

**科学研究費助成事業 研究成果報告書**

平成 29 年 5 月 30 日現在

機関番号：24303

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2014～2016

課題番号：26462273

研究課題名(和文) 肉腫に対する熱ストレス蛋白抑制技術を用いた断端処理方法の開発

研究課題名(英文) Development of stump treatment method using heat shock protein inhibition technique for sarcoma

研究代表者

寺内 竜 (Terauchi, Ryu)

京都府立医科大学・医学(系)研究科(研究院)・講師

研究者番号：20575154

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,700,000円

研究成果の概要(和文)：Heat shock protein70 (Hsp70) は、がん細胞内に高率に発現しており、抗がん剤の治療効果を減弱させることで、予後を悪化させる。本研究では骨肉腫細胞株に発現するHsp70を抑制することによってシスプラチンの効果を増強できるかどうかを検討した。Hsp70の抑制条件下でシスプラチンを投与すると、シスプラチンの抗腫瘍効果が有意に増強した。この結果から、Hsp70の抑制は骨肉腫に対する化学療法の新しい補助療法となる可能性が示唆された。

研究成果の概要(英文)：Heat shock protein 70 (Hsp70) is expressed at high levels in cancer cells and attenuates the therapeutic efficacy of anticancer agents, resulting in a poorer prognosis. The objective of this study was to investigate if inhibition of Hsp70 expression in cultured osteosarcoma cells might enhance sensitivity of the cells to cisplatin. When cisplatin was administered under the inhibitory condition of Hsp70, the antitumor effect of cisplatin was significantly enhanced. This result suggested that suppression of Hsp70 could be a new adjuvant therapy for chemotherapy for osteosarcoma.

研究分野：骨軟部腫瘍学

キーワード：骨肉腫 heat shock protein 70 化学療法 シスプラチン アポトーシス

### 1. 研究開始当初の背景

骨肉腫や軟部肉腫に対する手術の際に、切断端に腫瘍細胞が残存すると再発のリスクは上昇し、生存率も低下する。このため手術では腫瘍細胞が残存しないように確実に切除する必要があるが、切除範囲の拡大は患肢機能温存を困難にする。一方、骨肉腫などの肉腫では高率に熱ショックタンパク質(Heat shock protein; Hsp)が発現しており、抗がん剤や温熱療法の治療効果を減弱させている。手術断端での残存腫瘍細胞における Hsp の発現を抑制できれば、術後化学療法や局所温熱療法の効果を高め、局所再発のリスクを減少させるだけでなく、近傍の神経血管束が温存可能となり、患肢機能の温存も期待出来る。

### 2. 研究の目的

悪性腫瘍では Hsp が高発現しており、腫瘍に対する化学療法や温熱療法の効果を減弱させる要因と考えられていることに注目した。本研究の目的は、骨軟部肉腫細胞における Hsp の発現を確認し、高発現する Hsp を siRNA で抑制することにより、化学療法や温熱療法の治療効果を増強させることができるかを検討することである。

### 3. 研究の方法

今回の研究では数ある Hsp ファミリーの中で、我々が長年研究を行ってきた Hsp70 をターゲットとした。ヒト骨肉腫細胞における Hsp70 の役割を検討した。

骨肉腫細胞における Hsp70 の発現、ストレス曝露条件下の Hsp70 の発現変化  
ヒト骨肉腫細胞株の SaOS2, MG63 を使用して温熱刺激 (37 ~ 45 ) やシスプラチン (CDDP:0 ~ 50 $\mu$ M) による物理・化学的ストレスを加え、Hsp70 の発現変化を real-time RT-PCR 法、Western Blotting 法で確認した。

#### siRNA を用いた Hsp70 の抑制

細胞に発現する Hsp70 の特異的抑制法として siRNA を用いて実験を行った。その抑制効果を real-time RT-PCR 法と Western Blotting 法で確認した。

Hsp70 抑制条件下での抗腫瘍効果の変化  
siRNA で Hsp70 を抑制させた後、温熱刺激や CDDP を添加し、Hsp70 非抑制群との cell viability の変化と IC50 (50%阻害濃度) を比較検討した。

#### アポトーシスに関する検討

がんにおける抗腫瘍効果はがん細胞にアポトーシスを誘導することによって生じる。Hsp70 の抑制と CDDP の併用によるアポトーシス誘導効果をミトコンドリア膜電位の変化、カスパーゼ 3 の変化、TUNEL 陽性細胞率の変化で評価した。

