

機関番号：15401
 研究種目：基盤研究（C）
 研究期間：2008～2010
 課題番号：20591757
 研究課題名（和文） テロメラーゼ阻害剤封入磁性体リポソームと外磁場による骨・軟部肉腫
 ターゲット治療
 研究課題名（英文） Target therapy in bone and soft tissue sarcomas using magnetic
 liposomal telomerase inhibitor under an external magnetic force
 研究代表者
 松尾 俊宏（MATSUO TOSHIHIRO）
 広島大学・大学院医歯薬学総合研究科・寄附講座助教
 研究者番号：90397977

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。TMPyP4 などのテロメラーゼ阻害剤が、新たな治療薬となる可能性がある。

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.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2008年度	700,000	210,000	910,000
2009年度	900,000	270,000	1,170,000
2010年度	900,000	270,000	1,170,000
年度			
年度			
総計	2,500,000	750,000	3,250,000

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：遺伝子・癌

1. 研究開始当初の背景

近年の化学療法の進歩，治療技術の向上に

より，腫瘍浸潤・転移のない骨・軟部悪性腫瘍（肉腫）に対しては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癌剤や放射線に対する感受性に乏しく、肺転移などの病態には既存の治療法では満足いく生存率を得ていないのが現状である。従来の治療に抵抗性の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。これに対し、テロメラーゼは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。多くの癌細胞ではテロメラーゼを発現することによって細胞増殖能を獲得しており、85% 以上の癌腫にテロメラーゼ活性を有していることが判明している。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期待されている。さまざまなテロメラーゼ活性阻害剤が開発され、現在、米国では癌腫に対し臨床治験が行われている。この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未だ十分には解明されていない。cationic porphyrin 5, 10, 15, 20-tetra-(N-methyl-4-pyridyl) porphyrin (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し、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 TMPyP4 を用いた。

また、正常細胞のなかで生殖細胞や再生性組織の幹・前駆細胞などにテロメラーゼ活性を有しており、特に若年者に多く発症する骨肉腫においては、それらを阻害しない安全で確実な Drug Delivery System が必要である。テロメラーゼ阻害剤にわれわれが独自に開発してきた磁気ターゲティング療法を組み合わせることにより、骨・軟部腫瘍に対する新しい治療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 を封入した磁性体リポソームをマウス肉腫モデルに投与し、外磁場により病巣部に誘導する。この治療のターゲティング効果および抗腫瘍効果、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

①概要：それぞれ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 ($50 \mu\text{M}$ もしくは $100 \mu\text{M}$) 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。

②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。10⁵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。

③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 μg 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。

④ MTT アッセイ：細胞を培養し、3-(4,5)-dimethylthiazoliumromide (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。

⑤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 μM もしくは

100 μM の TMPyP4 とともに培養した後、1 x 10⁵ 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)マウス肉腫モデルに対する TMPyP4 封入磁性体リポソームの抗腫瘍効果およびターゲティング効果

①マウス骨肉腫、脂肪肉腫モデルの作成：ネブタール麻酔を行い、生後 9 週齢ヌードマウスの脛骨内に骨肉腫細胞 (HOS, SaOS2, MG63, U2OS), 腓腹筋内に脂肪肉腫細胞 (SW872) を 1 × 10⁵ 個移植する。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。

②TMPyP4 封入磁性体リポソームの作成：卵黄レシチンとコレステロールより構成される脂質二重膜に酸化鉄微粒子と TMPyP4 を conventional film method にて封入する。

③磁気ターゲティング効果：腫瘍細胞移植後 2 週目に、¹⁴C 標識 TMPyP4 封入磁性体リポソームを尾静脈より投与し、可変式外磁場装置に下腿を固定、0.5 テスラの磁場をかける。¹⁴C 標識 TMPyP4 投与量は 0.3 mg (30 μCi) / kg とする。2, 4, 12, 24 時間後に血清、腫瘍、肺、肝、腎および精巢の radioactivity を測定し外磁場を 1 時間かけた群と外磁場をかけない群を比較する。

④抗腫瘍効果：腫瘍移植 2 週間目に、TMPyP4 封入磁性体リポソームを尾静脈より投与し、可変式電磁石の磁極間隙に下腿を固定、0.5 テスラの磁場をかける。抗腫瘍効果を評価するため以下の 4 群を作成する。A 群：磁気ターゲティング法 (外磁場を 1 時間かける) にて TMPyP4 封入磁性体リポソームを投与した群。B 群：磁場なしで TMPyP4 封入磁性体リポソームを投与した群。C 群：TMPyP4 溶液を投与し、外磁場を 1 時間かけた群。D 群：生食投

与群. TMPyP4投与量は20 μ g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).

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%).

