

## 科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成25年 4月16日現在

機関番号：14501

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2010～2012

課題番号：22791378

研究課題名（和文） 骨軟部肉腫に対する長寿因子 SIRT1 を標的とした分子標的治療への応用

研究課題名（英文） A novel therapeutic strategy with SIRT1-targeted therapy for musculoskeletal malignancies.

研究代表者

河本 旭哉 (KAWAMOTO TERUYA)

神戸大学・医学部附属病院・助教

研究者番号：30420558

研究成果の概要（和文）：抗アポトーシス作用を有する長寿因子 SIRT1 を標的とした骨軟部肉腫に対する分子標的治療の確立を目的として基礎的検討を行った。骨肉腫や悪性線維性組織球種（MFH）などの悪性腫瘍では良性腫瘍である神経鞘腫よりも有意な SIRT1 の高発現をみとめ、その機能を阻害することで MFH 細胞の増殖能が低下することが明らかとなった。以上から SIRT1 が骨軟部肉腫に対する分子標的治療の標的になりうる可能性が示唆された。

研究成果の概要（英文）：To establish the molecular targeting therapy focused on an anti-aging gene, SIRT1 for human musculoskeletal malignancies, we assessed the expression of SIRT1 in various musculoskeletal tumors, and evaluated the effect of SIRT1 inhibition in human MFH cell lines. SIRT1 highly expressed in tissues from osteosarcomas and MFHs, compared to benign schwannomas, and the inhibition of SIRT1 decreased the cell viability in human MFH cells. Our findings strongly indicate that SIRT1 can be a novel therapeutic target for molecular targeting therapy on human musculoskeletal malignancies, and further studies on the roles of SIRT1 in musculoskeletal malignancies will be needed.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2010年度	500,000	150,000	650,000
2011年度	900,000	270,000	1,170,000
2012年度	1,100,000	330,000	1,430,000
年度			
年度			
総計	2,500,000	750,000	3,250,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：外科系臨床医学・整形外科学

キーワード：骨軟部肉腫、SIRT1、長寿因子、抗アポトーシス

## 1. 研究開始当初の背景

骨軟部肉腫は骨軟部に発生する悪性腫瘍であり、10万～20万人に1人程度と発症率の極めて低い疾患である。治療法として手術的加療を中心に、化学療法および放射線治療を合わせた集学的治療が行なわれるが、腫瘍型が多様であり、発生部位も多彩であること

から確立された治療法はほとんど存在しない。また補助療法である放射線治療の奏効率は低く、化学療法による治療効果も非常に乏しいものであり、切除不能の進行症例や再発、遠隔転移症例においては予後不良となることも稀ではない。これらの観点から手術的加療が治療の中心となるが、手術侵襲が大きいと術後に高度な機能障害が残存するため、結

果として‘生活の質’ (QOL; Quality of Life) が低下することはほぼ必発であり、手術侵襲の縮小化や再発、転移を予防する観点からも有効な化学療法の実立は必要不可欠である。

上皮系および血液系悪性腫瘍である癌腫や白血病などに対しては近年、新たな抗腫瘍薬として分子標的治療薬が開発されている。これら分子標的治療薬の多くは腫瘍細胞の増殖、浸潤、転移などに関わる因子をその標的とし、選択的にその活性化を阻害することで抗腫瘍効果を発揮する薬剤である。これら分子標的治療薬の標的である増殖因子受容体や細胞内シグナル伝達因子は骨軟部肉腫においても細胞の分化、増殖に関与していることが古くから提言されており、より積極的な分子標的の究明および治療薬の開発が期待される。

ヒストン脱アセチル化酵素である SIRT1 は細胞のアポトーシスや細胞周期を制御する酵素として知られ、“Healthy-Aging”あるいは“Anti-Aging”効果をもち、近年『長寿因子』として注目されている。しかし SIRT1 がもつその強力な抗アポトーシス作用は、種々の悪性腫瘍においてその増殖や悪性度にも強く関与し、腫瘍の悪性化を高めているという報告が多くなされ、さらに癌を中心とした悪性腫瘍において SIRT1 を標的とした治療の有用性について様々な研究がなされつつある。

私はこの SIRT1 に注目し、骨軟部肉腫における SIRT1 の発現および腫瘍増生への作用、さらに SIRT1 を標的とした分子標的治療の応用について検討するため、本研究を計画した。

## 2. 研究の目的

本研究の目的は骨軟部肉腫における長寿遺伝子 SIRT1 の発現および腫瘍増生への影響を検討し、骨軟部肉腫に対する新たな治療への応用を評価することであり、化学療法において極めて発展途上である骨軟部肉腫の領域において現在使用承認あるいは開発中である薬剤ではなく、新たな分子標的治療の可能性について検討、確立を目指すものである。

## 3. 研究の方法

(1) 当院で手術時に採取した良悪性骨軟部腫瘍組織における SIRT1 の発現について評価し、骨軟部腫瘍における SIRT1 発現の関与について検討した。

(2) 代表的な骨軟部肉腫である MFH 細胞株を用い、SIRT1 機能賦活剤である Resveratrol、SIRT1 機能阻害剤である Sirtinol と SIRT1 選択的抑制合成 siRNA 導入による SIRT1 機能阻害が与える影響について in vitro で評価、

