

平成 26 年 6 月 7 日現在

機関番号：13501

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2012～2013

課題番号：24791531

研究課題名(和文) 骨肉腫におけるmTORの役割の解明

研究課題名(英文) Elucidation of the role of mTOR in murine osteosarcoma cell line

研究代表者

安藤 隆 (ANDO, Takashi)

山梨大学・医学工学総合研究部・助教

研究者番号：10377492

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,200,000円、(間接経費) 960,000円

研究成果の概要(和文)： mTOR阻害薬(ラパマイシン)はマウス骨肉腫細胞株(LM8)に対し、有意な腫瘍増殖抑制効果を *in vitro*において示した。他の抗癌剤(ゲムシタビン)との併用することにより相加効果がみられた。LM8をC3Hマウスに移植する骨肉腫担癌モデルマウスを使用した *in vivo*実験においてmTOR阻害薬(ラパマイシン)は原発巣の増殖抑制と肺転移の抑制をみた。さらに、*in vitro*と同様に抗癌剤(ゲムシタビン)を併用することによる相加効果がみられた。

研究成果の概要(英文)： mTOR inhibitor (Rapamycin) induced significant tumor growth inhibitory effect on mouse osteosarcoma cell line (LM8) by *in vitro* study as WB assay, WST assay, microscopic analysis and FACS analysis. Additive effect was observed by combining another anticancer agent (gemcitabine). mTOR inhibitor (rapamycin) induced the growth inhibition of primary tumor and suppression of lung metastasis in *in vivo* experiments using the osteosarcoma (LM8) tumor-bearing mouse model transplanted to C3H mice. Furthermore, same additive effect as *in vitro* study with the combination anti-cancer agent (gemcitabine) were observed in this mouse model study.

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・軟部腫瘍学 mTOR 骨肉腫 ゲムシタビン

## 1. 研究開始当初の背景

(1) 骨肉腫は腫瘍細胞が類骨(osteoid)あるいは骨を直接生産する悪性非上皮性腫瘍と定義される。骨肉腫は造血系腫瘍を除いた原発性骨悪性腫瘍の中では最も頻度が高く(23%)、10歳代に好発し男性に多い(全国悪性骨腫瘍登録一覧表 2007)。四肢長管骨(特に膝周囲)に好発し、血行性遠隔転移(特に肺)をきたしやすく予後不良であり、40年前には生存率は10-15%にすぎなかった。手術療法の進歩、系統的化学療法の導入によって60%以上の生存率まで改善している。本邦での全国他施設共同研究プロトコル NEC095-J(当施設も参加)では5年無病生存率76%と世界に誇る成績が達成されている。さらに、2010年2月よりJCOG(Japan Clinical Oncology Group)の骨・軟骨腫瘍グループでJCOG0905というRCT(ランダム化比較試験)が開始されている。本邦で初めて行われる骨肉腫の第相試験であり、非常に期待されるものである。骨・軟骨腫瘍科医として患者さんの治療にあたりとともに、本研究においてmTOR阻害薬の骨肉腫への効果を証明し、将来のRCTに参加することを目標としている。

(2) セリン/スレオニンキナーゼの1つであるmTOR(mammalian target of rapamycin)は1991年にラパマイシンの標的となる300kDのタンパクとして酵母で同定された。mTORは遺伝子の転写、翻訳に直接に働き、細胞分裂、増殖、代謝、血管新生、寿命、細胞死、免疫抑制などを調整し、mTORノックアウトマウスが早期胎生致死を示すことから、生命の根幹を担うタンパクの1つであるとされる。骨肉腫におけるmTORのメカニズムの解析、阻害薬の有用性の研究(Zhou R et al. J Orthop Res. 2011 Jun;29(6):846-52)は開始されたばかりであり、特定の骨肉腫細胞、阻害薬、マウスモデルに限られるものが多い。さらに、小児固形腫瘍に対するmTOR阻害薬の1つであるエベロリムのphase I study(Fouladi M et al. Journal of clinical oncology 2007;25:4806-12.)が行われ、2例の骨肉腫のエントリーがあり1例のSD(8ヵ月)をえたとされるが、他の腫瘍に比較し十分とはいえない。

