

平成 27 年 6 月 10 日現在

機関番号：16201

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2011～2014

課題番号：23592189

研究課題名(和文)骨軟部肉腫に対する分子標的治療

研究課題名(英文)Target therapy for bone and soft tissue sarcoma

研究代表者

中村 修(Nakamura, Osamu)

香川大学・医学部・助教

研究者番号：40532685

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,900,000円

研究成果の概要(和文)：ヒト骨軟部肉腫細胞株(MG63、Nara-H Cell)を使用し、近年着目を受けているmTOR経路を標的とした新たな抗腫瘍治療の開発についてin vitroおよびin vivoでの研究を行った。mTOR抑制薬ラパマイシンによる腫瘍細胞の防御的オートファジーを、オートファジー抑制薬を併用することにより抑え、アポトーシスの誘導および強力な抗腫瘍効果の発現を証明した。

研究成果の概要(英文)：We examined target therapy of mTOR pathway using human bone and soft tissue sarcoma cell lines (MG63, Nara-H Cell). Our present study suggested that self protective mechanisms involving mTOR inhibitors in sarcoma cells are prevented by the inhibition of autophagy. The combination of an mTOR inhibitor and an autophagy inhibitor may offer effective treatment for sarcoma, as this combination effectively activates apoptotic pathways.

研究分野：整形外科

キーワード：骨軟部腫瘍 オートファジー アポトーシス mTOR

1. 研究開始当初の背景

近年、種々のがん治療において、効果が期待される分子標的治療薬の一つに mTOR 抑制薬がある。この mTOR 抑制薬はアポトーシスを誘導することにより抗腫瘍効果を発揮すると既存の報告では広く言われている。ところが、最近の報告によると、mTOR 抑制薬投与により、腫瘍細胞は防御反応としてオートファジーを引き起こし、そのオートファジーを阻害すると、アポトーシスが誘導されると種々のがん細胞を使用した実験で証明されている。

2. 研究の目的

本研究の目的は、骨軟部肉腫細胞株において、mTOR 抑制薬により、実際にオートファジーが誘導され、更にそのオートファジー抑制薬により、アポトーシスが誘導されるかどうか、in vitro および in vivo の実験で検証し、骨軟部肉腫治療について新たな知見を得ることである。

3. 研究の方法

具体的には、当研究室で入手・維持している骨軟部肉腫細胞株(骨肉腫細胞株:MG63、軟部肉腫細胞株:Nara-H)を用いて実験を行った。選択的 mTOR 抑制薬としてラパマイシンを、オートファジー抑制薬として U0126 および Spautin-1 を使用した。方法は Cell proliferation assay により抗腫瘍効果を評価した。ウエスタンブロットでは、mTOR 経路および MAPK 経路のリン酸化の発現と、オートファジー (LC-3、p62、Atg5) およびアポトーシス (PARP、Caspase-3) の発現を評価した。またリアルタイム PCR 法により、siRNA の導入による mTOR 遺伝子のノックダウンを行い、オートファジー関連遺伝子の発現を確認した。更に、オートファジーおよびアポトーシスの発現を、蛍光顕微鏡および電子顕微鏡により、形態学的に評価を行った。また、腫瘍細胞株をヌードマウス皮下に移植し、xenograft による腫瘍モデルを作成し、ラパマイシンおよびオートファジー抑制薬の効果を in vivo の実験で評価した。

4. 研究成果

Cell proliferation assay では、ラパマイシンにより適度な抗腫瘍効果を認め、ラパマイシンにオートファジー抑制薬を併用することで、有意な抗腫瘍効果の増強が確認された(図1)。

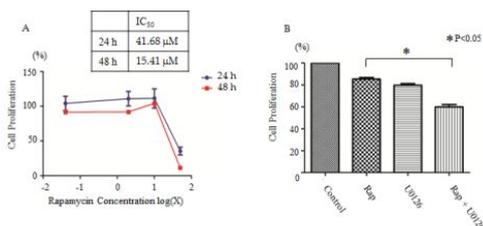


図1. Cell proliferation assay

ウエスタンブロット法では、ラパマイシンの投与により mTOR 経路下流の因子である、p70S6K のリン酸化が抑制され(図2A)、同時に MAPK 経路の下流因子である Erk1/2 のリン酸化が増強された(図2B)。また、同時に LC-3 などオートファジー関連タンパク質の発現も増強された。一方、ラパマイシンと U0126 や Spautin-1 の併用により、アポトーシスに関連する PARP や Caspase-3 などのタンパク質の発現が確認された(図2B)。

