

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 6 月 18 日現在

機関番号：15401

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2013～2014

課題番号：25861322

研究課題名(和文)骨肉腫に対するテロメラーゼ阻害剤を用いた新たな薬物療法

研究課題名(英文) Novel Medical therapy using Telomerase Inhibitor TMPyP4 for Osteosarcoma

研究代表者

藤森 淳 (Fujimori, Jun)

広島大学・大学院医歯薬保健学研究院(医)・寄附講座助教

研究者番号：70632256

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 1,000,000円

研究成果の概要(和文)：テロメラーゼ阻害剤TMPyP4による骨肉腫細胞への抗腫瘍効果を検討した。テロメラーゼ活性を有する細胞では、活性抑制およびテロメア長の十分な短縮が細胞増殖抑制に関与していると考えた。活性のない長いテロメアを有する細胞に対して、TMPyP4はテロメア短縮作用を認めなかったが、有意な細胞増殖抑制を示したことより、テロメア長とは独立したDNA損傷作用を有すると考えた。本研究により、テロメア形態の異なる骨肉腫細胞株に対するTMPyP4単剤での抗腫瘍効果が証明され、TMPyP4などのテロメラーゼ阻害剤が、肉腫治療の新たなストラテジーとなる可能性が示唆された。

研究成果の概要(英文)：In this study, we investigated the antitumor effects of telomerase inhibitor TMPyP4 in osteosarcoma cell lines. Both telomerase activity loss and sufficient telomere shortening are necessary to inhibit cell growth in telomerase positive cells. TMPyP4 did not induce telomere shortening but significantly inhibited the growth in extremely longer telomere-cells, indicating the antitumor effect of TMPyP4 may be related to DNA damage, independent on telomere length. Our results may indicate telomerase inhibitors such as TMPyP4 are novel adjuvant therapy for osteosarcoma patients in the near future.

研究分野：骨軟部腫瘍

キーワード：テロメラーゼ阻害剤 テロメア 骨肉腫

1. 研究開始当初の背景

近年骨・軟部悪性腫瘍(肉腫)に対しては、化学療法の進歩、治療技術の向上により生命予後の改善がみられている。しかし多くの肉腫では、抗がん剤や放射線に対する感受性に乏しく、肺転移などには、既存の治療法では対処できず、満足のいく治療効果を得ていないのが現状である。よって従来の治療法に抵抗のある骨・軟部悪性腫瘍(肉腫)に対する新たな治療法の開発が切望されている。

ヒトのテロメア DNA は短い塩基配列の単位が多数繰り返す特殊構造であり、正常細胞では DNA 複製に伴い 50-200 塩基ずつ染色体の末端テロメアが短縮する現象が観察されている。これに対し、テロメラーゼは染色体末端に存在するテロメア繰り返し配列を *de novo* に付加伸長する特殊な逆転写酵素である。癌細胞ではテロメラーゼを発現することにより増殖能および不死化を獲得していることが知られている。一方、肉腫におけるテロメア維持機構は癌腫とは異なり、テロメラーゼに依存しないテロメア維持機構 (alternative lengthening of telomeres: ALT) の存在が報告されている。また非常に不均質で、テロメラーゼ活性によるもの、ALT によるもの、それらの共存したもの等多種多様であることがわかっている。

テロメラーゼ阻害剤は癌細胞を有限分裂寿命化し、死滅させることができるものと考えられており、新たな抗癌剤として注目されている。テロメラーゼ阻害剤の、多種多様なテロメア形態を示す肉腫細胞に対する作用および効果は十分には解明されていない。テロメラーゼ阻害剤 TMPyP4 はテロメア 4 重鎖のコア部分で G カルテットにスタッキングすることによりテロメア 4 重鎖に強く結合してテロメラーゼを阻害するポルフィリン化合物で、直接的にテロメアに作用、急速にテロメア短縮を起こす効果を持つとされている。特に ALT 肉腫では非常に長いテロメ