## 2. 研究の目的

(1) 今回、我々はmTORの骨肉腫における働きを研究し、その阻害薬の新規抗癌剤としての有用性の検討することを目的とする。mTORは細胞の生存・増殖の根幹となるタンパク分子であり、骨肉腫での活性が確認されているPI3K/AKTの下流に位置している。本研究によって骨肉腫腫の増殖および転移におけるmTORおよび標的分子の働きを解明するのが目的であり、本研究は骨肉腫に対する新規分子標的製剤としての可能性を探る点で大きな意義があると考えている。我々は以前、膵臓癌の適応が承認されたばかりの

Gemcitabineを骨肉腫の治療へ使用できるかをin vitroおよびin vivoで検討している(Ando T et al. J Orthop Res 2005;23:964-9.)その後、臨床応用への研究も追従されている(Ray-Coquard et al. Cancer Treat Rev. 2011)。この経験を生かして、骨肉腫に対する新規化学療法および併用療法への可能性を模索していきたい。

(2) 骨肉腫におけるmTORのメカニズムの一部を明らかにすることによって、その制御の可能性を示したい。その成果として、mTOR阻害薬による骨肉腫の新たな予防/治療法の創出が期待できる。10歳代に好発する骨肉腫に対して新たな治療開発していくことは、われわれ医療者、研究者の使命であると考えている。

## 3. 研究の方法

(1) 骨肉腫細胞を培養し、mTOR発現の検討する。

骨肉腫細胞を培養し、mRNAレベルでのmTORの発現をPCR法で定量する。

タンパクレベルでのmTORの発現をWB法で定量する。

細胞密度、FCS濃度を段階的に変化させ、mTORの発現量が変化するか確認する。

mTOR複合体の標的分子(4EBP1, S6K1 AKT, SGK, PKCa)のリン酸化を確認する。標的分子のリン酸化をリン酸化抗体を用いてWB法により定量する。

(2) 骨肉腫細胞へのmTOR阻害薬による抑制効果をin vitroで確認する。

培養骨肉腫細胞に対してmTOR阻害薬(ラパマイシン)を投与し、増殖抑制(WST assay法)をみる。

さらに、アポトーシス・ネクロシス比率をAnnexinVを用いたFACS法にて確認する。

(3) 担癌マウスモデルを使用しmTOR阻害薬による抗腫瘍効果をin vivoで確認

高肺転移マウス骨肉腫細胞株(LM8)をC3Hマウスに移植し、骨肉腫担癌モデルマウスを作製する。

この担癌マウスモデルにmTOR阻害薬(ラパマイシン)をいくつかの投与方法(経口、経静脈、腹腔内)で投与し、マウスの全生存期間(Kaplan-Meier法にて統計学的処理)、腫瘍の増殖抑制効果(大きさの検討、病理による壊死率の検討、TUNEL法で組織内のアポトーシスの確認)、転移予防効果(肺その他の臓器の解剖)を検討する。

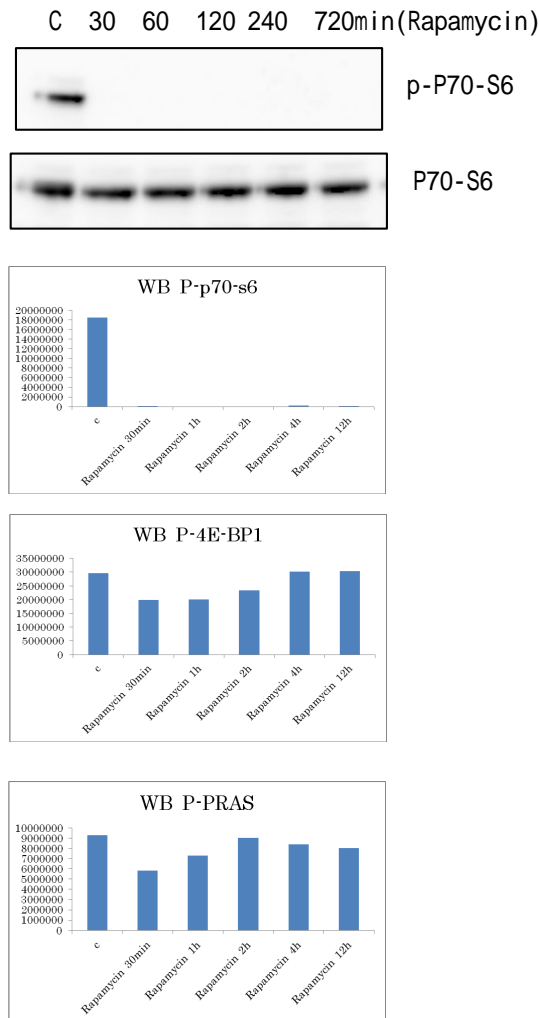
同様の骨肉腫担癌マウスモデルにmTOR阻害薬(ラパマイシン)と他の抗癌剤(ゲムシタピン)を併用し効果を検討した。

