

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 6 月 26 日現在

機関番号：32202

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2012～2015

課題番号：24592243

研究課題名(和文)色素上皮由来因子による新規軟骨肉腫治療法の検討

研究課題名(英文)The study of novel chondrosarcoma therapy by PEDF

研究代表者

秋山 達(Akiyama, Toru)

自治医科大学・医学部・准教授

研究者番号：40376471

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,200,000円

研究成果の概要(和文)：軟骨肉腫は骨原発性悪性腫瘍である。悪性腫瘍の進展には血管新生が必須であり、血管新生阻害因子は抗がん効果を持つ分子標的薬として使用され始めている。さらに、骨環境で腫瘍が進展するためには生体内で唯一骨破壊をおこしうる破骨細胞を誘導することが必須とされる。我々は本研究において生体内で最大の血管新生阻害効果を持つ色素上皮由来因子が軟骨肉腫による破骨細胞誘導活性効果を阻害することを発見した。色素上皮由来因子は既存の分子標的薬が示す副作用が非常に少ない可能性がある上に、軟骨肉腫には有効な化学療法剤がなく、我々の研究によって軟骨肉腫に対する新規化学療法剤になりうる可能性があることが示された。

研究成果の概要(英文)：Chondrosarcoma is a primary malignant bone tumor. Malignant tumor requires angiogenesis induction for its development. Bone tumor requires surrounding bone destruction for their development as well. Osteoclast is the sole cell controlling bone destruction. Pigment epithelium-derived factor(PEDF) is the strongest anti-angiogenesis factor in human body. Our team found the effect of PEDF to suppress not only angiogenesis but also osteoclast function. PEDF suppressed the osteoclast function supported by chondrosarcoma cell line. Our data suggested that PEDF was the powerful candidate of anti-chondrosarcoma agent.

研究分野：骨軟部腫瘍

キーワード：色素上皮由来因子 軟骨肉腫 破骨細胞 抗がん剤 骨代謝 血管新生阻害因子

1. 研究開始当初の背景

研究の学術的背景(本研究に関連する国内・国外の研究動向及び位置づけ、応募者のこれまでの研究成果を踏まえ着想に至った経緯、これまでの研究成果を発展させる場合にはその内容等)

軟骨肉腫は骨原発の悪性腫瘍の中で骨肉腫に次いで2番目に発生頻度の高い悪性腫瘍であり、骨原発悪性腫瘍のおよそ20%を占める。骨肉腫の治療は、1970年代以降の多剤併用による全身化学療法の導入、そしてCT、MRIなどの画像診断技術の発達により、治療成績が飛躍的に向上し、5年生存率は70年代の10%台から現在は約70%にまで高まった。しかし、軟骨肉腫においては、化学療法、放射線療法は一般的には無効であり、治療としては未だに外科的切除のみに頼らざるを得ないのが現状である。他の腫瘍領域と同様に様々な基礎研究、臨床研究が行われているにも関わらず、治療成績の向上に繋がる革新的な治療法の進歩はなく、組織学的悪性度が高いGrade2、Grade3では50%程度と低い。軟骨肉腫の予後は、局所での再発コントロールや転移の有無等により大きく左右されるが、現在これらをコントロールできる手術以外の有効な治療法はない。そのため、治療成績の向上のためには、これまでにない新たな展開が期待されている。軟骨肉腫の場合は、局所浸潤・転移のコントロールを行うことが、予後を改善するために最も重要であり、これらを改善する新たな化学療法剤の開発が強く望まれる。

腫瘍の局所における進展、局所浸潤、転移巣形成には血管新生と呼ばれる周囲組織からの血管誘導が必要不可欠である(Fox S et al., *The Lancet Oncology*, 2001)。近年、分子標的薬の発達によりVEGFなどの血管新生誘導因子やその受容体を標的としたアパスチンといった薬剤も出現しているが軟骨肉腫への有効性についてはいまだに検討されていない。