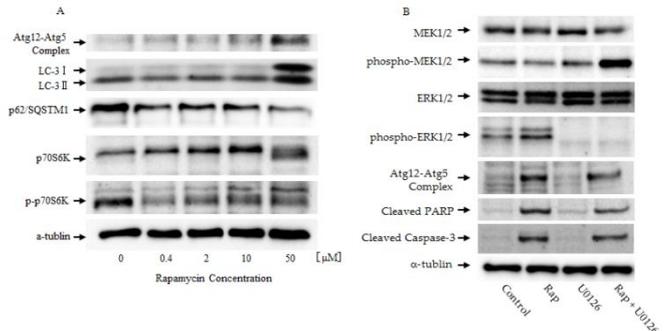


図2. ウエスタンブロットによる評価

リアルタイム PCR 法による遺伝子発現の評価では、mTOR 遺伝子の選択的ノックアウトにより、Atg5 や Beclin-1 といったオートファジー関連遺伝子の発現増強を認めた(図3)。

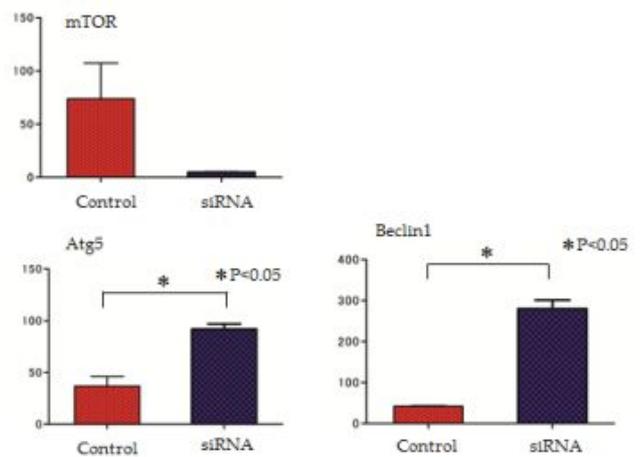


図3. リアルタイム PCR の結果

蛍光顕微鏡による評価では、ラパマイシンの投与により、オートファゴソームの形成を示す GFP-LC3 ドットの発現を細胞内に認め(図4B)、これはオートファジー発現細胞と考えられた。

一方、ラパマイシンとオートファジー抑制薬の併用投与を行うと、アポトーシス細胞を検出する Annexin V 染色によりアポトーシス細胞の増加(図4B)が確認された。

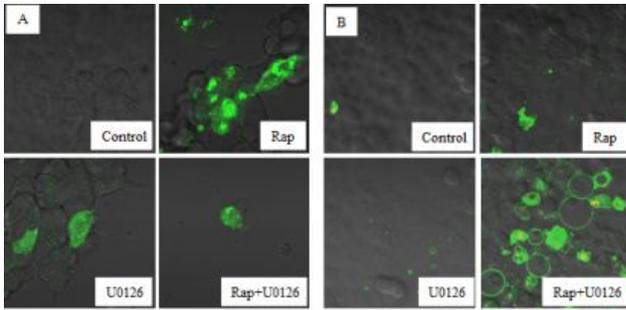


図 4. 蛍光顕微鏡による評価

電子顕微鏡による評価では、ラパマイシンの投与により、オートファゴソームを有した細胞が観察され(図 5A)、ラパマイシンとオートファジー抑制薬の併用により、核の断片化を起こしたアポトーシス細胞(図 5B)が観察された。

