

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 6 月 8 日現在

機関番号：24303

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2011～2013

課題番号：23592196

研究課題名(和文)ビスホスフォネートと放射線併用療法による臨床応用へ向けた骨軟部肉腫治療法の開発

研究課題名(英文)Development of new treatments against malignant bone and soft tissue tumors by using bisphosphonate and ionizing radiation

研究代表者

村田 博昭(MURATA, Hiroaki)

京都府立医科大学・医学(系)研究科(研究院)・客員講師

研究者番号：90360031

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,900,000円、(間接経費) 1,170,000円

研究成果の概要(和文)：線維肉腫細胞に対し第3世代ビスホスフォネート(BPs)と放射線の併用療法をin vitroで行い、投与方法による抗腫瘍効果を検討した結果、BPsは放射線照射によるアポトーシス誘導効果を増強し、特にBPs投与後に放射線を照射する投与方法で最も強い抗腫瘍効果を認めた。その作用機序の検討では、低濃度のBPsは放射線感受性が最も高いといわれる細胞周期G2/M期の細胞比率を増加させなかったが、放射線照射後短時間内に上昇する、AKT、ERK1/2、NF- κ Bなどの放射線応答シグナル関連タンパクの活性化を抑制した。またこの投与方法は放射線照射により線維肉腫細胞内に発生する活性酸素種の発現を増加させた。

研究成果の概要(英文)：Fibrosarcoma cells were treated with third-generation bisphosphonate (BPs) and/or ionizing radiation (IR), together or sequentially, and the antitumor effects were assessed. BPs significantly enhanced IR-induced apoptosis, especially when cells were treated with BPs followed by IR. We therefore assessed the detailed mechanism of sequential treatment with BPs and IR. Cells in G2 and M phases, the most radiosensitive phases of the cell cycle, were not increased by low concentrations of BPs. However, the levels of expression of Akt, ERK1/2, and NF- κ B proteins, all of which are related to radioadaptive resistance, were increased within a short time after irradiation with 3 Gy, and this expression was inhibited by a low concentration of BPs, which blocked the prenylation of small GTPases. This sequential treatment also increased the generation of reactive oxygen species (ROS).

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：ビスホスフォネート 軟部肉腫 放射線治療 アポトーシス 骨肉腫

1. 研究開始当初の背景

軟部肉腫は、種々の化学療法が行われているにも関わらず、Ewing 肉腫などの一部の腫瘍を除いて治療成績の著しい改善は認めず、新規薬剤を模索している状況である。

ビスフォスフォネート (bisphosphonates: BPs) は、骨吸収阻害剤として、骨粗鬆症などの骨代謝疾患に対してのみならず、種々の癌腫に抗腫瘍効果を有することが報告されている。われわれはこれまでに、骨肉腫細胞と線維肉腫細胞を用いて BPs の抗腫瘍効果とその機序について報告した。その結果、他の癌腫と比較して少量の BPs でこれらの細胞の細胞周期を S 期で停止させ、Ras 関連蛋白のプレニル化を阻害し、アポトーシスを誘導することを明らかにした (Horie N, Murata H et al. Cancer Lett, 2006. Koto K, Murata H et al. Oncol Rep, 2010)。さらに、種々の抗癌剤と BPs の併用療法を検討し、種々の抗癌剤と BPs は相乗もしくは相加効果を示すことを明らかにし、P 糖蛋白高発現株に対して併用療法により耐性克服可能であることについても明らかにした (Horie N, Murata H et al. Br J cancer, 2007)。

一方、*in vivo* では BPs 単独投与でも骨肉腫原発巣のみならず転移巣に対しても腫瘍縮小効果が得られた (Koto K, Murata H, Cancer Lett. 2009)。しかし、BPs は投与後速やかに骨のハイドロキシアパタイト (HA) へ移行するために、軟部肉腫に対し実際に臨床使用した場合には、十分量の BPs に暴露されない懸念がある。したがって、治療効果を高めるためには他の治療との併用が必要であると考えた。

併用療法としてはこれまでにいくつかの癌腫で放射線療法と BPs の併用で相乗的な抗腫瘍効果が得られたとの報告があり、われわれも骨肉腫細胞に対して BPs と放射線の併用で殺細胞効果が増強することを明らかにした (Ryu K, Murata H et al. Anticancer Res. 2010)。

2. 研究の目的

軟部肉腫に対して BPs と放射線の併用による抗腫瘍効果を検討し、最も抗腫瘍効果の得られる放射線との併用療法の具体的な治療方法の検討とその作用機序の解明を行うことを本研究の目的とした。

