間、72時間、96時間の群でそれぞれMETのリン酸化が低下していた。HGF投与下に50nMの17-DMAGを反応させると24時間投与群と比較し48時間、72時間、96時間の群でそれぞれPI3Kが低下していた。HGF投与下に50nMの17-DMAGを反応させると24時間投与群と比較し48時間、72時間、96時間の群でそれぞれAKTのリン酸化が低下していた。

4) 17DMAGは細胞周期の進行抑止するMETおよび下流シグナルの結果より、細胞周期への影響を調査した。17DMAG投与後12時間で50nM投与群において細胞周期はG2/M期の割合が増加しS期への進行が止まっていた。G0/G1 phaseの割合はUntreatedおよび25nM投与と比較し50nMおよび100nM投与群は有意に低下していた。G2/M phaseの割合はUntreatedおよび25nM投与と比較し50nMおよび100nM投与群は有意に増加していた。この結果より17-DMAGは50nM以上でG2/M期で細胞周期が停止していると考えられたためG2/M期の進行に関与する因子についてタンパク発現を調査した。CHK1の発現量はUntreatedおよび25nM投与と比較し50nMおよび100nM投与群は有意に低下していた。CCNB1の発現量はUntreatedおよび25nM投与と比較し50nMおよび100nM投与群は有意に低下していた。CDK1の発現量はUntreatedおよび25nM投与と比較し50nMおよび100nM投与群は有意に低下していた。

5) 17DMAGによってアポトーシス関連蛋白の発現が亢進する; 17-DMAGを48時間投与しそれぞれの濃度で骨肉腫細胞のア

ポトーシスに与えるタンパクの発現を解析した。PARPの発現量はUntreated,25nM,50nMと比較し100nM投与で有意に低下していた。Cleaved PARPの発現量はUntreatedおよび25nM投与と比較し50nMおよび100nM投与群は有意に低下していた。Caspase 3の発現量はUntreated,25nM,50nM,100nM投与群の間で有意な差はなかった。Cleaved caspase 3の発現量はUntreatedおよび25nM投与と比較し50nMおよび100nM投与群は有意に低下していた。Caspase 7の発現量はUntreated,25nM,50nM,100nM投与群の間で有意な差はなかった。Cleaved caspase 7の発現量はUntreatedおよび25nM投与と比較し50nMおよび100nM投与群は有意に低下していた。Caspase 9の発現量はUntreated,25nM,50nM,100nM投与群の間で有意な差はなかった。Cleaved caspase 9の発現量はUntreatedおよび25nM投与と比較し50nMおよび100nM投与群は有意に低下していた。17-DMAGが骨肉腫細胞の細胞周期およびアポトーシスに与える影響をFlow cytometryで検証した。アポトーシスの割合はUntreatedおよび25nM投与と比較し50nMおよび100nM投与群は低下していた。

6) マウスでの検証; マウスに移植した腫瘍はUntreated群およびsaline群と比較して17-DMAG使用群において有意に縮小していた。またUntreated群およびsaline群と比較して17-DMAG使用群において生存期間は有意に短縮していた。腫瘍移植から28日後に採取した腫瘍組織の免疫染色ではp-METとp-Aktを染色した。p-MET陽性細胞はUntreated群およびsaline群と比較し17-DMAG投与群において有意に減少していた。p-Akt陽性細胞はUntreated群およびsaline群と比較し17-DMAG投与群において有意に減少していた。

17-DMAGを投与した骨肉腫細胞群において細胞周期はG2/Mでの停止、細胞増殖の抑制およびアポトーシスの誘導を認めた。また、17-DMAG投与群においてMETのリン酸化および下流シグナルであるPI3KおよびAktのリン酸化が低下していた。同様の細胞株にまたin vivoにおいても17-DMAG投与群において腫瘍増殖の抑制効果をもとめた。今回の結果は骨肉腫細胞で発現が高値であるMETを17-DMAGで抑制することで増殖抑制とアポトーシス誘導を確認できた。骨肉腫の標準治療に抵抗する症例に対し新たな治療戦略を確立できる可能性がある。

## 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 件)

〔学会発表〕(計 1 件)

・骨肉腫細胞における 17-DMAG による MET 発現抑制と腫瘍増殖能の解析。

発表者； 河野正典

2017年7月14日 第50回日本整形外科学会骨・軟部腫瘍学術集会。京王プラザホテル（東京都）

〔図書〕（計 件）

〔産業財産権〕

出願状況（計 件）

名称：

発明者：

権利者：

種類：

番号：

出願年月日：

国内外の別：

取得状況（計 件）

名称：

発明者：

権利者：

種類：

番号：

取得年月日：

国内外の別：

〔その他〕

ホームページ等

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

岩崎達也 ( IWASAKI tatsuya )

大分大学整形外科・助教

研究者番号： 30769427

### (2) 研究分担者

( )

研究者番号：

### (3) 連携研究者

( )

研究者番号：

### (4) 研究協力者

( )