また、原発性骨悪性腫瘍である軟骨肉腫は、多くが骨内に発生するという特徴を持つ。軟骨肉腫が原発巣を拡大し、周囲組織へ浸潤し、遠隔転移を行うためには周囲の骨を破壊することが必要である。よって、軟骨肉腫治療において骨破壊を阻害することは、生命予後の改善に繋がる可能性がある。悪性腫瘍の骨転移において、腫瘍細胞自体は骨を直接破壊することはできないとされている。骨基質を破壊し進展するためには、腫瘍周囲に生体内で唯一骨基質を吸収する細胞である破骨細胞を誘導する必要がある(Mundy G R., *Nat Rev Cancer*, 2002)。原発性骨悪性腫瘍である軟骨肉腫が骨破壊するためにも破骨細胞を腫瘍周囲に誘導することが必須である可能性がある。応募者らはこれまでに世界で初めてマウス軟骨肉腫骨内発生モデルを完成させており、そこから得られた知見によると軟

骨肉腫は腫瘍周囲に破骨細胞を誘導していた(Clark J, Akiyama T, et al; *Cancer Cell Int*, 2010)。破骨細胞を標的とした転移性骨腫瘍治療薬としてはゾレンドロネート酸(商品名:ゾメタ)などのビスホスホネート製剤が臨床応用されている。ゾメタは乳癌骨転移患者においては有意に病的骨折などの骨関連事象の発現を抑制することが明らかになっている。しかし、軟骨肉腫治療への応用については報告されていない。

以上の背景から、応募者らはPEDFに注目した。PEDFは生体内で最大の血管新生阻害効果を示す増殖因子である。さらに応募者はPEDFが破骨細胞の分化・生存・骨吸収を抑制することをすでに見出し、報告している(Akiyama T et al., *Biochem Biophys Res Commun*, 2010)。

また、PEDFは卵巣癌腫瘍細胞や前立腺癌腫瘍細胞に対して直接増殖を阻害しアポトーシスを誘導する効果を持つ。(Lydia T et al., *Endocrinology*, 2006, Filleur S et al., *Cancer Res*, 2005)

よって、PEDFは血管新生と破骨細胞誘導という複数の因子を阻害することにより腫瘍成長を抑制するだけでなく、腫瘍細胞に直接作用して軟骨肉腫に対して治療効果を発揮する可能性があると考えられた。

2. 研究の目的

本研究の目的は色素上皮由来因子(pigment epithelium-derived factor 以下PEDF)の軟骨肉腫治療効果の検討である。

3. 研究の方法

【軟骨肉腫組織からの細胞株の樹立】
細胞株の樹立： 当院倫理委員会からの許可と患者様からの研究協力へのインフォームドコンセントを得た上で、当科において軟骨肉腫症例の切開生検、広範切除術あるいは肺転移切除時に採取される組織から腫瘍細胞を培養し、独自の細胞株の樹立を行う。細胞株の樹立法としては不死化能獲得細胞を選別する方法である3T3 methodを使用する予定である。StVから供与を受けるサンプルについてもStVの倫理委員会からの許可を受けたうえで同様の研究を行う。

【軟骨肉腫腫瘍細胞による破骨細胞支持能にPEDFが与える効果の検討】
破骨細胞分化・生存・骨吸収に対するPEDFの効果の解析は以下のように行う： マウスより採取した骨髄細胞をRANKL存在下で培養・分化させる実験系に、PEDFを添加し、破骨細胞分化を解析する。本実験系で得られた成熟破骨細胞にPEDFを各種濃度添加し、添加後24時間の破骨細胞数を添加時の破骨細胞数と比較して、生存率を解析する。さらに成熟破骨細胞をハイドロキシアパタイトコ

ートディッシュ上に播き、PEDF を各種濃度添加する。48 時間後に骨吸収窩を計測する。以上の実験を各軟骨肉腫細胞株培養上清を培養液として使用して実験し、軟骨肉腫腫瘍細胞の破骨細胞誘導活性能に対する PEDF の効果を検討する。

