

令和 3 年 6 月 14 日現在

機関番号：32676

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2018～2020

課題番号：18K07247

研究課題名(和文) 骨肉腫の疾患特異的代謝の解明と新規治療法開発

研究課題名(英文) Development of novel therapeutic approaches based on the elucidation of disease specific metabolism in osteosarcoma

研究代表者

清水 孝恒 (Shimizu, Takatsune)

星薬科大学・薬学部・准教授

研究者番号：40407101

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,300,000円

研究成果の概要(和文)：骨肉腫は、特に治療抵抗性の肺転移巣が臨床上問題である。骨肉腫転移巣の細胞内代謝を解析し、新規治療法の開発を試みた。独自に樹立した骨肉腫モデルを用いてメタボローム解析を行ったところ、転移巣では、解糖系、タンパク合成の亢進が示唆され、メタボライト発現パターンは、非接着培養条件に近かった。ピリミジン代謝拮抗薬のシタラビンが高い効果を示すことが明らかとなった。非接着培養で強力的に増殖を抑制する trametinib の効果をマウスモデルで検証した結果、単独でも原発巣、血中循環細胞を減少させた、さらに、既存の抗腫瘍薬との併用で転移巣にも高い効果を示すことが明らかとなった。

研究成果の学術的意義や社会的意義

難治性悪性腫瘍である骨肉腫は、特に転移巣の治療が今なお困難である。そこで、独自に樹立した骨肉腫マウスモデルを用いて肺転移巣の細胞内代謝を解析し、その知見をもとに分子標的療法を用いた新たな治療法の選択肢を開発した。具体的には、がん細胞の生存に必要な MEK-ERK 細胞シグナルの阻害と核酸合成代謝の阻害は、転移巣を含め強い抗腫瘍効果を認めることが明らかとなった。代謝解析と遺伝子発現解析、薬剤スクリーニングを組み合わせた解析は、骨肉腫など独特の性質を有する希少悪性疾患の新規治療法開発に有効である可能性が示唆された。

研究成果の概要(英文)：Novel therapies for refractory osteosarcoma (OS) must be developed. We focused on metabolism and performed metabolome analyses using our unique mouse model. Glycolysis and protein synthesis were upregulated in metastatic cells. Consistent with this, cytarabine exhibited a potent antitumor effect. Based on metabolite levels, non-adherent conditions were more similar to the in vivo environment than adherent conditions. A drug screen identified trametinib that preferentially decreased the viability of non-adherent cells. Notably, activation status of several kinases and crosstalk between MEK-ERK and PI3K-AKT pathways varied in OS, that might determine the response to MEK inhibition. A single dose of trametinib decreased primary tumors and CTCs. Moreover, combined administration of trametinib and anticancer drugs was effective for metastasis. Thus, combination of trametinib and agents targeting metabolism such as cytarabine holds therapeutic potential for treatment of OS.

研究分野：腫瘍生物学

キーワード：骨肉腫 転移巣 治療抵抗性 代謝

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

骨肉腫は予後不良の難治性間葉系悪性腫瘍である。若年発症が多く、分子標的療法は皆無であり、未だ3割以上の罹患者で長期生存が得られない。さらに発症数が100万人に1-2名の希少疾患であるため製薬企業が研究や治療開発に参入しにくく、アカデミアによる病態の解明、及び新規治療法開発が急務である。骨肉腫を予後不良にする原因は、治療抵抗性の残存病変(主に肺転移巣)にあり、ここ20年以上打開策が見出されていない。即ち、この閉塞状態を打破するには、新しい解析の導入による「骨肉腫治療抵抗性を支持する分子基盤の全容解明」が必要である。

申請者らは、これまでに、マウス骨髄ストローマ細胞から骨肉腫がん幹細胞モデル(AXT細胞)を樹立した(*Oncogene* 29, 2010)。この細胞は免疫系が正常な個体(C57BL/6)へ移植すると、2-3週の短期で原発・転移巣を形成し、ヒト骨肉腫の病理・病態像を極めて模倣したマウスモデルである。モデルを用いて強力な化学療法をおこなっても、依然多くの肺転移巣が残存していた。このことは、肺転移巣には原発巣とは異なる治療抵抗性を支持する分子機構が存在する可能性を示唆している。