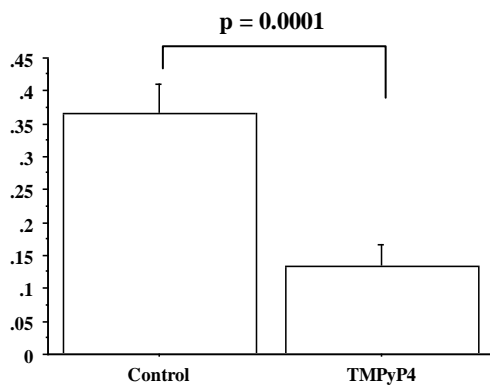


図1: HOSのTMPyP4による有意なテロメラーゼ活性の低下

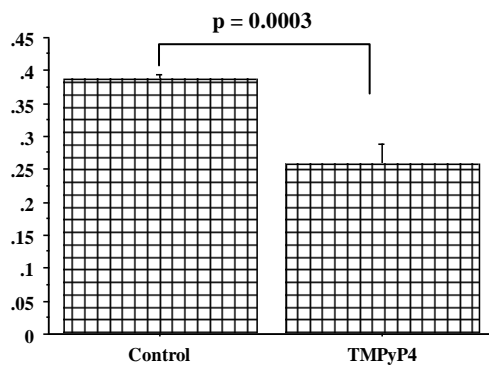


図2: SaOS2のTMPyP4による有意なテロメラーゼ活性の低下

(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 \pm 0.18 kbで, 50 μ Mでの治療後のテロメア長は5.52 \pm 0.02 kb, 100 μ Mでの治療後は5.60 \pm 0.54 kbであった. SaOS2の無治療群のテロメア長は11.9 \pm 1.19 kbで, 50 μ Mでの治療後のテロメア長は4.88 \pm 1.04 kb, 100 μ Mでの治療後は4.00 \pm 0.68 kbであった. MG63の無治療群のテロメア長は13.8 \pm 0.52 kbで, 50 μ Mでの治療後のテロメア長は10.7 \pm 0.33 kb, 100 μ Mでの治療後は9.89 \pm 0.45 kbであった. U2OSの無治療群のテロメア長は39.9 \pm 2.19 kbで, 50 μ Mでの治療後のテロメア長は39.7 \pm 2.20 kb, 100 μ Mでの治療後は37.6 \pm 1.13 kbであった.

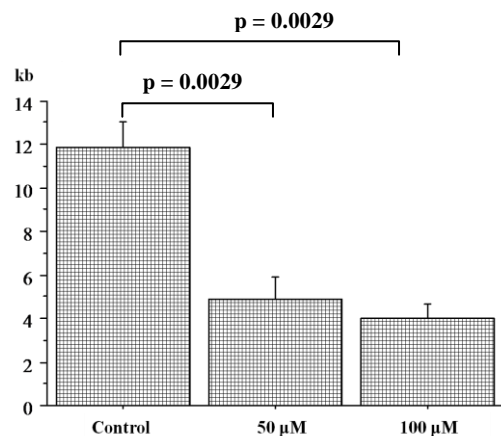


図3: SaOS2のTMPyP4による有意なテロメア長の短縮

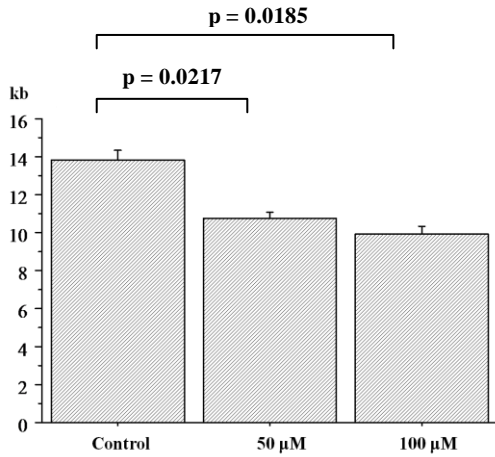


図4：MG63の有意なテロメア長の短縮

(3) 抗腫瘍効果：50 μM 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確認したが、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 μM 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 μM 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。