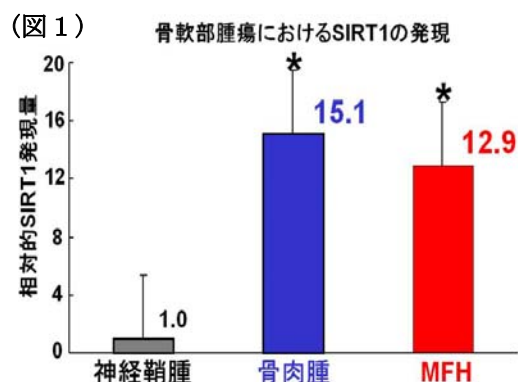
検討した。

(3) 上記 (2) の結果を踏まえ、SIRT1 選択的抑制合成 siRNA 導入 MFH 細胞 (およびコントロール細胞) をヌードマウスに皮下移植し、SIRT1 機能阻害の in vivo での腫瘍形成能に与える影響について評価・検討した。

(4) SIRT1 の抗アポトーシス作用においてミトコンドリア機能が重要であることが知られている。そこで骨軟部腫瘍におけるミトコンドリア機能を評価するため、骨軟部腫瘍組織におけるミトコンドリア量とミトコンドリア発現に重要である PGC-1alpha の発現について検討した。さらに MFH 細胞株にプラスミドを用いて PGC-1alpha の発現強制を行い、細胞内のミトコンドリア量の変化とミトコンドリア系アポトーシスへの影響についても評価した。

## 4. 研究成果

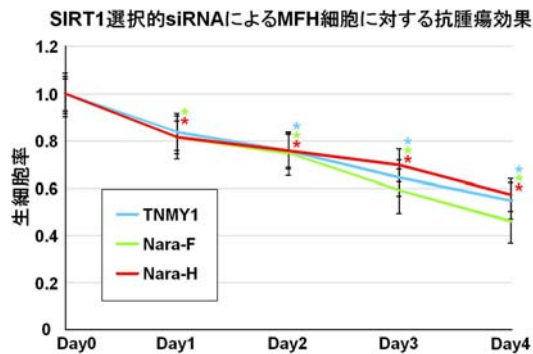
(1) 当院での手術時に採取した良性および悪性骨軟部腫瘍組織 45 検体 (神経鞘腫 15 検体、骨肉腫 15 検体、悪性線維性組織球腫 (MFH) 15 検体) における SIRT1 の発現についてリアルタイム PCR 法による定量的な検討を行ったところ、良性腫瘍である神経鞘腫と比較して悪性腫瘍である骨肉腫や MFH における SIRT1 の発現が有意に高く、骨軟部腫瘍において SIRT1 の発現が腫瘍の悪性度に関与している可能性が示唆された (図 1)。



(2) (1) の結果を踏まえ、SIRT1 機能の選択的阻害が骨軟部肉腫細胞の増殖能に抑制的に作用する、と仮説し、SIRT1 阻害剤である Sirtinol、SIRT1 の発現を選択的に抑制する合成 siRNA によるヒト MFH 細胞株 3 株 (TNMY1, Nara-F, Nara-H) に対する抗腫瘍効果について in vitro の実験系で検討した。Sirtinol 添加により濃度および時間依存性にヒト MFH 細胞株の増殖能が低下し、同様に SIRT1 選択的 siRNA 導入においても MFH 細胞の増殖能低下をみとめた (図 2)。しかし、SIRT1 機能賦活剤である Resveratrol 添加で

は有意な細胞増殖能の変化をみとめなかった。

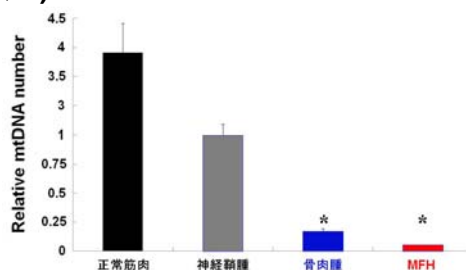
(図2)



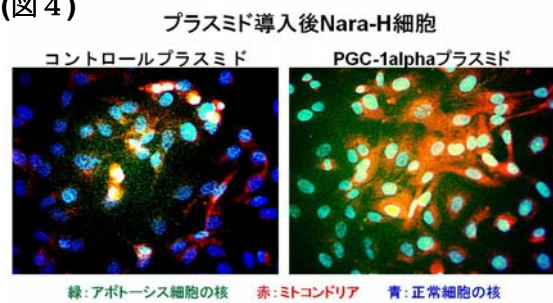
(3) (2) の結果より、SIRT1 機能阻害がヒト MFH 細胞株に対して抗腫瘍効果を示すことが明らかとなった。そこで SIRT1 選択的 siRNA を導入した MFH 細胞をヌードマウスに皮下移植し、SIRT1 機能抑制 MFH 細胞株の in vivo での腫瘍形成能の評価を試みた。しかし、コントロール siRNA、SIRT1 選択的 siRNA とともに siRNA 導入後の MFH 細胞のマウスへの生着が悪く、腫瘍形成が十分に得られなかったため、in vivo での評価が適切に行えなかった。