近年、がんの代謝解析により新しい診断、治療が生まれ出され、臨床応用されているが、骨肉腫の特に転移巣におけるメタボローム解析はこれまでまれであった。骨肉腫は腫瘍増殖と骨形成が並行して行われ、腫瘍血管に富んだ組織学上ユニークな特徴をもつ。また、生体内では細胞が置かれる劇的な環境変化に適応して、最適な細胞内代謝を選択している可能性がある。そこで、*in vitro*、*in vivo*の様々な条件でメタボローム解析による代謝の解析を行い、新たな治療法を探索することとした。

2. 研究の目的

骨肉腫の予後を不良にする転移巣における細胞代謝の解明とそれを基盤とした治療抵抗性分子機構の解明を目指す。独自に樹立した骨肉腫マウスモデルを用いて、以下の事項を本研究の目的とした。

- 1) 骨肉腫の疾患特異的代謝と治療抵抗性獲得に関与する代謝を解明
- 2) 代謝から得られる知見をもとにした、骨肉腫細胞を標的とする化合物の抽出
- 3) 転移巣に効果を示す新規治療法の開発
- 4) ヒト骨肉腫における検証

3. 研究の方法

[*in vitro*の解析]これまでの研究で独自に樹立したマウス骨肉腫細胞(AXT細胞)やマウス骨髄ストローマ細胞は10%もしくは20% FBSを含有したIMDM培養液を用いて、ヒト骨肉腫細胞(MG63、Saos2、U2OS)は10% FBS含有McCoy's 5Aを用いて培養した。薬剤、化合物や分子発現変化の細胞増殖への影響は、細胞を96穴培養皿(接着と非接着を条件に応じて使用)に1000-2000個/100 μ Lの密度で播種し、2もしくは3日後にCell Titer Glo kit (Promega社)を用いて評価した。遺伝子発現解析は、遺伝子発現修飾細胞や、薬剤添加など各条件下で培養した細胞からtotal RNAを回収し、網羅的遺伝子発現解析(microarray)(Takara社)または、real time RT-PCR法を用いて行った。タンパク発現解析は、各条件下で培養後の細胞をLaemmliバッファで溶解しサンプル化したのちウェスタンブロット法で評価した。網羅的リン酸化アレイ解析は、Phospho-kinase array kit (R&D社)を用いた。細胞周期解析は、各種条件下で細胞を培養したのち、トリプシンで剥離後、70%エタノール固定を行い、propidium iodide (PI)にて染色し、フローサイトメトリー法を用いて行った。細胞表面抗原の発現やapoptosisの評価は、細胞を蛍光標識した抗原特異的抗体やAnnexinV-PIで染色したのち、フローサイトメトリー法を用いて評価した。遺伝子の発現修飾は、過剰発現とノックダウンは主に、レトロウィルスを用いた系で行った。組み換えDNA実験に関しては、星薬科大学組み換えDNA実験安全委員会で承認を得て行った。

[*in vivo*の解析]マウスを用いた動物実験は、星薬科大学動物実験規定に従い、動物実験委員会の承認を得たうえで行った。疾患モデル作成には、マウス骨肉腫細胞(AXT細胞)や、AXT細胞に遺伝子修飾を行った細胞を、イソフルラン麻酔下でC57BL/6マウス(8-10週齢、雌)の皮下(側腹部)に移植した。腫瘍細胞は約2-3週で、原発巣、転移巣を形成するため、観察期間は3-4週の間とした。生存への影響を評価する解析では、腹腔移植を用いた。治療実験では、trametinibとrapamycinは経口投与で、adriamycinは経静脈投与で、cytarabineは腹腔投与で行い、治療効果を検討した。マウスに形成した骨肉腫から原発巣、肺転移巣を採取し、4%パラホルムアルデヒドで固定後、パラフィン包埋し、切片を作成して免疫染色を行った。また、total RNA、タンパクを回収し、遺伝子発現解析、ウェスタンブロット法によるタンパク発現解析に用いた。治療効果判定のための転移巣の定量化は、左肺からtotal RNAを抽出し、相対的GFP発現量(real time RT-PCR法: GFP/Actb)を評価することにより行った。血中循環がん細胞の定量化は、解剖時に致死量のペントバルビタールを投与し、麻酔したマウスから心採血を行い、全血からtotal RNAを抽出後、相対的GFP発現量を用いて行った。