アを有しており最終的にテロメア機能を失うまでに長期間を要するため、テロメラーゼを直接のターゲットとせずテロメアを急速に短縮させる阻害剤の方が有効であると考え本研究では TMPyP4 を用いた。本研究でテロメラーゼ阻害剤 TMPyP4 による骨肉腫細胞株への抗腫瘍効果を評価することで、骨・軟部悪性腫瘍に対する新たな薬物療法の開発が可能になると考えた。

2. 研究の目的

in vitro でテロメラーゼ阻害剤 TMPyP4 の骨肉腫細胞株に対するテロメラーゼ活性、テロメア長への影響および抗腫瘍効果を評価する。TMPyP4 をマウス肉腫モデルに投与し、抗腫瘍効果、テロメア・テロメラーゼへの影響を検討する。以上を本研究の目的とした。

3. 研究の方法

(1) *in vitro* での骨肉腫細胞に対する TMPyP4 の抗腫瘍効果

概要：それぞれに異なるテロメア形態を呈する 4 種類のヒト由来骨肉腫細胞 (HOS, SaOS2, MG63, U2OS) 5×10^3 個に TMPyP4 治療 (50 μ M もしくは 100 μ M) を行い、48 時間もしくは 96 時間後に評価を行なった。HOS はテロメラーゼ活性を有する ALT ではない細胞、SaOS2 と MG63 はテロメラーゼ活性を有する ALT 細胞、U2OS はテロメラーゼ活性がない ALT 細胞である。

テロメラーゼ活性の測定：Telomeric Repeat Amplification Protocol (TRAP) 法に準じて TRAPeze XL Telomerase Detection Kit (Chemicon, Temecula, CA) を用いて測定した。 10^5 個の骨肉腫細胞を CHAPS 溶液に溶解し、遠心分離の後、上澄み液に TRAPeze XL reaction mixture を加え、72°C / 3 分の extension step の後、94°C / 30 秒、59°C / 30 秒、72°C / 1 分を 36 サイクルで PCR を行なった。PCR 後に吸光度測定を行い (SPACTRA

MAX 190, Molecular Devices, Sunnyvale, CA)活性値を測定した。

テロメア長の測定：テロメア長は TeloTAGGG Telomere Length Assay (Roche, Mannheim, Germany)を用いてサザンブロットで測定した。抽出した DNA 4 μ g に HinfI/RsaI を加え、0.8% アガロースゲルを用いて電気泳動を行なった。ハイボンド N フィルター (Amersham, Buckinghamshire, UK)に移行させてジゴキシゲニンラベルテロメリックプローブを用いてハイブリダイゼーションを行なった。フィルターと Fuji New RX film (Fuji Film, Tokyo, Japan)を感光させ、Canoscan 600 (Canon, Tokyo, Japan)を用いてテロメア長を計測した。

MTT アッセイ：細胞を培養し、3-(4,5)-dimethylthiazolyl-2,5-diphenyltetrazolium bromide (MTT)標識試薬 (終濃度 0.5 mg/ml) を加え、インキュベーションを行なった。可溶化溶液を加え、一晚処理を行なった後、マイクロタイタープレートリーダーを用い 570 nm 波長でサンプルの吸光度を測定した。

アポトーシスの測定：Annexin V-FITC Apoptosis Detection kit (Oncogene Research Products, San Diego, CA)を用いて測定した。細胞を 96 時間 50 μ M もしくは 100 μ M の TMPyP4 とともに培養した後、 1×10^5 細胞を採取し緩衝液に混ぜ Annexin V-FITC およびヨウ化プロピジウムを加えた。蛍光顕微鏡を用いて、染色された細胞と全細胞数との比率を計測した。

(2) マウス骨肉腫モデルに対する TMPyP4 の抗腫瘍効果

ネンブータル麻酔を行い、生後 9 週齢ヌードマウスの脛骨内に骨肉腫細胞 (U2OS, SaOS2, HOS, MG63)を 1×10^5 cells/mouse 移植する。麻酔下に安楽死させ、隔週で腫瘍サイズおよび肺転移数を確認し評価する。