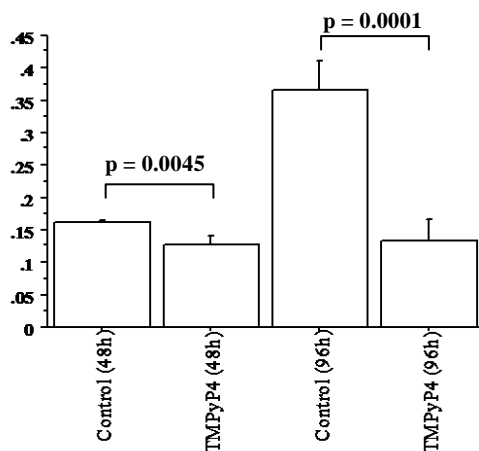


図5：HOSのTMPyP4による増殖抑制効果

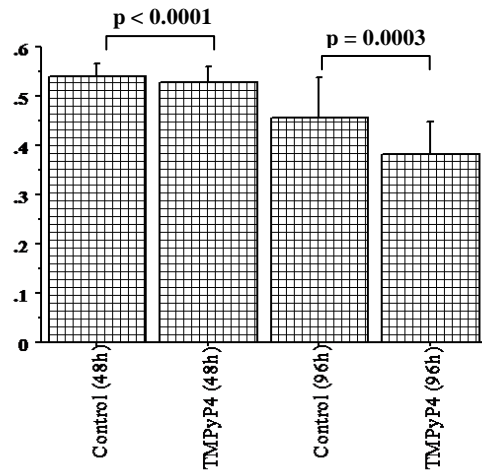


図6：SaOS2のTMPyP4による増殖抑制効果

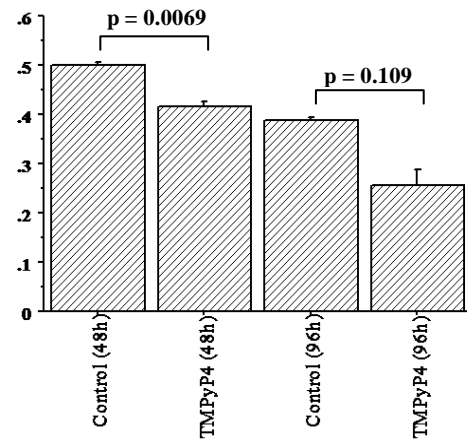


図7：MG63のTMPyP4による増殖抑制効果

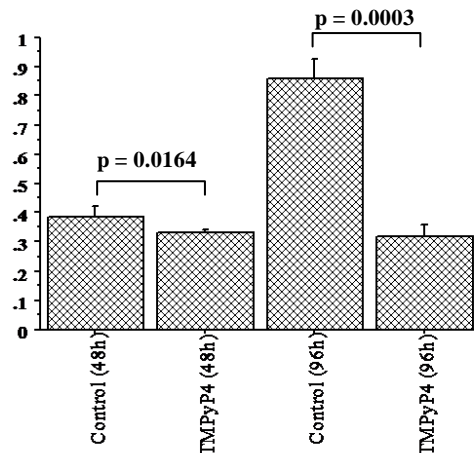


図8：U2OSのTMPyP4による増殖抑制効果

(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。テロメラゼ活性を有する骨肉腫細胞において、有意なテロメラ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、肉腫治療の新たなストラテジー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磁場を利用した磁気ターゲティング治療の有用性に関して研究する予定である。

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 1 件)

1. Fujimori J, Matsuo T, Shimose S, Kubo T, Ishikawa M, Yasunaga Y, Ochi M. Antitumor effects of telomerase inhibitor TMPyP4 in osteosarcoma cell lines. Journal of

Orthopaedic Research. 査読あり, in press.

[学会発表] (計 4 件)

1. Fujimori J, Matsuo T, Shimose S, Kubo T, Ochi M. Inhibition of cell growth by G-quadruplex-interactive agent in osteosarcoma cells. Orthopaedic Research Society 2011 Annual Meeting, 13-16 Jan 2011, Long Beach, USA.

2. 松尾俊宏, 下瀬省二, 久保忠彦, 藤森淳, 越智光夫. 骨・軟部腫瘍のテロメア・テロメラゼ. 第 49 回鹿児島整形外科懇話会, 平成 22 年 8 月 21 日, 鹿児島市.

3. Fujimori J, Matsuo T, Shimose S, Kubo T, Yasunaga Y, Ochi M. Antitumor effects of telomerase inhibitor TMPyP4 in osteosarcoma cell lines. Orthopaedic Research Society 2010 Annual Meeting, 6-9 Mar 2010, New Orleans, USA.

4. 藤森淳, 下瀬省二, 久保忠彦, 松尾俊宏, 安永裕司, 越智光夫. テロメラゼ阻害剤による骨肉腫細胞への抗腫瘍効果. 第 24 回日本整形外科学会基礎学術集会, 平成 21 年 11 月 5-6 日, 横浜市.

[その他]

ホームページ等

6. 研究組織

(1) 研究代表者

松尾 俊宏 (MATSUO TOSHIHIRO)
広島大学・大学院医歯薬学総合研究科・寄附講座助教
研究者番号：90397977

(2) 研究分担者

越智 光夫 (OCHI MITSUO)
広島大学・病院・教授
研究者番号：70177244

檜山 英三 (HIYAMA EISO)
広島大学・自然科学研究支援開発センター・教授
研究者番号：00218744

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

(3) 連携研究者

()

研究者番号：