[メタボローム解析]慶應義塾大学先端生命科学研究所、曾我朋義先生との共同研究で骨肉腫に関するメタボローム解析を施行した。接着培養、非接着培養の条件下で培養した AXT 細胞と、AXT 細胞をマウスに移植後に形成した骨肉腫 (in vivo の腫瘍検体) からサンプルを調整し、CE-MS により発現するメタボライトを評価した。in vivo の腫瘍検体は、原発巣、肺転移巣から、腫瘍部分を実態顕微鏡下で採取した。

4. 研究成果

[骨肉腫 in vivo 検体からのメタボローム解析]

細胞増殖を支える重要な要素の一つに、細胞内の代謝がある。個々の正常組織では、細胞ごとに特有の細胞内代謝があるが、特にがん細胞は、解糖系が優位になるワールブルク効果といった独特の細胞代謝パターンが知られている。さらに、骨肉腫は in vivo では、骨を形成しながら増殖するものの、in vitro では骨形成をせずに増殖するため、がん種なかでも特殊な代謝パターンが存在する可能性がある。AXT 細胞を C57BL/6 マウスに皮下移植し、原発巣、肺転移巣を形成後に、それぞれから腫瘍細胞を採取し、メタボローム解析を施行した。原発巣、肺転移巣 1g 当たりにおけるメタボライトの発現を比較したところ、両者の発現の相関指数は 0.917 と高いもので、メタボライト発現には類似性がみられた。一方で、乳酸、尿酸、タウリン、グリシンの発現が転移巣の方が高く、解糖系やタンパク合成が転移巣で亢進していることが示唆された (図 1)。このことは、細胞増殖を抑制するには、原発巣よりも転移巣でより強力な治療を有する可能性を示唆する。また、これまで、担癌モデルマウスに治療を施行しても、原発巣に比較して、転移巣の効果が弱い傾向にあったが、細胞内因性の分子機構の違いによることが明らかとなった。

図 1: 腫瘍検体からのメタボローム解析

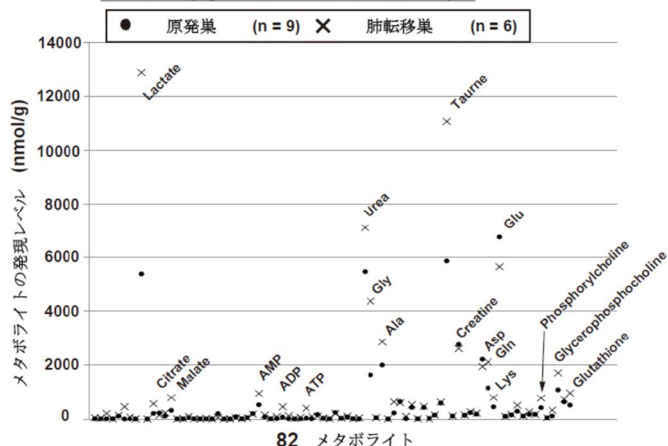
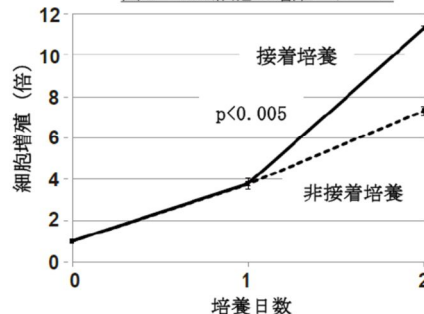


図 2: AXT細胞の増殖パターン



[in vitro 培養細胞からのメタボローム解析]