## 4. 研究成果

(1) マウス骨肉腫細胞 (LM8) を培養し、mTOR 発現の検討した。

mTOR の発現を通常 PCR 法、および定量 PCR 法で確認した。

タンパクレベルでの mTOR の発現、およびそのリン酸化を WB 法で確認した。また、このリン酸化は mTOR 阻害薬 (ラパマイシン) によって有意に抑制された。その傾向は mTOR 複合体の標的分子の 1 つである P70-S6 で顕著であった (図 1)。



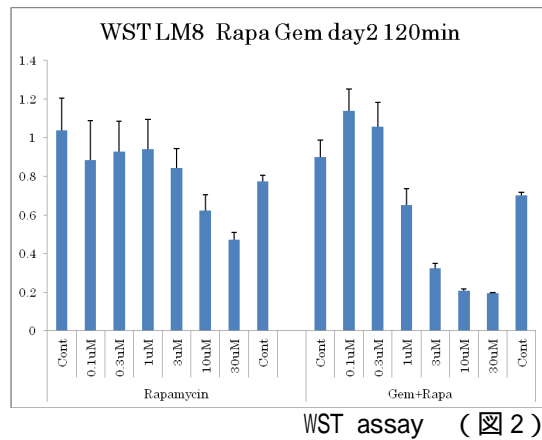
WB assay と解析ソフトによる定量 (図 1)

(2) 骨肉腫細胞への mTOR 阻害薬による抑制効果を in vitro で確認した。

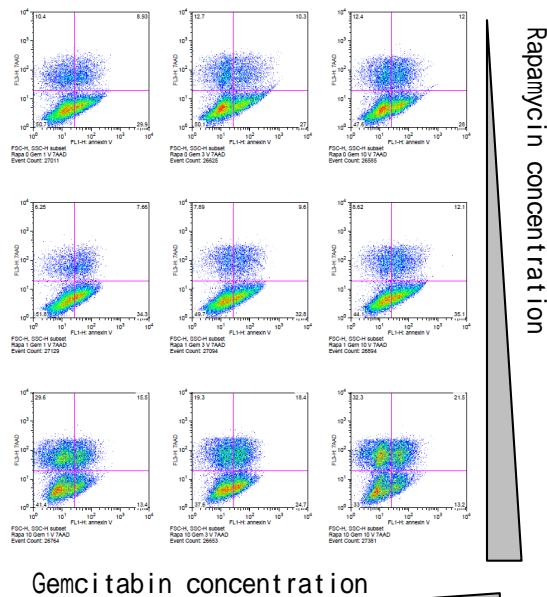
培養骨肉腫細胞に対して mTOR 阻害薬 (ラパマイシン) を投与し、増殖抑制 (WST assay 法) をみた。その結果、mTOR 阻害薬 (ラパマイシン) による増殖抑制効果が確認でき、また、ゲムシタピン併用投与による相加効果も見られた (図 2)。

さらに、アポトーシス・ネクローシス比率を AnnexinV を用いた FACS 法にて確認した。その結果、mTOR 阻害薬 (ラパマイシン) はネクローシス方向に進む細胞死、ゲムシタピンはアポトーシスに向かう細胞死が多くみられた。FACS analysis による確認 (図 3) と

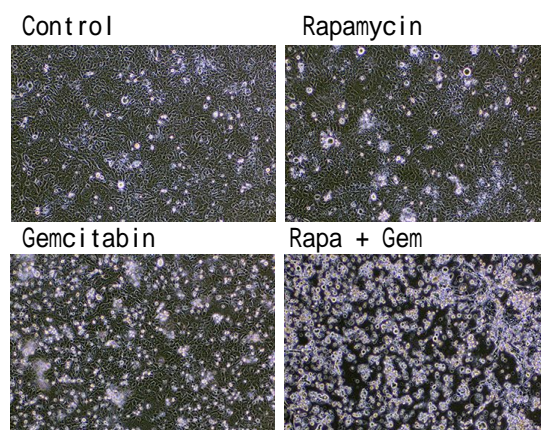
顕微鏡による確認を行った (図 4)。



WST assay (図 2)