### 4. 研究成果

温熱刺激, CDDP 添加による Hsp70 の発現変化

45 の温熱刺激で Hsp70 の発現が著明に上昇した (図 1)。また, CDDP に関しては濃度依存性に Hsp70 の発現が増加した (図 2)。

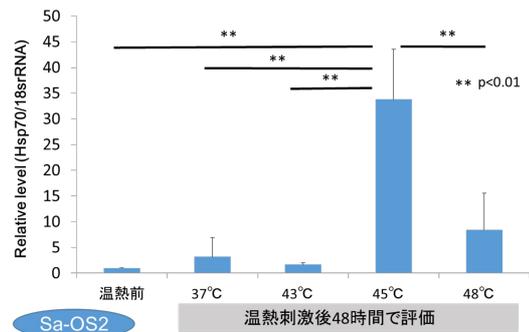


図 1

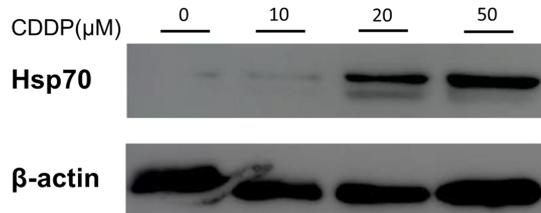


図 2

#### siRNA による Hsp70 の抑制

CDDP 非添加群だけでなく, CDDP 添加群においても siRNA で Hsp70 が抑制できることがわかった (図 3)。

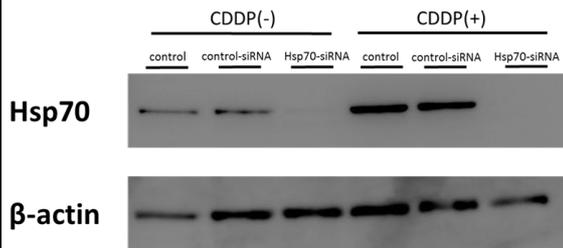


図 3

Hsp70 抑制条件下での抗腫瘍効果の変化  
温熱刺激に関しては, Hsp70 抑制群で 45 における cell viability が有意に低下した (図 4)。CDDP に関しては, Hsp70 抑制群で CDDP の抗腫瘍効果が増強した (図 5)。

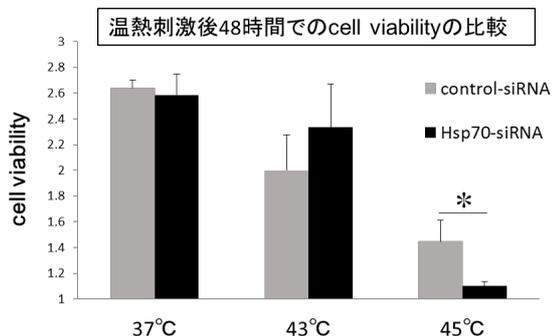


図 4

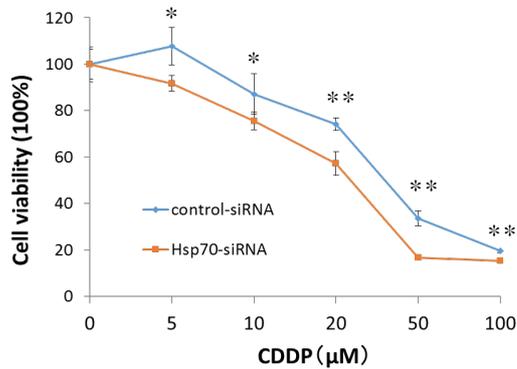


図 5

#### アポトーシスに関する検討

CDDPとHsp70抑制の併用によるアポトーシス誘導効果を評価した。

CDDPの添加によってアポトーシス関連因子が上昇した。Hsp70の抑制条件下で最もその上昇が高かった。図6はカスパーゼ3活性の結果であるが、ミトコンドリア膜電位の低下やTUNEL陽性細胞率の上昇も同様の結果であった。

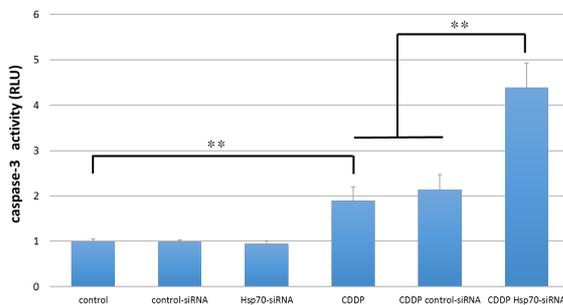


図 6

本研究の結果から骨肉腫においてHsp70の発現を抑制することで温熱療法やシスプラチンの増感効果を得られることが判明した。Hsp70の抑制は骨肉腫に対する化学療法の新しい補助療法となる可能性が示唆された。上記の知見を臨床応用するため、in vivoにおける増感作用の有無を検討中である。

#### 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 3 件)

1. Mori Y, Terauchi R, Shirai T, Tsuchida S, Mizoshiri N, Arai Y, Kishida T, Fujiwara H, Mazda O, Kubo T. Suppression of heat shock protein 70 by siRNA enhances the antitumor effects of cisplatin in cultured human osteosarcoma cells. *Cell Stress and Chaperones* (査読あり) 2017 ; doi 10.1007/s12192-017-0793-x
2. Shirai T, Tsuchiya H, Terauchi R, Tsuchida S, Mizoshiri N, Igarashi K, Miwa S, Takeuchi A,

Kimura H, Hayashi K, Yamamoto N, Kubo T. The outcomes of reconstruction using frozen autograft combined with iodine-coated implants for malignant bone tumors: compared with non-coated implants. *Jpn J Clin Oncol.* (査読あり) 2016Aug;46(8):735-40.doi: 10.1093/jjco/hyw065.