骨肉腫 AXT 細胞は接着培養、非接着培養の両条件で増殖することができる (図 2)。正常接着細胞は非接着条件で培養すると、anoikis により細胞死することも多い。このため、非接着条件での増殖能は悪性がん細胞の 1 つの特徴である。AXT 細胞が anoikis を回避し、非接着培養でも増殖できる分子機構を探索するため、網羅的にチロシンキナーゼのリン酸化を解析した。チロシンリン酸化アレイの結果では、接着培養で活性化していたチロシンキナーゼの多くが活性を失っていたものの、がん細胞の生存を支持するレセプター型チロシンキナーゼである、Egfr、ErbB2、Pdgfra/b、Ax1、Dtk、EphA7 の活性化は残存していた。これまでに、AXT 細胞において、接着培養と非接着培養では、抗腫瘍薬への感受性が異なることが見出されており、この異なる 2 細胞増殖条件から、検体を採取し、メタボローム解析を施行した。両者培養条件で 1 細胞あたりのメタボライトの発現パターンを比較したところ、相関係数は 0.914 と近似していた。一方で、個々のメタボライトに注目すると、グルタミン酸、グリシンは接着細胞の方が高く、乳酸、グルタチオンは非接着細胞の方が高いなど違いがみられた。このことから、非接着培養では、活性酸素を除去する機構の亢進などが推察され、抗腫瘍薬の感受性に関わる可能性が示唆された。

[メタボローム解析と薬剤スクリーニングによる新規薬物療法の開発]

in vitro、in vivo のメタボローム解析の結果から、転移巣、非接着培養では治療抵抗性につながる細胞内代謝状況が示唆された。この知見をもとに in vivo での腫瘍細胞の増殖様式を in vitro で再現できれば、薬剤スクリーニングを行うなど、生体内で強い治療効果を発揮する手段の開発に繋がれる。そして、骨肉腫治療における最大の問題点である転移巣への有効な治療手段が開発できる可能性がある。そこで、メタボライト発現パターンを、in vivo の原発巣、転移巣と、in vitro の接着、非接着培養の間で比較した。in vitro と転移巣の比較では、接着培養と肺転移巣の相関係数が 0.543、非接着培養と肺転移巣の相関係数が 0.673 であった。in vivo、in vitro 同士の比較に比べてメタボライトの発現パターンの類似性は顕著に減少しており、in vitro の培養環境は、生体内のがん増殖環境とは代謝の観点からみて、大きく乖離していることが明らかとなった。一方で、解糖系、核酸合成経路は両者に共通して亢進しており、さらに、通常の細胞培養皿を用いた接着培養よりも非接着培養条件の方が、in vivo の肺転移巣にやや近い

ことが示唆された。このため、非接着培養条件において抗腫瘍効果がある薬剤は、in vivo でも強い効果を見いだせる可能性を考え、薬剤スクリーニングから非接着培養下で細胞増殖を強く阻害する薬剤を見出し、抗腫瘍効果を in vitro、in vivo において検証した。スクリーニングには、先端モデル動物支援プラットフォーム(分子プロファイリング支援班)より供与頂いた364種の化合物を用いた。その結果、接着培養と比較して、非接着培養で強い効果を認め、対照の正常骨髄ストローマ細胞に影響が少ない薬剤に、MEK 阻害剤 (U0126, PD98059) が抽出された。また、核酸合成経路を阻害するピリミジン代謝拮抗薬であるシタラピンは、ヒト骨肉腫の治療では標準薬ではないものの、接着、非接着両方で強力な効果を示した。この効果は、メタボローム解析によるピリミジン代謝の亢進所見とも一致するため、今後新たな治療候補ともなりうる。結果をもとに、MEK 阻害薬 (7種類) をさらに検証した結果、全てにおいて、非接着培養優位に細胞増殖抑制効果を認めた。7種のうち、trametinib と cobimetinib は、AXT 細胞への効果が強く、正常骨髄ストローマ細胞への影響も少ない薬剤であった (図3)。そこで、効果の最も強い trametinib で分子機構を解析した結果、細胞周期を抑制し、apoptosis を誘導することが明らかとなった (図4)。そして、その効果は非接着培養で特に高かった。ウェスタンブロット法による解析では、trametinib は MEK の下流の ERK の活性化を完全に抑制し、非接着培養では、AKT の活性化、S6 の活性化も抑制した。一方で、MEK 経路と関連のある、c-Raf、b-Raf の活性化には影響を与えなかった。