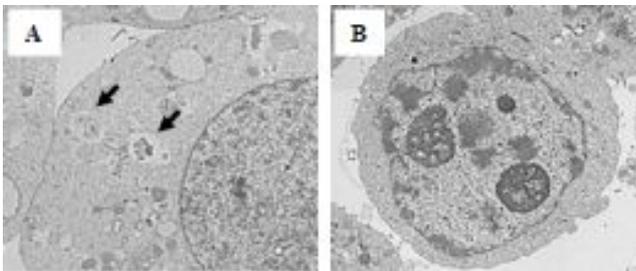


図 5. Nara-H 細胞の電子顕微鏡像

MG63 細胞株をヌードマウス皮下に移植した xenograft による腫瘍モデルでは、ラパマイシンおよびオートファジー抑制薬である Spautin-1 の併用投与により、有意な腫瘍径の縮小を認めた(図 6)。



図 6. MG63 移植による xenograft モデル

本研究の結果から、mTOR 抑制薬により、腫瘍細胞は mTOR 経路を抑制すると同時に MAPK 経路を活性化させ、オートファジーを誘導した。この結果から考察すると、腫瘍細胞が抗腫瘍薬に対する防御的反応として、別の経路を活性化させ、防御的オートファジーを誘導するものと考えられた。一方、このオートファジーの誘導を、オートファジー抑制薬の併用により制御することで、強い抗腫瘍

効果が得られると同時にアポトーシスが誘導された。したがって、選択的オートファジー抑制薬を使用することで、腫瘍の防御反応としてのオートファジーが破たんし、強い抗腫瘍効果が期待できるのではないかと考えられる。

以上のことからまとめると、骨軟部腫瘍細胞において、オートファジーの制御をより効果的に行うことにより、新たな骨軟部肉腫治療の一助になり得るのではないかと考えられた。

参考文献：

Inhibition of induced autophagy increases apoptosis of Nara-H cells. Nakamura O, Hitora T, Akisue T, Kawamoto T, Yamagami Y, Yamamoto T. International Journal of Oncology. 39(6):1545-52, 2011.

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計 2 件)

Nakamura O, Hitora T, Yamagami Y, Mori M, Nishimura H, Horie R, Yamaguchi K, Yamamoto T. The combination of rapamycin and MAPK inhibitors enhances the growth inhibitory effect on Nara-H cells. International Journal of Molecular Medicine. 査読有、33 巻、2014 年、1491-1497 頁. DOI: 10.3892/ijmm.2014.1715

中村修、mTOR シグナル伝達系。南江堂、整形外科、査読無、64 巻 9 号、2013 年、1000 頁。

〔学会発表〕(計 6 件)

中村 修、ヒト悪性組織球腫における、mTOR Signaling pathway の抑制による Autophagy の誘導。日本整形外科学会基礎学術集会 2012 年 10 月 26-27 日、名古屋国際会議場(愛知県名古屋市)

Nakamura O, Autophagy Inhibition Enhances Rapamycin -Induced Apoptosis in Nara-H Cells. 59th Annual Meeting of Orthopaedic Research Society, 2013.1.26-29, San Antonio (USA).

Horie R, mTOR inhibitor Rapamycin induced- autophagy in MG63 cells, January, 2013, 13-16, Venice (Italy).

堀江亮佑、ヒト骨肉腫細胞株における、mTOR 抑制薬とオートファジー抑制薬併用によるアポトーシスの誘導と抗腫瘍効果について。第 46 回日本整形外科学会骨軟部腫瘍学会、2013 年 7 月 11-12 日、東京ドームホテル(東京都)

堀江亮佑、ヒト骨肉腫細胞株におけるオートファジーの役割。第 28 回日本整形外科学会基礎学術集会、2013 年 10 月 17-18 日、幕張メッセ(千葉県幕張市)

Horie R, Apoptosis and anti-tumor effect

induced by mTOR inhibitor and autophagy inhibitor in human osteosarcoma cells. March, 2014, 15-18, New Orleans (USA).

〔図書〕(計0件)
〔産業財産権〕

出願状況(計0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0件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
出願年月日：
取得年月日：
国内外の別：

〔その他〕

<https://kaken.nii.ac.jp/d/r/40532685>

6. 研究組織

(1) 研究代表者：

中村 修 (NAKAMURA Osamu)
香川大学・医学部整形外科・助教
研究者番号：40532685

(2) 連携研究者：

堀江 亮佑 (HORIE Ryouseke)
香川大学・医学部附属病院・病院助教
研究者番号：50645827