

平成 30 年 6 月 25 日現在

機関番号：24303

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2015～2017

課題番号：15K10454

研究課題名(和文) CD81を標的とした新規抗がん薬の開発

研究課題名(英文) Development of novel anti-cancer drug targeting CD81 of osteosarcoma

研究代表者

白井 寿治 (Shirai, Toshiharu)

京都府立医科大学・医学(系)研究科(研究院)・准教授

研究者番号：20397186

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)：in vitroでは、骨肉腫細胞におけるCD81を抑制することで細胞増殖や細胞移動、浸潤を抑制することが可能であった。さらにそのメカニズムとしてErk, JNK, p38およびAktのタンパク質を評価すると、CD81を抑制した骨肉腫では明らかなErkとAktのリン酸化を抑制していた。また、細胞浸潤に関与するMMP2, MMP9, MT1-MMPの遺伝子発現を評価したところ、CD81を抑制した細胞ではそれらの発現が抑制していた。in vivoでは、ヌードマウスを用いて腫瘍形成モデルと転移モデルを作製した。CD81をknock outした群で腫瘍形成や転移は有意に少なかった。

研究成果の概要(英文)：In vitro, it was possible to suppress cell proliferation, cell migration and invasion by suppressing CD81 in osteosarcoma cells. Furthermore, Erk, JNK, p38 and Akt proteins were evaluated as their mechanisms. The phosphorylation of Erk and Akt in osteosarcoma was suppressed by CD81 knockdown. In addition, gene expression of MMP2, MMP9, MT1-MMP involved in cell invasion was evaluated. Their expression was suppressed in cells suppressed CD81. In vivo, tumorigenesis models and metastasis models were generated using nude mice. Tumor formation and metastasis were significantly less in the group knocked out CD 81.

研究分野：骨・軟部腫瘍学

キーワード：骨肉腫 CD81

### 1. 研究開始当初の背景

骨肉腫は高悪性度骨腫瘍であり、小児や青年期に好発する。集学的治療法の発達に伴い、その予後は改善傾向であるが、肺転移がある症例では依然予後不良である。近年、がん治療で有効な分子標的薬が臨床応用されているが、骨肉腫に対する有効な分子標的薬は臨床応用されていない。一方、CD81 はテトラスパニンファミリーの一つで多くのがん種において増殖および転移能に影響を与えると報告されている。CD81 を抑制することで骨肉腫を制圧できれば、生命予後の改善が期待できる。

### 2. 研究の目的

骨肉腫細胞における CD81 発現を確認し、CD81 が骨肉腫の増殖や転移に与える影響を検討することである。

### 3. 研究の方法

今回の研究では骨肉腫細胞株を用いて、CD81 の発現を検討した。その後、CD81 発現を抑制することで骨肉腫細胞株に与える影響を分子レベルで評価した。

CD81 の発現と siRNA を用いた CD81 の抑制  
ヒト骨肉腫細胞 (Saso2, MG63, 143B) およびヒト骨芽細胞 (hFOB1.19) における CD81 の発現を real time RT-PCR 法および ELISA 法で確認した。siRNA を用いて CD81 の抑制効果を検証した。

CD81 を抑制下における骨肉腫細胞の増殖、移動、浸潤能の評価

ヒト骨肉腫細胞株 (MG63, 143B) における CD81 を siRNA で抑制し増殖能を MTT assay で、移動能を scratch assay で、浸潤能を invasion assay で評価した。

骨肉腫細胞における増殖、移動、浸潤能に  
関与するタンパク質評価

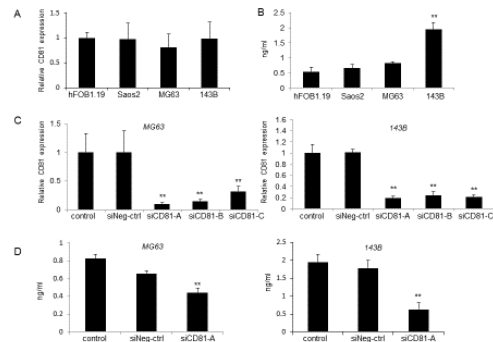
CD81 を抑制することでヒト骨肉腫細胞株 (MG63, 143B) における Akt, Erk, JNK, p38 のタンパク質発現を western blotting 法で確認した。

ヒト骨肉腫細胞株 143B の CD81 knockout 細胞を作製し、in vivo における増殖および転移能の評価

CRISPR/Cas9 法を用いてヒト骨肉腫細胞株 143B における CD81 遺伝子を knockout させ、ヌードマウスの皮下および尾静脈へ投与し、増殖および転移の評価を行った。