FACS analysis (図 3)



(図 4)

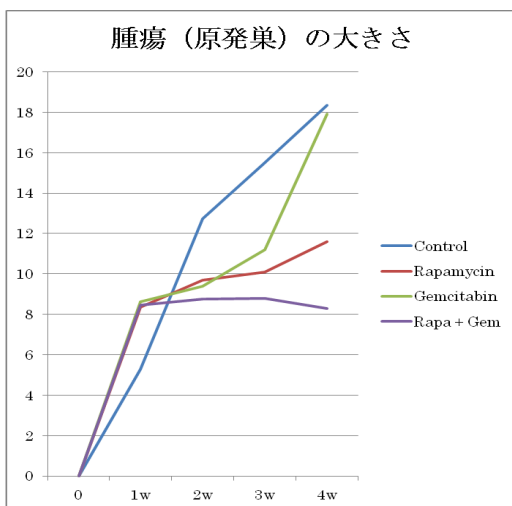
(3) 担癌マウスモデルを使用し mTOR 阻害薬による抗腫瘍効果を in vivo で確認した。

高肺転移マウス骨肉腫細胞株 (LM8) を C3H マウスに移植し、骨肉腫担癌モデルマウスを作製した。

この担癌マウスモデルに mTOR 阻害薬 (ラパマイシン) をいくつかの投与方法 (経口、

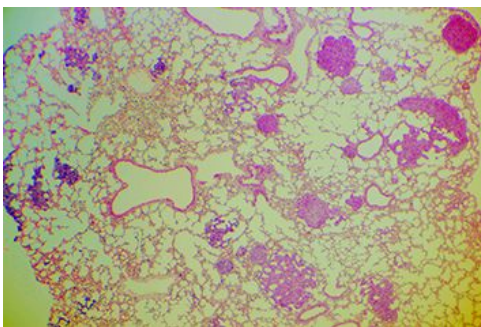
経静脈、腹腔内)で投与し、マウスの全生存期間、腫瘍の増殖抑制効果、転移予防効果(肺その他の臓器の解剖)を検討した。

同様の骨肉腫担癌マウスモデルに mTOR 阻害薬(ラパマイシン)と他の抗癌剤(ゲムシタピン)を併用し効果を検討した。その結果、mTOR 阻害薬(ラパマイシン)によって、明らかな原発巣の増大抑制効果がみられた(図5)。さらに、他の抗癌剤(ゲムシタピン)を併用したところ、相加効果を見た。また、転移巣である肺の組織の染色においても、mTOR 阻害薬(ラパマイシン)による転移抑制効果、また、他の抗癌剤(ゲムシタピン)との併用による相加効果もみられた(図6)。

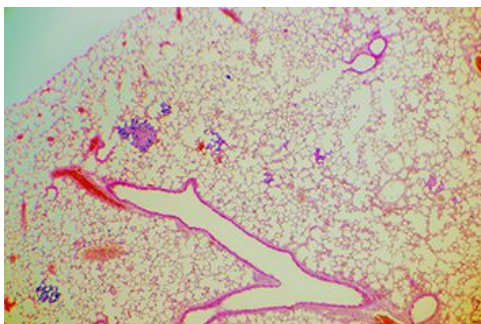


(図5)

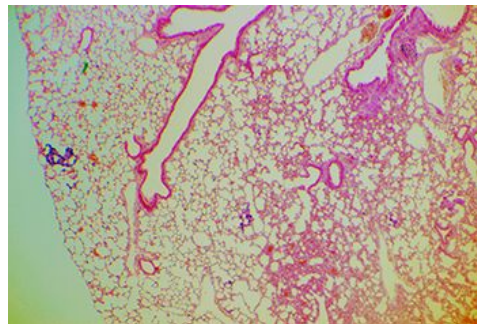
Control



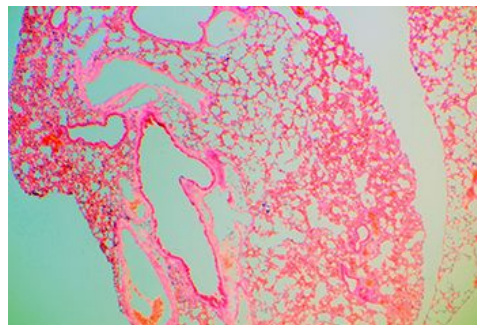
Rapamycin



Gemcitabine



Rapa + Gem



肺の HE 染色 (図6)