図3：MEK阻害薬の細胞増殖抑制効果

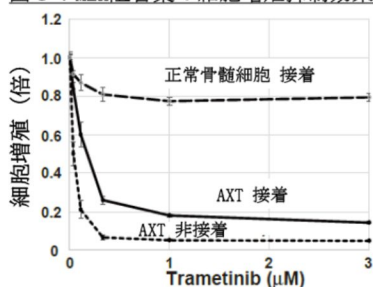
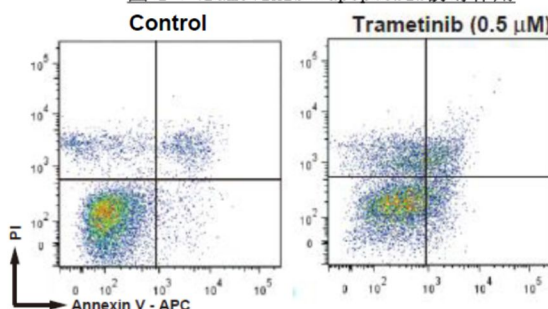


図4：trametinibのapoptosis誘導作用



ヒト骨肉腫細胞株を用いた検討では、U2OS は AXT 細胞同様、trametinib の細胞増殖抑制効果は高かった。そして、特に非接着培養では、apoptosis の誘導を認めた。しかし、MG63、Saos2 では、非接着培養においても効果は弱く、骨肉腫でも細胞株によって効果が異なることが明らかとなった。以上から、骨肉腫における MEK 阻害剤の抗腫瘍効果は細胞ごとに異なる可能性が示唆された。そこで、trametinib の抗腫瘍効果の強度を決定する分子機構を解明する試みを行った。AXT 細胞では非接着培養条件で、trametinib 添加により Akt の活性化が低下した (図5)。一方で、より効果の弱い接着条件では、Akt の活性化低下は顕著ではなかった。そこで、MEK-ERK 経路が遮断された際、PI3K-AKT 経路への生存シグナルの依存性が trametinib の感受性に影響を与えるのではないかと考えた。trametinib と PI3K 阻害薬である buparlisib との併用したところ、trametinib に感受性の高い AXT 細胞、U2OS 細胞では、2つの薬剤投与で相乗的に増殖が抑制されたのに対し、非感受性株の MG63、Saos2 では、そのような効果は認められなかった (図6)。

図5：Aktの活性化評価

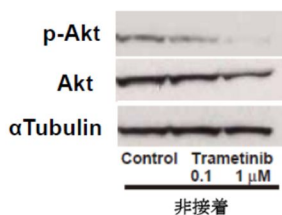
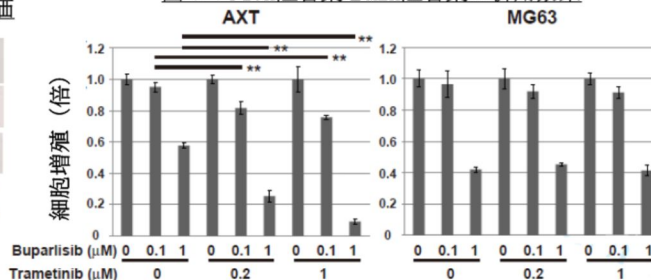