3. 研究の方法

(1) 軟部肉腫に対する BPs と放射線療法の併用効果の検討

放射線照射量と BPs の投与量ならびに暴露方法 (順序、投与時間) の検討

線維肉腫細胞株 HT1080 に対して種々の線量の放射線を照射し、72 時間後の Half-maximal

inhibitory concentrations (IC_{50}) を MTT assay 法を用いて測定する。BPs はゾレドロン酸 (ZOL) を用いた。

ZOL 単独投与群、放射線単独照射群、ZOL と放射線併用群 (同時投与群: CE 群、ZOL 投与 24 時間後に放射線照射する群: SE1 群、放射線照射 24 時間後に ZOL を投与する群: SE2 群)、それぞれの増殖抑制効果、殺細胞効果を MTT assay 法、フローサイトメトリーを用いて各群間で比較検討する。各群、ZOL の暴露時間は 24 時間で統一するため、投与後 24 時間で培養液を交換する。

(2) 併用効果の機序解明

(5 群間でコントロールと比較し、最も併用効果のあった群についてその機序を検討する。)

i) 細胞周期の解析

フローサイトメトリーを用いて細胞周期解析を行う。細胞周期関連タンパクに関して Western blot 法を用いて検討する。

ii) 放射線応答としての抗アポトーシス効果に対する BPs の効果

放射線照射により細胞生存シグナルの一部が活性化される放射線応答シグナルに関与する蛋白のリン酸化や NF- κ B の転写活性を、ZOL が抑制できるか、Luciferase reporter assay、Western blot 法等で検討する。

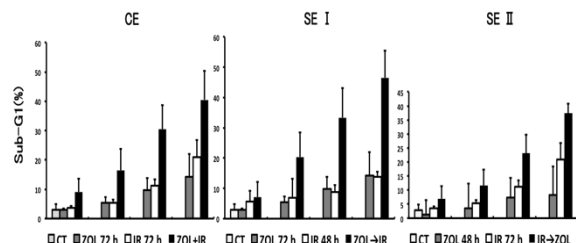
iii) 細胞内活性酸素種 (reactive oxygen species: ROS) の発生増強効果

放射線による細胞死は ROS が大きく関与していることも報告されており、ROS 発生に対する N-BPs の影響について、ROS により特異的に発色する DCFH-DA を用いてフローサイトメトリーで検討する。N-acetyl cystein を用いて ROS の抑制実験も行う。

4. 研究成果

(1) 軟部肉腫に対する BPs と放射線療法の併用効果の検討

放射線照射 72 時間での IC_{50} 値は 4.08Gy であった。以後 IC_{50} 値以下の濃度で検討した。ZOL、放射線単独群と比較し、併用群では有意に増殖抑制効果を認めた。併用群において、殺細胞効果は SE1 群で最も強かった (図 1)。



(図 1)

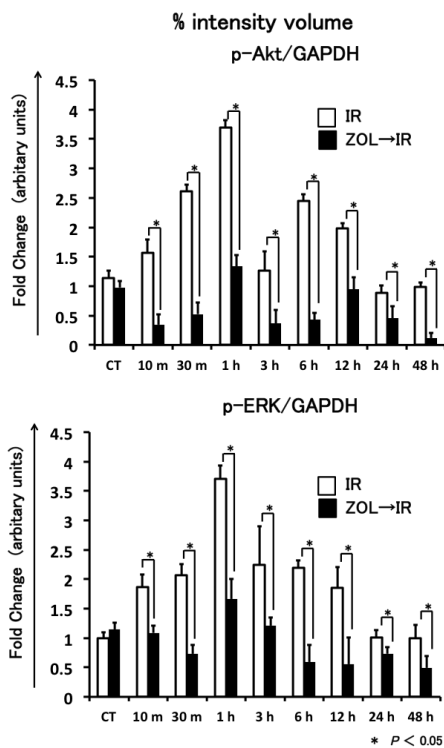
(2) 併用効果の機序解明

i) 細胞周期の解析

HT1080 を ZOL に 24 時間暴露したところ、放射線感受性が高い G2/M 期の細胞比率は増加しなかった。また、cyclinB1 や cdc2 の変化も認めなかった。

ii) 放射線応答としての抗アポトーシス効果に対する BPs の効果

ZOL への暴露により、Akt および ERK1/2 のリン酸化は抑制された。3.0Gy の放射線照射後 10 分から 48 時間の間で Akt および ERK1/2 のリン酸化を Western blot 法で検討したところ、放射線照射後 1 時間をピークとし 24 時間以内ではこれらタンパクのリン酸化亢進を認めた。ZOL1.2 μM を 24 時間 pretreatment することでこれらタンパクのリン酸化は抑制された。Akt および ERK1/2 の inhibitor 投与 24 時間後に放射線照射を行ったところ、Sub-G1 期の細胞比率は増強した (図 2)。また NF-κB の luciferase reporter assay では、放射線照射により NF-κB の転写活性は亢進したが、ZOL1.2 μM の pretreatment により転写活性は抑制された。