以上の結果より、mTOR 阻害薬(ラパマイシン)はマウス骨肉腫細胞株(LM8)に対し、有意な腫瘍増殖抑制効果を in vitro および in vivo において示した。この効果は、他の抗癌剤(ゲムシタピン)との併用することによってより顕著となる。今後も、mTOR 阻害薬の骨肉腫への効果、メカニズムを解析することによって新規抗癌剤としての可能性を探りたい。

#### 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4件)

Ohba T, Cole HA, Cates JM, Slosky DA, Haro H, Ando T, Schwartz HS, Schoenecker JG. Bisphosphonates Inhibit Osteosarcoma-Mediated Osteolysis Via Attenuation of Tumor Expression of MCP-1 and RANKL. J Bone Miner Res 2014. Apr 23. (査読あり)

Ohba T, Cates JM, Cole HA, Slosky DA, Haro H, Ichikawa J, Ando T, Schwartz HS, Schoenecker JG. Pleiotropic effects of bisphosphonates on osteosarcoma. Bone 2014;63:110-120. (査読あり)

Ohba T, Cates JM, Cole HA, Slosky DA, Haro H, Ando T, Schwartz HS, Schoenecker JG. Autocrine VEGF/VEGFR1 Signaling in a Subpopulation of Cells Associates with



Aggressive Osteosarcoma. Mol Cancer Res  
2014. Jan 20. (査読あり)

Zhu Y, Ohba T, Ando T, Fujita K, Koyama  
K, Nakamura Y, Katoh R, Haro H, Nakao A.  
Endogenous TGF-beta activity limits TSLP  
expression in the intervertebral disc  
tissue by suppressing NF-kappaB  
activation. Journal of orthopaedic  
research. 2013;31:1144-1149. (査読あり)

〔学会発表〕(計4件)

安藤隆、市川二郎、佐藤信隆、大北弦樹、  
若生政憲、波呂浩孝：“骨肉腫細胞株に対す  
る mTOR 阻害剤 (Rapamycin) と DNA 合成阻  
害剤 (Gemcitabin) の併用による抗腫瘍効  
果についての検討 第 47 回日本整形外科学  
会骨・軟部腫瘍学術集会 (2014.07.17-18)、  
大阪国際会議場 (大阪市)

市川二郎、Schoenecker Jonathan  
Schwartz Herbert、安藤隆、佐藤栄一、波呂  
浩孝：“骨肉腫細胞でのトロンピン産生能と  
トロンピンへの応答性 第 87 回日本整形外  
科学会学術集会 (2014.05.22-24)、神戸国際  
会議場 (神戸市)

安藤隆、佐藤栄一、市川二郎、若生政憲、  
大北弦樹、佐藤信隆、落合聡司、萩野哲男、  
波呂浩孝：“Hylan G-F20 は軟骨細胞の分化  
を促進し、変性を抑制する 第 27 回日本軟  
骨代謝学会 (2014.02.28-03.01) 京都医師  
会館 (京都市)

安藤隆、市川二郎、大場哲郎、佐藤信  
隆、大北弦樹、波呂浩孝：“マウス骨芽細  
胞への Thrombin 刺激は MCP-1 を発現させマ  
クロファージの遊走を促進させる 第 28  
回日本整形外科学会基礎学術集会  
(2013.10.17-18)、幕張メッセ (千葉市)

〔その他〕

ホームページ等

<http://www.med.yamanashi.ac.jp/clinical/orthop/research.html>

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

安藤 隆 (ANDO Takashi)

山梨大学・医学工学総合研究部

・助教

研究者番号：10377492

### (2) 研究分担者

なし

### (3) 研究協力者

波呂 浩孝 (HARO Hirotaka)

山梨大学・医学工学総合研究部

・教授

研究者番号：10313264

佐藤 信隆 (SATO Nobutaka)

山梨大学・医学工学総合研究部

・助教

研究者番号：00418716