使用する細胞は先に軟骨肉腫サンプルより樹立された細胞株と、これまでに入手された軟骨肉腫細胞株である OUMS27、JJ012、FS090 の 3 種類を用いる。

【軟骨肉腫腫瘍細胞の血管新生能に対する PEDF の効果の検討】

血管内皮系細胞株である HMEC-1 をマトリゲルコートディッシュ上で培養する。培養液は各軟骨肉腫細胞株の培養上清に PEDF を加えたものと加えないものを用いる。HMEC-1 は播種後すぐに血管を模した管腔形成を始める。1 時間ごとの管腔形成数を播種後 8 時間の時点まで計測し、PEDF の血管新生に対する効果を検討する。

【軟骨肉腫由来細胞の腫瘍原生に対する PEDF の効果の検討】

使用する細胞は先に軟骨肉腫サンプルより樹立された細胞株と、これまでに入手された軟骨肉腫細胞株である OUMS27、JJ012、FS090 の 3 種類を用いる。PEDF の直接的腫瘍細胞抑制効果の確認を行う。また血管新生促進因子である VEGF など各種サイトカインの発現レベルと PEDF の効果の関連性を以下の方法で検討する。

1) 接着非依存性の解析： 通常の細胞は血液中に浮遊するとアポトーシスと呼ばれる細胞死に陥るが、腫瘍細胞が原発巣から転移するためには血液中に浮遊しても細胞が生存し続ける必要がある。この接着非依存性解析のために次項にあげる 2 つの実験系を用いて解析する。

1: poly-HEMA コートディッシュを使用した細胞浮遊実験、2: コラーゲンゲル培地におけるコロニー形成実験。いずれの方法でも培地に PEDF を添加して解析する。

細胞浮遊実験系は細胞の回収が容易であるので、細胞を回収し、RT-PCR と Western blotting による mRNA とタンパク発現の解析に使用する。解析対象タンパクはおもにアポトーシス関連タンパクである。コロニー形成法は接着非依存性のみならず転移能における細胞増殖能力ならびに組織侵入能も反映しているため、転移能をよく反映する。

2) 増殖能の解析： PEDF 添加後 72 時間まで 24 時間おきに MTT アッセイ法により解析する。

3) 局所侵入能の解析： 局所侵入能は細胞の移動能力である遊走能と組織分解能によって決定される。この二つの能力を、以下の方法で解析する。

遊走能の解析： Boyden chamber 法と scraping assay 法を用いて解析する。

組織分解能の解析： マトリゲルコートディッシュによる invasion assay 法を用いて解析する。

組織分解には通常マトリックスメタロプロテアーゼ (MMPs)-2, 9 が関与するので、軟骨肉腫の転移において重要であるとされる MMP-2, 9 の産生と活性化を zymography assay にて解析する。

細胞浮遊実験系は細胞の回収が容易であるので、細胞を回収し、RT-PCR と Western blotting による mRNA とタンパク発現の解析に使用する。解析対象タンパクはおもにアポトーシス関連タンパクである。コロニー形成法は接着非依存性のみならず転移能における細胞増殖能力ならびに組織侵入能も反映しているため、転移能をよく反映する。

2) 増殖能の解析： PEDF 添加後 72 時間まで 24 時間おきに MTT アッセイ法により解析する。

3) 局所侵入能の解析： 局所侵入能は細胞の移動能力である遊走能と組織分解能によって決定される。この二つの能力を、以下の方法で解析する。

遊走能の解析： Boyden chamber 法と scraping assay 法を用いて解析する。

組織分解能の解析： マトリゲルコートディッシュによる invasion assay 法を用いて解析する。

組織分解には通常マトリックスメタロプロテアーゼ (MMPs)-2, 9 が関与するので、軟骨肉腫の転移において重要であるとされる MMP-2, 9 の産生と活性化を zymography assay にて解析する。