図6：PI3K阻害薬とMEK阻害薬の併用効果



即ち、細胞生存シグナルが MEK-ERK 経路と PI3K-AKT 経路に依存するにあたり、個々の細胞内における両経路のクロストークの違いが、trametinib の感受性を決める可能性が示唆された。Trametinib の感受性に影響する分子機構をさらに解明するため、感受性株の U2OS 細胞と非感受性の MG63 細胞の間で、trametinib 添加の有無における kinase 活性化の違いを網羅的に解析した。その結果、MG63 ではもともと AKT とその下流の PRAS40 及び WNK1 の活性化が U2OS より高いなど、同じ条件で培養している骨肉腫細胞であっても基本的なキナーゼ活性化のパターンに差がみられた。trametinib 添加に伴う変化を解析したところ、U2OS では、CREB、c-JUN の活性増強がみられた。MG63 ではこのような違いはみられず、HSP27、FGR の活性化上昇が認められた。trametinib 添加に伴う、kinase 活性化の変化も細胞種で大きく異なることが明らかとなった。U2OS 細胞で trametinib 添加に伴い活性が上昇した CREB を siRNA によりノックダウンしたところ、AXT 細胞、U2OS 細胞の両方で、非接着培養における trametinib の感受性が低下した。このため、CREB の活性化は trametinib の感受性に影響する可能性が示唆された。加えて、trametinib

の感受性を左右する因子に関し、c-MYC、p53、Rb の関与を検討した。c-MYC は AXT 細胞樹立時に oncogene として導入した遺伝子であり、ヒト骨肉腫検体を用いて免疫染色を行った結果、53 例中 15 例 (28.3%) で陽性であった (図 7)。骨肉腫細胞株でタンパク発現を評価した結果、MG63、Saos2、U2OS のいずれにも発現がみられ、trametinib の感受性には関連がみられなかった。また、p53 は AXT 細胞において R267C 変異がみられ、機能が低下している。また、過去の報告では、MG63、Saos2 は変異と欠損で p53 の機能は喪失している。一方、U2OS は片アレル正常な p53 が存在しているとされる。そこで、下流の CDKN1A の発現を adriamycin 添加により DNA damage を入れたのち評価したところ、U2OS では CDKN1A の上昇はみられたものの、他の細胞ではみられなかった (図 8)。このことから、p53 の機能も trametinib の感受性には関与しない可能性が示唆された。Rb のタンパク発現を評価した結果、Saos2 のみで欠損が確認された。この所見も過去の報告と一致しており、Rb の発現も trametinib の感受性には影響しない可能性が示唆された。

図 7 : ヒト骨肉腫の c-MYC 発現 (陽性例)

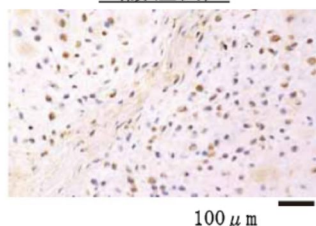
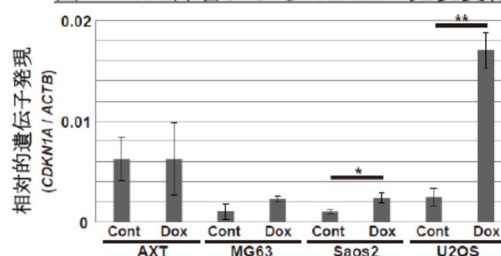
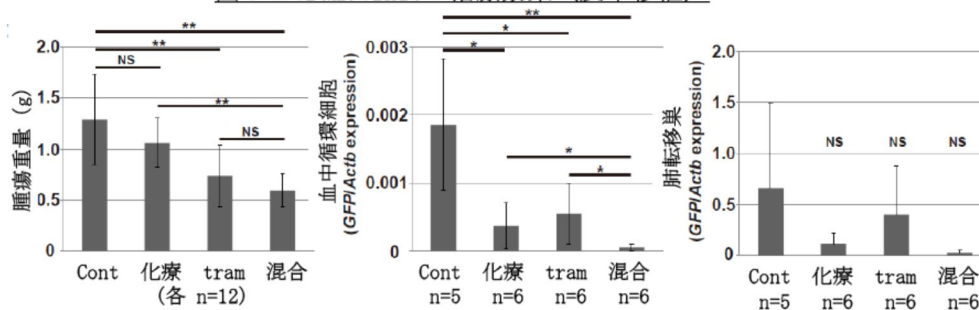