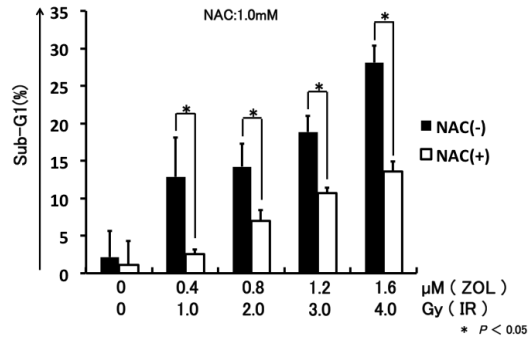


(図 2)

iii) 細胞内活性酸素種 (reactive oxygen species: ROS) の発生増強効果

SE1 (ZOL1.2 μM、放射線 3.0Gy) 療法により細胞内 ROS の産生は相乗的に増加した。N-Acetylcystein により細胞内 ROS を抑制したところ SE1 により増加した Sub-G1 期の細胞比率は抑制された (図 3)。

N-Acetylcystein (NAC)



(図 3)

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)

Koto K, Murata H, Kimura S, Sawai Y, Horie N, Matsui T, Ryu K, Ashihara E, Maekawa T, Kubo T, Fushiki S. Zoledronic acid significantly enhances radiation-induced apoptosis against human fibrosarcoma cells by inhibiting radioadaptive signaling. *Int J Oncol*, 査読有, 42:525-534, 2013, doi: 10.3892/ijo.2012.1735. Epub 2012 Dec 12

〔学会発表〕(計 6 件)

Murata H, Koto K, Sawai Y, Matsui TA, Horie N, Fushiki S, Kimura S, Maekawa T, Horii M, Kubo T. The third-generation bisphosphonate shows combined effects with anti-tumor drugs in human fibrosarcoma cells. *International Society of Limb Salvage 17th General Meeting 2013.9.11-13, Bologna, Italy*

Koto K, Murata H, Matsui TA, Horie N, Sawai Y, Ashihara E, Kimura S, Maekawa T, Fushiki S, Horii M, Kubo T. Zoledronic acid significantly enhances radiation-induced apoptosis against human fibrosarcoma cells by inhibiting radioadaptive signaling. *International Society of Limb Salvage 17th General Meeting 2013.9.11-13, Bologna, Italy*

小藤和孝, 堀井基行, 村田博昭, 松井隆明, 堀江直行, 澤井泰志, 久保俊一: 線維肉腫細胞株に対するゾレドロン酸と放射線の併用による細胞内シグナル伝達経路への影響の検討, 第 27 回日本整形外科学会基礎学術集会,

2012.10.26-27, 名古屋

Koto K, Murata H, Sakabe T, Matsui TA, Horie N, Sawai Y, Ashihara E, Kimura S, Maekawa T, Fushiki S, Kubo T. Combined effects of the Third-Generation Bisphosphonate and Radiation on Fibrosarcoma Cells. 13th EFORT Congress 2012.5.25, Berlin, Germany

小藤和孝, 村田博昭, 坂部智哉, 大島康史, 松井隆明, 堀江直行, 澤井泰志, 久保俊一: 線維肉細胞株に対するゾレドロン酸と放射線の併用によるアポトーシス誘導効果および細胞内シグナル伝達経路への影響の検討, 第 26 回日本整形外科学会基礎学術集会, 2011.10.21, 前橋

小藤和孝, 村田博昭, 坂部智哉, 松井隆明, 堀江直行, 澤井泰志, 久保俊一: 線維肉細胞株に対する第3世代ビスフォスフォネートと放射線の併用による抗腫瘍効果の検討, 第 44 回日本整形外科学会骨・軟部腫瘍学術集会, 2011.7.14-15, 京都

6. 研究組織

(1) 研究代表者

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

(2) 研究分担者

小藤 和孝 (KOTO Kazutaka)
明治国際医療大学・公私立大学の部局等・講師
研究者番号: 50649340

(3) 連携研究者

前川 平 (MAEKAWA Taira)
京都大学大学院・医学研究科・教授
研究者番号: 80229286

木村 晋也 (KIMURA Shinya)
佐賀大学・医学部・教授
研究者番号: 80359794

芦原 英司 (ASHIHARA Eishi)
京都薬科大学・薬学部・教授
研究者番号: 70275197