

科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成25年6月7日現在

機関番号：24303
 研究種目：基盤研究 C
 研究期間：2010～2012
 課題番号：22591668
 研究課題名（和文） P53-RB 経路を標的とした悪性骨軟部腫瘍に対する遺伝子調節化学療法
 研究課題名（英文） Molecular-targeting chemotherapy related to p53-RB for malignant bone and soft tissue tumors
 研究代表者
 辻 吉郎 (TSUJI YOSHIRO)
 京都府立医科大学・医学研究科・客員講師
 研究者番号：70453123

研究成果の概要（和文）：ERK のリン酸化を阻害する MEK 阻害剤は線維肉腫細胞に対して濃度依存性に細胞数の増加を抑制し、G1/S 期の細胞の割合を高めた。ERK のリン酸化は濃度上昇とともに阻害され、p21^{WAF1/CIP1} と p27^{KIP1} は濃度依存性に発現の増加を認めた。MEK 阻害剤は既存の抗腫瘍剤と異なる Ras-MEK-ERK 経路に作用することで抗腫瘍効果が得られる可能性があった。一方、スルフォラファン(SFN)と放射線の併用療法では有意に骨肉腫細胞の増殖を抑制した。G2/M 期の細胞数と subG1 期の細胞数の割合は有意に増加し、ERK および Akt 蛋白のリン酸化を抑制することで、放射線感受性を増加させアポトーシスを誘導したと考えた。SFN は骨肉腫に対する放射線増感剤の一つとして新たな有用な治療法になると考えた。

研究成果の概要（英文）：A MEK inhibitor suppressed cell growth and increased the population of G1/S phase cells in a dose-dependent manner for fibrosarcoma cells. The phosphorylation of ERK was inhibited and p21^{WAF1/CIP1} and p27^{KIP1} protein expression increased. These results indicate that it might be an attractive compound for molecular-targeting chemotherapy with the activation of the Ras-MEK-ERK pathway. Sulforaphane(SFN) enhanced the radiosensitivity of osteosarcoma cells by inducing apoptosis through G2/M-phase arrest and inhibiting ERK and Akt activation. These findings suggest that SFN can be used as a radiosensitizer for osteosarcomas.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2010 年度	1,200,000	360,000	1,560,000
2011 年度	1,200,000	360,000	1,560,000
2012 年度	900,000	270,000	1,170,000
年度			
年度			
総計	3,300,000	990,000	4,290,000

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

キーワード：骨肉腫、線維肉腫、スルフォラファン、化学療法、放射線治療、p53 遺伝子、アポトーシス

1. 研究開始当初の背景

近年の化学療法の進歩により骨肉腫患者の生命予後は飛躍的に改善されているが、診断時に既に遠隔転移を伴っている症例、骨盤や

脊椎発生の切除不能症例、既存の化学療法に全く反応しない薬剤耐性症例などの生命予後はきわめて不良である。現在の骨肉腫治療戦略では生命予後をさらに改善することは

困難であり、新規の抗腫瘍物質の発見・開発および新規の治療法の確立が急務である。最近、癌の原因分子を標的とした分子標的治療法の高い効果が報告されており、p53 関連遺伝子は骨肉腫の標的分子として重要な遺伝子である。われわれはこれまでの研究でブロッコリーなどに含まれるイソチオシアネート類の化合物が p53 下流遺伝子である DR5 (Death receptor 5) を p53 非依存的に誘導し、リガンドである TRAIL (Tumor necrosis factor (TNF) -Related Apoptosis-Inducing Ligand) との併用で骨肉腫細胞に対し著明なアポトーシスを誘導することを *in vitro* の実験で確認した (Carcinogenesis, 2006)。また薬剤のスクリーニングに関しては、p53 が失活した骨肉腫細胞株 MG63 に p21 プロモーター領域をレポーター遺伝子とともに導入し、この細胞に種々の天然成分を投与後、細胞抽出液中の酵素活性を測定するスクリーニング方法をすでに確立し、この方法を用いて経口摂取可能なアルカロイド由来の化合物が p21 を介して骨肉腫細胞に対する抗腫瘍効果を持つことを報告した (Int J Oncol, 2007)。骨肉腫や悪性軟部腫瘍においてこのような報告はなく、これらの結果を臨床応用へと発展させ、さらに p53-RB 経路を標的とした治療を検討することを考えた。

2. 研究の目的

p53 下流遺伝子を標的分子とした化合物を用いて、正常組織には影響を与えず、腫瘍組織選択的に強力な増殖抑制効果・殺細胞作用を有する新しい骨肉腫および線維肉腫の治療戦略を確立することを本研究の目的とした。