図 8 : DNA 障害による CDKN1A の発現変化



trametinib の in vivo の効果を検証するため、AXT 細胞を C57BL/6 マウスに腹腔移植し、経口投与による治療を行った。しかし、生存期間期間を延長する効果は認められなかった。皮下移植して形成した腫瘍は、trametinib 投与後に ERK の活性化が減弱しており、in vivo でも薬効を発揮していることが確認された。そこで、trametinib の作用を in vivo で増強させる目的で、trametinib と共添加して相乗効果の得られる薬剤を、分子プロファイリング支援班より供与頂いた 364 種の化合物を用いてスクリーニングした。その結果、rapamycin が候補薬剤として抽出され、同様の機序をもつ temsirolimus、everolimus も併用で相乗効果を認めた。そこで、trametinib、rapamycin 単独、共投与群を設定し、治療をおこなったところ、trametinib 単独投与で原発巣の縮小、血中循環細胞の減少を認めた。肺転移巣では、単独投与の抗腫瘍効果はみられなかったものの、rapamycin との併用で有意差はないものの、若干の縮小効果が認められた。rapamycin 単独投与は、全く抗腫瘍効果をはきせず、むしろ増悪させるような傾向もみられた。腫瘍免疫が抑えられてしまったため、腫瘍が増大した可能性も考えられた。trametinib は、非接着培養条件優位に細胞増殖抑制効果を発揮する薬剤であったため (図 3) 接着培養で抗腫瘍効果が強い薬剤との併用も検討した。化合物スクリーニングから、このような抗腫瘍薬として cytarabine、adriamycin が抽出された。cytarabine は骨肉腫では臨床的に使用されないものの、AXT 細胞では、既存の抗腫瘍薬のなかで最も高い効果を発揮した。そこで、この 2 剤と trametinib の併用効果を検証した。trametinib 単独投与では、今回も原発巣の縮小、血中循環細胞の減少が認められた。そして、肺転移巣では、trametinib と抗腫瘍薬の併用により、極めて強い縮小効果が認められた (図 9)。このため、trametinib は既存の治療に併用することにより、転移巣に対する新しい治療候補薬となる可能性が示唆された。

図 9 : trametinib の治療効果 (皮下移植)



また、in vivo の原発巣、血中循環細胞、転移巣全てにおいて抗腫瘍効果を示すには、in vitro において、接着培養、非接着培養の両方で強い効果を認める必要があることが示唆された。骨肉腫は細胞株によって、細胞生存を支持するキナーゼの活性化パターンがかなり異なることが示唆された。また、ヒト骨肉腫検体を用いた免疫染色の解析から、MAPK 経路で重要な ERK の活性化がみられる症例は、約 40% であり、実際のヒト骨肉腫においても細胞内シグナル活性化が症例ごとに異なる可能性が示唆された。また、c-MYC 陽性例のうち 66.7% に MEK-ERK の活性化がみられた。trametinib の臨床応用には、効果を予測するバイオマーカーが必要であるが、c-MYC と ERK の活性化は指標となりうる可能性が示唆された。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計4件（うち査読付論文 4件/うち国際共著 1件/うちオープンアクセス 0件）

1. 著者名 2. Watanabe M, Narita M, Hamada Y, Yamashita A, Tamura H, Ikegami D, Kondo T, Shinzato T, Shimizu T, Fukuchi Y, Muto A, Okano H, Yamanaka A, Tawfik VL, Kuzumaki N, Navratilova E, Porreca F, Narita M	4. 巻 14
2. 論文標題 Activation of ventral tegmental area dopaminergic neurons reverses pathological allodynia resulting from nerve injury or bone cancer	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Molecular Pain	6. 最初と最後の頁 1-14
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1177/1744806918756406	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 該当する
1. 著者名 Takahashi Nobuhiro, Nobusue Hiroyuki, Shimizu Takatsune, Sugihara Eiji, Yamaguchi-Iwai Sayaka, Onishi Nobuyuki, Kunitomi Haruko, Kuroda Tatsuo, Saya Hideyuki	4. 巻 79
2. 論文標題 ROCK Inhibition Induces Terminal Adipocyte Differentiation and Suppresses Tumorigenesis in Chemoresistant Osteosarcoma Cells	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Cancer Research	6. 最初と最後の頁 3088 ~ 3099
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1158/0008-5472.CAN-18-2693	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -
1. 著者名 Eiji Sugihara, Norisato Hashimoto, Satoru Osuka, Takatsune Shimizu, Sayaka Ueno, Shogo Okazaki, Tomonori Yaguchi, Yutaka Kawakami, Kenjiro Kosaki, Taka-Aki Sato, Shinichiro Okamoto, Hideyuki Saya	4. 巻 80
2. 論文標題 The Inhibitor of Apoptosis Protein Livin Confers Resistance to Fas-Mediated Immune Cytotoxicity in Refractory Lymphoma	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Cancer research	6. 最初と最後の頁 4439-4450
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1158/0008-5472.CAN-19-3993	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -
1. 著者名 Shimizu Takatsune, Kimura Kiyomi, Sugihara Eiji, Yamaguchi Iwai Sayaka, Nobusue Hiroyuki, Sampetrea Oltea, Otsuki Yuji, Fukuchi Yumi, Saitoh Kaori, Kato Keiko, Soga Tomoyoshi, Muto Akihiro, Saya Hideyuki	4. 巻 in press
2. 論文標題 MEK inhibition preferentially suppresses anchorage independent growth in osteosarcoma cells and decreases tumors in vivo	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Journal of Orthopaedic Research	6. 最初と最後の頁 in press
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1002/jor.25023	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