(4) SIRT1 の抗アポトーシス作用においてミトコンドリア機能が重要であることが知られていることから、骨軟部腫瘍におけるミトコンドリア機能を評価した。まず、骨軟部腫瘍組織におけるミトコンドリア量とミトコンドリア発現に重要である PGC-1alpha の発現について検討したところ、正常筋組織や良性腫瘍である神経鞘腫と比較して悪性腫瘍である骨肉腫や MFH ではミトコンドリア量、PGC-1alpha の発現がともに有意に低いことが明らかとなり、骨軟部腫瘍の悪性化あるいは腫瘍増生においてミトコンドリア機能低下が関与していることが示唆された(図3)。また、ヒト MFH 細胞株に対してプラスミド導入による PGC-1alpha の発現強制を行うと、ミトコンドリア量が増加し、ミトコンドリア系アポトーシスが誘導された(図4)。以上から骨軟部肉腫においてはミトコンドリア機能低下がその腫瘍増生に関与しており、これを改善することでミトコンドリア系アポトーシスを誘導できる可能性が示唆された。

(図3)



(図4)



本研究の結果から、骨軟部肉腫の悪性化あるいは腫瘍増生において長寿遺伝子 SIRT1 の関与が示唆され、その発現を低下させることで抗腫瘍効果が得られる可能性が示された。しかし、研究期間中に in vivo での検討を十分に行っておらず、生体内における SIRT1 発現の骨軟部肉腫に対する影響については評価出来ていない。今後も本検討を行う必要があると思われる。

また最終的に検討した骨軟部肉腫におけるミトコンドリア機能については、非常に興味深い結果が得られており、SIRT1 発現とミトコンドリア機能との関連についてもさらに検討を続けたいと考えている。

## 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6件)

① Onishi Y, Kawamoto T, Ueha T, Hara H, Fukase N, Toda M, Harada R, Sakai Y, Miwa M, Nishida K, Kurosaka M, Akisue  
Transcutaneous application of carbon dioxide (CO<sub>2</sub>) enhances chemosensitivity by reducing hypoxic conditions in human malignant fibrous histiocytoma  
J Cancer Sci Ther  
4:174-181  
2012  
(査読有)

② Onishi Y, Kawamoto T, Ueha T, Kishimoto K, Hara H, Fukase N, Toda M, Harada R, Minoda M, Sakai Y, Miwa M, Kurosaka M, Akisue T.  
Transcutaneous application of carbon dioxide (CO<sub>2</sub>) induces mitochondrial apoptosis in human malignant fibrous histiocytoma in vivo  
PLoS One. 7:e49189  
2012

(査読有)

③Onishi Y, Kawamoto T, Kishimoto K, Hara H, Fukase N, Toda M, Harada R, Kurosaka M, Akisue T.

PKD1 negatively regulates cell invasion migration and proliferation ability of human osteosarcoma

Int J Oncol

40(6):1839-1848

2012

(査読有)

④Fukase N, Kawamoto T, Kishimoto K, Hara H, Okada Y, Onishi Y, Toda M, Kurosaka M, Akisue T.

Protein kinase Cdelta in tumorigenesis of human malignant fibrous histiocytoma

Oncol Rep

26(5):1221-1226

2011

(査読有)

⑤Nakamura O, Hitora T, Akisue T, Kawamoto T, Yamagami Y, Yamamoto T. Inhibition of induced autophagy increases apoptosis of Nara-H cells. Int J Oncol

39(6):1545-1552

2011

(査読有)

⑥Okada Y, Akisue T, Hara H, Kishimoto K, Kawamoto T, Imabori M, Kishimoto S, Fukase N, Onishi Y, Kurosaka M.

The Effect of Bevacizumab on Tumour Growth of Malignant Fibrous Histiocytoma in an Animal Model

Anticancer Res.

30(9): 3391-3395

2010

(査読有)

[学会発表] (計 15 件)

① 河本旭哉

SIRT1 阻害による骨軟部肉腫に対する細胞増殖抑制効果

第 84 回日本整形外科学会総会

2011. 5. 12

東京

② Kawamoto T

Inhibition of SIRT1 Decreased Cell Proliferation of MFH Cells.

The 57th Annual Meeting of the Orthopaedic Research Society

2011. 1. 13

Long Beach, USA

③ 河本旭哉

骨軟部悪性腫瘍における SIRT1 の発現とその阻害による抗腫瘍効果.

第 25 回日本整形外科学会基礎学術集会

2010. 10. 14

京都

6. 研究組織

(1) 研究代表者

河本 旭哉 (KAWAMOTO TERUYA)

神戸大学・医学部附属病院・助教

研究者番号：30420558