【マウス骨内軟骨肉腫実験系を用いた PEDF 治療効果の検討】

マウス骨内軟骨肉腫実験系は応募者が StV に留学中に研究協力者である Choong 教授が主催する研究チームの一員として開発に携わったものである。本モデルは世界で初めて骨内で生育し、骨破壊とともに肺転移を起こす軟骨肉腫マウスモデルである。軟骨肉腫の多くは骨内に発生するため、本モデルは軟骨肉腫骨の治療研究に必須のマウスモデルである。本マウスモデルの運用実績は現在われわれの研究チームしか持っていない。本モデルではマウス脛骨に軟骨肉腫腫瘍細胞を移植してから 8 週間の時点で移植脛骨の腫瘍性骨破壊と微小肺転移を起こすものである。

よって、軟骨肉腫症例サンプルより樹立された骨肉腫細胞株と JJ012 をヌードマウスの脛骨に移植し、移植後 8 週間の時点でマウスを屠殺して解析する予定である。

最適な PEDF 投与法を検討するため、1: 皮下注、2: 経静脈的投与、3: 経腹膜の投与法により PEDF を投与し、各細胞株移植マウスを PEDF 投与群と非投与群に分けて以下の項目について検討する

1: 体表より計測した腫瘍体積増加、2: 単レントゲンならびにマイクロ CT による骨破壊の評価、3: 組織切片による治療効果判定、4: 組織切片による腫瘍周囲に誘導された破骨細胞数の計測、5: 組織切片による腫瘍周囲に誘導された新生血管数の計測、6: 組織切片による肺転移数の計測、7: 生存曲線、8:

屠殺時に血液生化学的検査、腫瘍移植部と主要臓器の組織学的解析を行い、PEDF の効果と副作用を検討する。

【マウス骨内軟骨肉腫実験系を用いた既存の治療法に対する PEDF の影響の検討】

PEDF を投与することでこれまでほかの骨原発肉腫に用いられている抗悪性腫瘍剤に感受性を持つ可能性を検討する。PEDF をアドリアマイシン、イホマイド、シスプラチンと同時に投与し、マウス骨内軟骨肉腫実験系と同様の解析を行い、生体内における PEDF との相互作用を解析する。

【ヌードマウス皮下移植モデルとマウス軟骨肉腫実験系を用いた骨外腫瘍に対する PEDF 治療効果の検討】脛骨モデル解析後、PEDF の効果が骨環境依存性であるかどうかの検討を以下の方法で行う。1：皮下に腫瘍細胞を移植し、破骨細胞の存在しない軟部でも PEDF が効果を発揮するかどうか解析する。2：脛骨モデルで肺転移発生後に PEDF の投与を開始し、肺環境に存在する腫瘍に対しても PEDF が抗腫瘍効果を発揮するかどうかを解析する。

解析内容はマウス骨内軟骨肉腫実験系の解析内容に準ずる。

4．研究成果

我々は本研究において生体内で最大の血管新生阻害効果を持つ色素上皮由来因子が軟骨肉腫による破骨細胞誘導活性効果を阻害することを発見した。

我々の基礎データでは色素上皮由来因子はマウスにおいては抗がん効果を示す量を投与しても全く副作用を発現せず、既存の分子標的薬が示す副作用が非常に少ない可能性が示された。さらに、軟骨肉腫には有効な化学療法剤がなく、我々の研究によって軟骨肉腫に対する新規化学療法剤になりうる可能性があることが示された。

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 0 件)

〔学会発表〕(計 1 件)

“ The PEDF suppresses osteoclast differentiation, bone resorption activity and survival via osteoprotegerin induction ” Toru Akiyama et al., The American Society for Bone and Mineral Research 2012 Annual Meeting

〔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：
出願年月日：
国内外の別：

取得状況 (計 0 件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
取得年月日：
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

秋山 達 (AKIYAMA, Toru) (自治医科大学・医学部・准教授)

研究者番号：40376471

(2)研究分担者

税田 和夫 (SAITA, Kazuo) (自治医科大学・医学部・非常勤講師)

研究者番号：20241995

(3)連携研究者

()

研究者番号：