(1) MEK 阻害剤による線維肉腫細胞に対する増殖抑制効果の検討

p53-RB 経路を標的とした悪性軟部腫瘍に対する分子標的治療の可能性を検討するために、ERK の活性化(リン酸化)を阻害する MEK 阻害剤に注目し、RAS に変異を認める線維肉腫細胞に対して増殖抑制効果と関連遺伝子の発現調節機構について検討した。

(2) マウス骨肉腫に対するスルフォラファン(SFN)の放射線増感作用の検討

ブロッコリーなどに多く含まれるイソチオシアネート類である SFN は強力な抗腫瘍効果を有する天然化合物である。マウス骨肉腫細胞株である LM8 細胞に SFN と放射線照射の併用による治療効果を検討した。

3. 研究の方法

(1) MEK 阻害剤による線維肉腫細胞に対する増殖抑制効果の検討

細胞株は線維肉腫細胞株 HT1080、MEK 阻害剤として JTP-70902 を用いた。HT1080 を 24 時

間培養後 JTP を 10-200nM の様々な濃度で暴露した。

①細胞増殖抑制の検討

JTP 暴露後 24、48 時間後に細胞を回収しトリパンブルー染色し細胞数をカウントし、コントロールと比較した

②細胞周期の解析

JTP 暴露後 24 時間で細胞を回収し、細胞周期に対する影響をフローサイトメトリーにより検討した。

③RAS-ERK-RB 経路関連遺伝子の発現変化

ウエスタンブロット法を用いて p-ERK1/2、p15^{INK4B}、cyclin D1、p21^{WAF1/CIP1}、p27^{KIP1} について検討した。

(2) マウス骨肉腫に対する SFN の放射線増感作用の検討

①増殖抑制効果の検討

対象細胞はマウス骨肉腫細胞株 (LM8) を用いた。SFN を 0 から 20 μ M の各濃度で投与し、24 時間で放射線 2Gy を照射した。放射線照射後 48 時間で細胞を回収し、トリパンブルー染色法を用いて細胞数を算出した。SFN 単独群と放射線併用群で細胞増殖数に対する影響を比較した。

②細胞周期の解析

放射線照射併用により細胞周期にどのような影響を与えるかフローサイトメトリーにより検討した。

③細胞増殖因子の解析

ウエスタンブロット法を用いて ERK およびリン酸化 ERK、Akt およびリン酸化 Akt を測定し、対照群、SFN 単独群、放射線単独群、併用群の差を比較した。

④アポトーシスの解析

ウエスタンブロット法で caspase-3 を測定した。DAPI 染色法で核の凝集、断片化を観察し、各群間の差を比較した。

4. 研究成果

(1) MEK 阻害剤による線維肉腫細胞に対する増殖抑制効果の検討

①細胞増殖抑制の検討

JTP 投与後 24 時間では 10nM 以上で濃度依存性に細胞増殖抑制に差を認めた。48 時間後ではさらに有意な差を認め、200nM ではコントロールと比較して約 20% まで細胞数の増加は抑制された。

②細胞周期の解析

200nM JTP では顕著に G1/S 期での停止が生じ、

G1/S期の細胞の割合は濃度依存性に高かった (図1)。

③RAS-ERK-RB 経路関連遺伝子の発現変化
ERK のリン酸化は濃度上昇とともに阻害された。一方、p21^{WAF1/CIP1} と p27^{KIP1} は濃度依存性に発現の増加を認めたが、p15^{INK4B} と cyclin D1 は変化がなかった (図2)。

以上の結果から、MEK 阻害剤は既存の抗腫瘍薬剤と異なる作用機序で抗腫瘍効果を得られる可能性があり、薬剤耐性線維肉腫細胞に対しても治療効果が得られることが今後期待される。