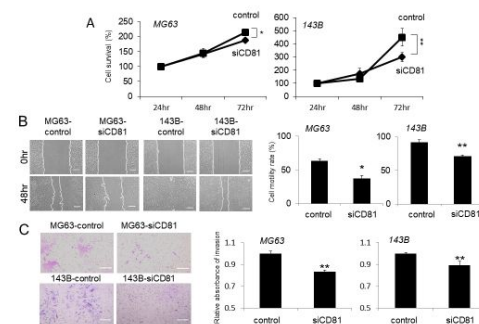
### 4. 研究成果

#### CD81 の発現と siRNA を用いた CD81 の抑制



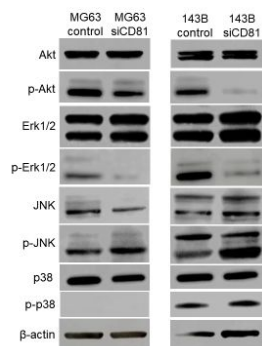
ヒト骨肉腫細胞株およびヒト骨芽細胞株にそれぞれ CD81 は発現しており、特に 143B で高発現していた (A, B)。siRNA を用いることで CD81 の発現は抑制できた (C, D)。

CD81 を抑制下における骨肉腫細胞の増殖、移動、浸潤能の評価



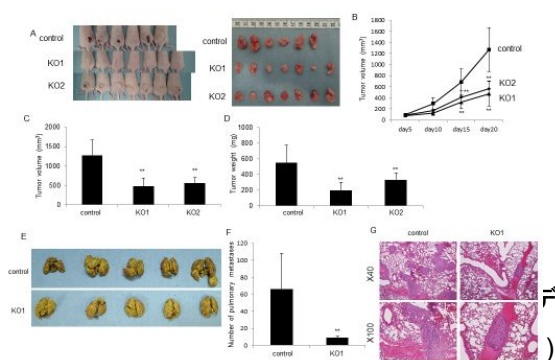
MTT assay では MG63 および 143B 共に 72 時間で siCD81 を導入した細胞の cell proliferation が有意に抑制された (A)。scratch assay では、MG63 および 143B 共に 48 時間で有意に siCD81 を導入した細胞の migration が抑制された (B)。さらに、invasion assay でも MG63 および 143B 共に 48 時間で有意に siCD81 を導入した細胞の invasion が抑制された (C)。

骨肉腫細胞における増殖、移動、浸潤能に関与するタンパク評価



Akt および Erk のリン酸化は MG63 および 143B 共に明らかに抑制されていた。一方で、JNK のリン酸化はやや増加傾向を認めた。また、p38 のリン酸化は MG63 でほとんど認めなかった。さらに 143B でも CD81 を特異的に抑制することで、p38 のリン酸化への影響は認めなかった。

ヒト骨肉腫細胞株 143B の CD81 knockout 細胞を作製し、in vivo における増殖および転移能の評価



群と比較して CD81 を knockout した 143B (K01 と K02) 群で有意に抑制されていた (A, B)。20 日目に摘出した腫瘍の容積および重さはそれぞれ有意に K01 群および K02 群において低かった (C, D)。さらに、尾静注後 28 日目に肺を観察すると、control 群と比較して K01 群は明らかに肺転移数が少なかった (E)。目視で転移数をカウントすると、K01 群で有意に転移数が少なかった (F)。HE 染色を行うと、control 群は K01 群と比較して明らかに微小転移を多数認めた。また、control 群では血

管内の骨肉腫細胞が血管壁から肺実質内へ浸潤する像を認めるのに対し、K01 群では血管内にとどまっており、血管壁から肺実質内への浸潤は認めなかった (G)。

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1件)

- Mizoshiri N, Mazda O, Kishida T, Yamamoto K, Shirai T, Terauchi R, Tsuchida S, Mori Y, Ejima A, Sato Y, Ara Y, Fujiwara H, Yamamoto T, Kanamura N, Kubo T. Transduction of Oct6 or Oct9 gene concomitant with Myc family gene induced osteoblast-like phenotypic conversion in normal human fibroblasts. *Biochem Biophys Res Commun.* (査読あり) 2015 ; 467(4) 1110-1116

[学会発表](計3件)

- Mizoshiri N, Shirai T, Terauchi R, Tsuchida S, Mori Y, Kubo T. The outcome of pulmonary metastasectomy for high-grade bone and soft tissue sarcomas. 2017 CTOS(The Connective Tissue Oncology Society) Annual Meeting : 2017.11.8-11 Maui, USA
- 溝尻直毅, 白井寿治, 寺内 竜, 土田真嗣, 森 裕貴, 岸田綱郎, 松田 修, 久保俊一. CD81 の MAP 経路を介した骨肉腫細胞株の増殖能への影響評価 第 32 回日本整形外科学会基礎学術集会 2017.10.26-27. 宜野湾
- 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: 2015.10.23. 富山

[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：  
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：  
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

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

(2)研究分担者

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

土田 真嗣 (Tsuchida Shinji)  
京都府立医科大学・医学研究科・助教  
研究者番号：10719834

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

中西 徹 (Nakanishi Toru)  
就実大学・薬学部・教授  
研究者番号：30243463

(3)研究協力者