〔学会発表〕 計6件（うち招待講演 1件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 清水孝恒、木村聖美、武藤章弘、佐谷秀行
2. 発表標題 MEK阻害薬trametinibは骨肉腫にapoptosisを誘導し抗腫瘍効果を示す
3. 学会等名 第52回日本臨床分子形態学会総会・学術集会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 清水孝恒、木村聖美、杉原英治、山口さやか、信末博行、武藤章弘、佐谷秀行
2. 発表標題 Trametinib preferentially suppresses anchorage-independent growth in osteosarcoma cells and exerts anti-tumor activity
3. 学会等名 第79回日本癌学会学術総会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 齋藤潤、大西伸幸、杉原英志、清水孝恒、木村聖美、小池直義、サンペトラ オルテア、岡崎章悟、信末博行、笠間隆志、佐谷秀行
2. 発表標題 Benzaldehydeは腫瘍細胞における14-3-3 の高発現を介してAMPK活性を亢進させる。
3. 学会等名 第78回日本癌学会学術総会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 清水孝恒、武藤章弘、佐谷秀行
2. 発表標題 骨肉腫難治例の治療抵抗性分子機構の解明と新規治療法開発にむけた基礎的検討
3. 学会等名 第13回日本緩和医療薬学会年会（招待講演）
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 木村聖美, 杉原英志, 信末博行, 山口さやか, 武藤章弘, 佐谷秀行, 清水孝恒
2. 発表標題 サバイビン阻害薬は小胞体ストレスを誘導し、骨肉腫に対し in vitro, in vivo で抗腫瘍効果を示す
3. 学会等名 第77回日本癌学会学術総会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 清水孝恒, 武藤章弘, 佐谷秀行
2. 発表標題 骨肉腫のインスリンシグナルによる形態変化と治療抵抗性獲得
3. 学会等名 第50回日本臨床分子形態学会総会・学術集会
4. 発表年 2018年

〔図書〕 計1件

1. 著者名 先端モデル動物支援プラットフォーム (AdAMS)	4. 発行年 2021年
2. 出版社 羊土社	5. 総ページ数 320
3. 書名 マウス・ラットモデル作製・解析プロフェッショナル	

〔出願〕 計1件

産業財産権の名称 骨腫瘍の治療剤及び骨腫瘍等の治療のためのチャネル薬の評価方法	発明者 今泉祐治、清水孝恒、佐谷秀行、他総7名	権利者 同左
産業財産権の種類、番号 特許、2020-007116	出願年 2020年	国内・外国の別 国内

〔取得〕 計0件

〔その他〕

清水 孝恒 (Takatsune Shimizu) - マイポータル - researchmap
<https://researchmap.jp/shimizutakatsune>
[研究内容] 慶應義塾大学 医学部 医学研究科 先端医科学研究所
<http://www.genereg.jp/html2/html/staff/NIInst/Shimizu/>

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
--	---------------------------	-----------------------	----

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------