3. Mizoshiri N, Kishida T, Yamamoto K, Shirai T, Terauchi R, Tsuchida S, Mori Y, Ejima A, Sato Y, Arai Y, Fujiwara H, Yamamoto T, Kanamura N, Mazda O, Kubo T. Transduction of Oct6 or Oct9 gene concomitant with Myc family gene induced osteoblast-like phenotypic conversion in normal human fibroblasts. *Biochemical and biophysical research communications* (査読あり) 467:1110-1116.doi:10.1016/j.bbrc.2015.10.098

[学会発表](計 11 件)

1. Mori Y, Terauchi R, Shirai T, Tsuchida S, Mizoshiri N, Arai Y, Mazda O, Kubo T. The anti-tumor effect of chemotherapy on human osteosarcoma cell line in combination with suppression of heat shock protein. ORS 2017 Annual Meeting: 2017/3/20-21, San Diego, U.S.A.
2. Terauchi R, Shirai T, Tsuchida S, Mizoshiri N, Mori Y, Kubo T. GEMCITABINE AND DOCETAXEL CHEMOTHERAPY FOR METASTASIS OF SARCOMA. 2016 CTOS (The Connective Tissue Oncology Society) Annual Meeting: 2016/11/9-12, Lisbon, Portugal.
3. 森 裕貴, 寺内 竜, 白井寿治, 土田真嗣, 溝尻直毅, 新井祐志, 松田 修, 久保俊一. 骨肉腫細胞株に対する化学療法と熱タンパク抑制法を併用した抗腫瘍効果の検討. 第31回日本整形外科学会基礎学術集会: 2016/10/13-14. 福岡
4. Mori Y, Terauchi R, Shirai T, Tsuchida S, Mizoshiri N, Arai Y, Mazda O, Kubo T. The anti-tumor effect of chemotherapy on human osteosarcoma cell line in combination with suppression of heat shock protein. EUROPEAN ORTHOPAEDIC RESEARCH SOCIETY 24th ANNUAL MEETING: 2016/9/14-16, Bologna, Italy.
5. 森 裕貴, 寺内 竜, 白井寿治, 土田真嗣, 溝尻直毅, 新井祐志, 松田 修, 久保俊一. 骨肉腫細胞株に対する化学療法と熱タンパク抑制法を併用した抗腫瘍効果の検討. 第49回日本整形外科学会骨・軟部腫瘍学術集会: 2016/7/14-15. 東京
6. Shirai T, Terauchi R, Tsuchida S, Mizoshiri N, Mori Y, Kubo T. Evaluation of long-term outcomes of megaprosthesis replacement for bone tumors: over 20 years follow-up. 11th Asian Pacific Musculoskeletal Tumor Society: 2016/4/21-23, Singapore
7. Shirai T, Tsuchiya H, Terauchi R, Miwa S,

Takeuchi A, Kimura H, Hayashi K, Yamamoto N, Kubo T. The outcome of frozen autograft using iodine-coated implants: comparison with non-coated implants. AAOS2016 American Academy of Orthopedic Surgery Annual Meeting: 2016/3/1-5, Orland, U.S.A.

8. 森 裕貴,寺内 竜,白井寿治,土田真嗣,溝尻直毅,新井祐志,松田 修,久保俊一. 骨肉腫細胞株に対する温熱療法と熱タンパク抑制法を併用した抗腫瘍効果の検討. 第30回日本整形外科学会基礎学術集会: 2015/10/22-23. 富山
9. 溝尻直毅,白井寿治,寺内 竜,土田真嗣,新井祐志,久保俊一. 骨肉腫細胞株におけるCD81の役割. 第30回日本整形外科学会基礎学術集会: 2015/10/22-23. 富山
10. Terauchi R, Shirai T, Tsuchida S, Mizoshiri N, Mori Y, Kubo T. Postoperative lower limbs functional outcomes in patients of pelvic malignant bone tumor. 18<sup>th</sup> International Society of Limb Salvage/ Musculoskeletal Tumor Society Combined Meeting: 2015/10/9, Orland, U.S.A.
11. Shirai T, Tsuchiya H, Terauchi R, Tsuchida S, Mizoshiri N, Fujiwara H, Kubo T. The outcomes of reconstruction using frozen autograft combined with iodine-coated implants for patients with malignant bone tumors. The 24<sup>th</sup> Japanese-Korean Combined Orthopaedic Symposium: 2014/6/7, Hakone, Japan

〔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：  
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

寺内 竜 (Terauchi Ryu)  
京都府立医大 医学研究科 講師  
研究者番号：20575154

### (2)研究分担者

白井 寿治 (Shirai Toshiharu)  
京都府立医大 医学研究科 准教授  
研究者番号：20397186

### (3)研究分担者

新井 祐志 (Arai Yuji)  
京都府立医大 医学研究科 准教授  
研究者番号：50347449