抗腫瘍効果：腫瘍移植 2 週間目に、

TMPyP4 を尾静脈より投与する。TMPyP4 による治療の効果を評価するため、以下の 2 群を作成する。

A 群：TMPyP4 を投与した群。

B 群：生食投与群。

(TMPyP4 投与量は 20 μ g/mouse とする。) 経時的に腫瘍サイズ、肺転移個数 (X 線撮影) を観察する。隔週で腫瘍増殖倍率の計測、組織学的評価を行い、生存曲線も作成する。また肺、肝臓、腎臓、精巣などを採取し組織評価を行う。腫瘍組織のテロメラーゼ活性、テロメア長を測定する (前述の方法に準ずる)。各群とも 5 匹を使用し、経時的に腫瘍サイズ、肺転移個数 (X 線撮影) を観察する。隔週に屠殺し腫瘍増殖倍率の計測、組織学的評価 (H&E 染色) を行い、生存曲線も作成する。また肺、肝臓、腎臓、精巣などを採取し、組織評価を行う。腫瘍組織のテロメア長、テロメラーゼ活性を測定する。

4. 研究成果

(1) テロメラーゼ活性：TMPyP4 を 50 μ M 投与し 96 時間後に評価した。HOS ($p = 0.0001$, コントロール群と比較して活性は 36.6% に低下) (図 1) および SaOS2 ($p = 0.0003$, 66.6%) (図 2) で有意なテロメラーゼ活性の阻害を認めしたが、MG63 では有意差を認めなかった ($p = 0.109$, 83.6%) 。

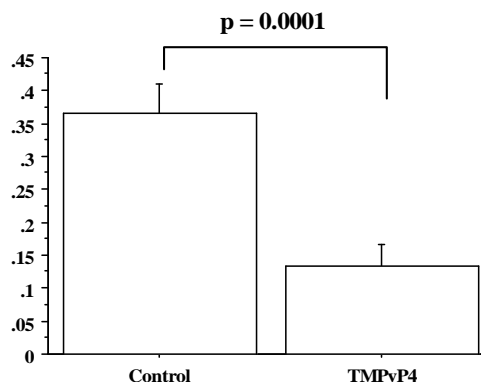


図 1：HOS の TMPyP4 による有意なテロメラーゼ活性の低下

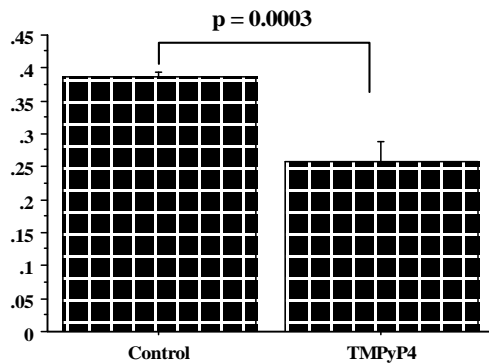


図2：SaOS2のTMPyP4による有意なテロメラーゼ活性の低下

(2)テロメア長：TMPyP4投与後96時間後にテロメア長を測定したところ、HOS (TMPyP4投与量 50 μ M: $p = 0.0045$, 100 μ M: $p = 0.021$), SaOS2 (50 μ M: $p = 0.0029$, 100 μ M: $p = 0.0029$) (図3) および MG63 (50 μ M: $p = 0.0217$, 100 μ M: $p = 0.0185$) (図4) で有意なテロメア長の短縮を認めた。U2OS細胞 (50 μ M: $p = 0.158$, 100 μ M: $p = 0.103$) では有意な短縮は認められなかった。HOSの無治療群のテロメア長は 7.22 ± 0.18 kbで、50 μ Mでの治療後のテロメア長は 5.52 ± 0.02 kb, 100 μ Mでの治療後は 5.60 ± 0.54 kbであった。SaOS2の無治療群のテロメア長は 11.9 ± 1.19 kbで、50 μ Mでの治療後のテロメア長は 4.88 ± 1.04 kb, 100 μ Mでの治療後は 4.00 ± 0.68 kbであった。MG63の無治療群のテロメア長は 13.8 ± 0.52 kbで、50 μ Mでの治療後のテロメア長は 10.7 ± 0.33 kb, 100 μ Mでの治療後は 9.89 ± 0.45 kbであった。U2OSの無治療群のテロメア長は 39.9 ± 2.19 kbで、50 μ Mでの治療後のテロメア長は 39.7 ± 2.20 kb, 100 μ Mでの治療後は 37.6 ± 1.13 kbであった。