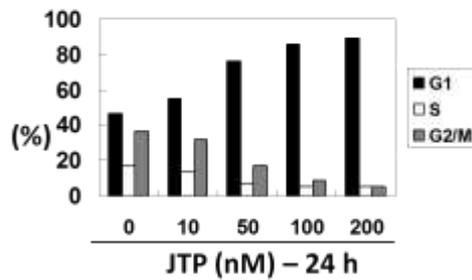


図1) 各濃度における G1/S 期の細胞の割合

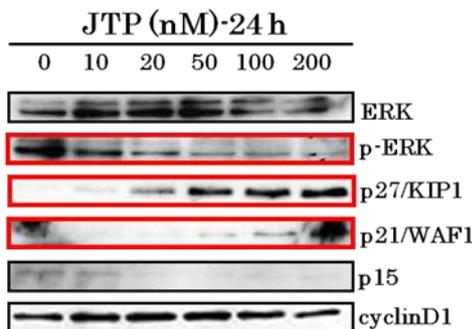


図2) RAS-ERK-RB 経路関連遺伝子の発現変化

(2) マウス骨肉腫に対する SFN の放射線増感作用の検討

①増殖抑制効果の検討

放射線を併用することにより、有意に細胞増殖を抑制した。

②細胞周期の解析

放射線併用群では G2/M 期の細胞数の増加をみとめ、subG1 期の細胞数の割合は有意に増加した。

③細胞増殖因子の解析

放射線照射により、ERK および Akt のリン酸化は増強したが、これに SFN を併用することによりその増強効果は抑制された (図3)。

④アポトーシスの解析

caspase-3 は放射線併用群で有意に活性化され、DAPI 染色ではクロマチンの凝集および断片化された核の数は増加した (図4)。

以上の結果から、SFN と放射線を併用することで、SFN が放射線感受性の高い G2/M 期の細胞停止を導いた。SFN は放射線照射による ERK および Akt のリン酸化促進を抑え、アポトーシスを誘導することにより抗腫瘍効果を増強させたと考えた。SFN は骨肉腫に対する放射線増感剤の一つとして新たな有用な治療法になりうることを示した。また、他の悪性腫瘍に対しても同様の結果を示す可能性があると考えた。

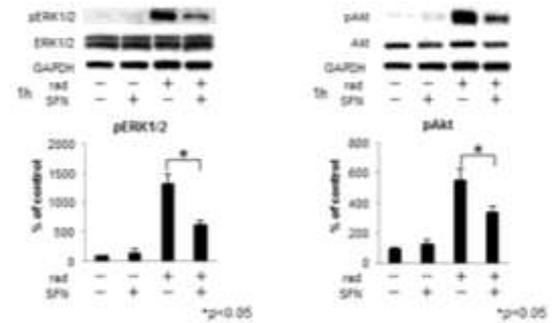


図3) ウェスタンブロット法によるリン酸化 ERK およびリン酸化 Akt に対する影響

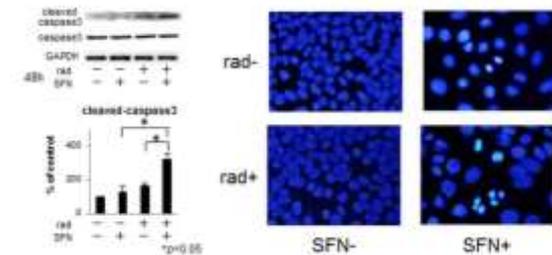


図4) caspase-3 と DAPI 染色でのアポトーシスに対する影響

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2件)

- (1) Matsui TA, Murata H, Sowa Y, Sakabe T, Koto K, Horie N, Tsuji Y, Sakai T, Kubo T. A novel MEK1/2 inhibitor induces

G1/S cell cycle arrest in human fibrosarcoma cells. Oncol Rep, 査読有, DOI: 10.3892/or_00000863, 24: 329-333, 2010.

- (2) Sawai Y, Murata H, Horii M, Koto K, Matsui T, Horie N, Tsuji Y, Ashihara E, Maekawa T, Kubo T, Fushiki S. Effectiveness of sulforaphane as a radiosensitizer for murine osteosarcoma cells. Oncol Rep, 査読有, doi: 10.3892/or.2012.2195, 29: 941-945, 2013

[学会発表] (計3件)

- (1) Matsui T, Murata H, Sakabe T, Koto K, Horie N, Sowa Y, Sakai T, Kubo T. Effect of a specific MEK inhibitor against human fibrosarcoma cells. 8th Asia Pacific Musculoskeletal Tumor Society Meeting, 2010.2.24-27, Cebu, Philippines.
- (2) 澤井泰志、村田博昭、小藤和孝、松井隆明、堀江直行、堀井基行、久保俊一：マウス骨肉腫細胞株に対する sulforaphane の放射線増感作用の検討。第27回 日本整形外科学会基礎学術集会, 2012.10.26-27, 名古屋.
- (3) Sawai Y, Murata H, Horii M, Koto K, Matsui T, Horie N, Tsuji Y, Ashihara E, Maekawa T, Kubo T, Fushiki S. Effectiveness of sulforaphane as a radiosensitizer for murine osteosarcoma cells, 2013 Annual Meeting of the Orthopaedic Research Society, 2013.1.26-29, San Antonio, USA.

6. 研究組織

(1) 研究代表者

辻 吉郎 (TSUJI YOSHIRO)

京都府立医科大学・医学研究科・客員講師
研究者番号：70453123

(2) 研究分担者

村田 博昭 (MURATA HIROAKI)

京都府立医科大学・医学研究科・客員講師
研究者番号：90360031

(3) 研究協力者

小藤 和孝 (KOTO KAZUTAKA)

明治国際医療大学・講師
研究者番号：50649340