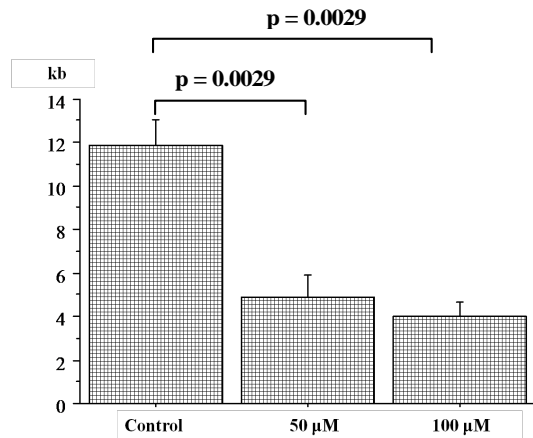


図3：SaOS2のTMPyP4による有意なテロメア長の短縮

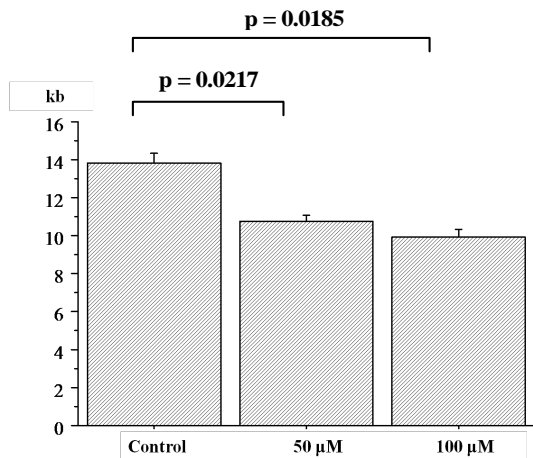


図4：MG63の有意なテロメア長の短縮

(3)抗腫瘍効果：50 μ M TMPyP4投与後48時間および96時間後に抗腫瘍効果を確認したところ、HOS (48時間: $p = 0.0045$, 96時間: $p = 0.0001$), SaOS2 (48時間: $p < 0.0001$, 96時間: $p = 0.0003$) および U2OS (48時間: $p = 0.0164$, 96時間: $p = 0.0003$) で、有意な増殖抑制効果を認めしたが、MG63 (48時間: $p = 0.0069$, 96時間: $p = 0.109$) では96時間で有意差を認めなかった(図5-8)。また、50 μ M TMPyP4投与後96時間でのアポトーシスの割合はHOSで17.1%, SaOS2で14.5%, MG63で7.1% U2OSで17.7%であった。100 μ M TMPyP4投与後96時間でのアポトーシスの割合はHOSで26.1%, SaOS2で17.8%, MG63で9.1% U2OSで22.6%であった。

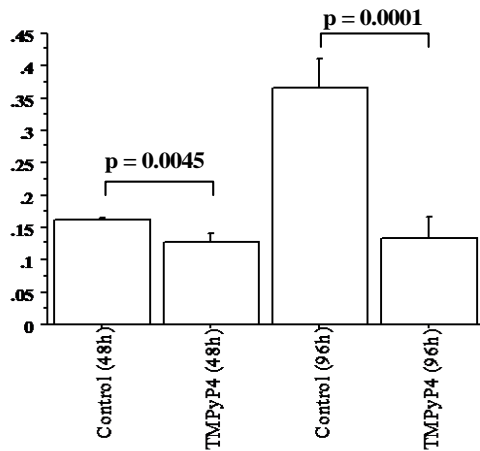


図5：HOSのTMPyP4による増殖抑制効果

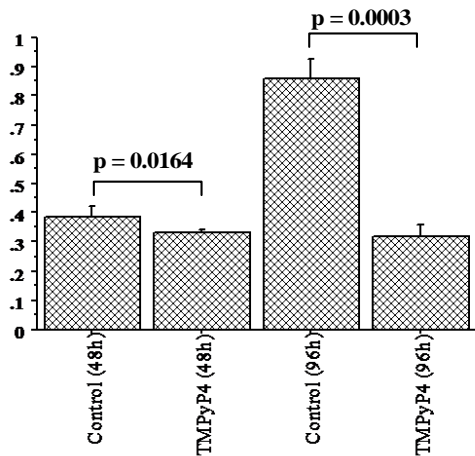


図8：U2OSのTMPyP4による増殖抑制効果

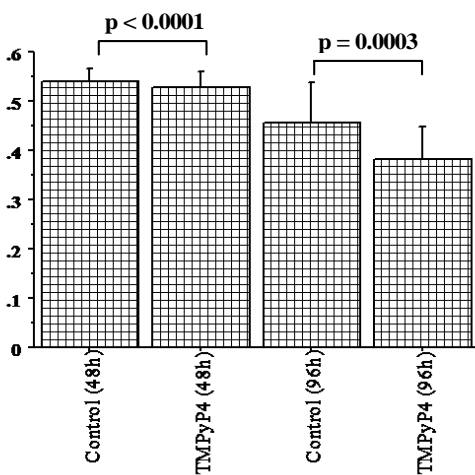


図6：SaOS2のTMPyP4による増殖抑制効果

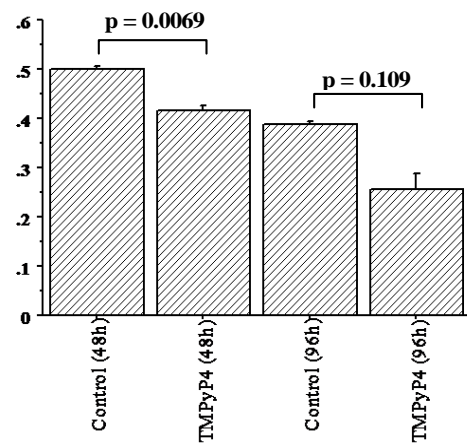


図7：MG63のTMPyP4による増殖抑制効果

(4) 総合評価：HOS と SaOS2 では TMPyP4 により有意なテロメラーゼ活性の低下およびテロメア長の短縮を呈し、有意な抗腫瘍効果を認めた。しかし MG63 では有意なテロメア長の短縮を認めたが、テロメラーゼ活性の低下および抗腫瘍効果を認めなかった。テロメラーゼ活性を有する骨肉腫細胞において、有意なテロメラーゼ活性およびテロメア長短縮をきたすことが効果的な治療に必要であると考えられる。治療後のテロメア長は、HOS で 6 kb 未満で、SaOS2 で 5 kb 未満、MG63 では 9.89 および 10.7 kb であった。多くの正常細胞では 5 kb 程度にテロメアが短縮すると増殖を停止する。骨肉腫細胞においても、増殖抑制に 6 kb 程度のテロメア短縮が必要である可能性がある。U2OS は、テロメラーゼ活性がなく、テロメア長の非常に長い細胞である。TMPyP4 により、テロメア長の有意な短縮を起こすことができなかったが、有意な抗腫瘍効果を認めた。この結果より TMPyP4 はテロメア長を短縮させなくても、腫瘍細胞の DNA 損傷によるテロメア機能不全を起こす作用が肉腫には働く可能性があると考えられる。骨肉腫に代表される肉腫の治療成績向上のためには、有効性が高く副作用の少ない新治療薬が切望されている。本研究により、テロメア形態の異なる骨肉腫細胞株に対する TMPyP4 単剤での抗腫瘍効果が証明され、肉腫

治療の新たな戦略となる可能性が示唆された。継続して、in vivoでのTMPyP4の肉腫に対する抗腫瘍効果，副作用の有無の確認および治療の有用性に関して研究する予定である。

6．研究組織

(1)研究代表者

藤森 淳 (Fujimori Jun)

広島大学・大学院医歯薬保健学研究院・

寄附講座助教

研究者番号：70632256

(4)研究協力者

下瀬 省二 (SHIMOSE SHOUJI)

広島大学・大学院医歯薬学総合研究科・准

教授

研究者番号：30304439

久保 忠彦 (KUBO TADAHIKO)

広島大学・病院・講師

研究者番号：70397959