

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 5 月 30 日現在

機関番号：15301

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2013～2015

課題番号：25670650

研究課題名(和文)肉腫の薬剤耐性獲得機序の解明

研究課題名(英文) Identification of proteins for multi-drug resistance in bone and soft tissue sarcoma

研究代表者

尾崎 敏文(Ozaki, Toshifumi)

岡山大学・医歯(薬)学総合研究科・教授

研究者番号：40294459

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,700,000円

研究成果の概要(和文)：悪性腫瘍治療における最大の問題は、薬剤耐性を獲得している場合、その薬剤による治療効果が期待できないことである。特に悪性肉腫の領域では未だ解明されていない部分が多い。本研究では、網羅的タンパク質分析法を用いて薬剤耐性細胞株におけるタンパク質発現を定量解析し、リアルタイムに発現タンパク質の変動を検出することを目的とした。骨肉腫細胞株において薬剤耐性細胞株を作製し、親株、耐性株各株について、8-plex iTRAQ安定同位体標識を使用して、サンプル間相対定量を行った。全体で3000のタンパクを同定可能であった。これらの手法によって、薬剤耐性の機序に関与するタンパクを見出すことが可能であった。

研究成果の概要(英文)：Chemoresistance is a poor prognostic factor in osteosarcoma and is a major obstacle to the successful treatment of patients receiving chemotherapy. However, the precise mechanism of resistance remains unclear. In this study, a pair of osteosarcoma cell lines, MNNG/HOS, U2OS and its adriamycin-resistant counterpart MNNG/HOS-ADR and U2OS/ADR were used to examine resistance-dependent cellular responses and to identify potential chemotherapeutic resistant targets. About three thousand proteins were identified in this study.

研究分野：骨軟部腫瘍

キーワード：骨肉腫 薬剤耐性 質量分析

1. 研究開始当初の背景

骨肉腫は原発性悪性骨腫瘍のなかで最も発生頻度が高い腫瘍である。系統的化学療法の導入前の 1970 年代には、患肢切断後も多くの患者が続発する肺転移により死亡し、5 年生存率は 10-15%であった。しかし、近年では術前・術後の化学療法を行うことにより患肢温存手術が可能となり 5 年生存率が 60-70%まで向上してきている。ただし、未だに救命できない治療困難例が存在するのが現状である。

化学療法において、初診時から、あるいは治療経過に伴い、多くの化学療法薬剤が無効になる現象(薬剤耐性)に遭遇することがあり、その場合治療上の大きな障壁となる。代表的な多剤耐性遺伝子として Multidrug resistance 1(MDR1)がある。MDR1 の遺伝子産物である P 糖蛋白は各種抗腫瘍薬の細胞外への排出機能を有すトランスポーターである。骨肉腫における MDR1 や P 糖蛋白の発現については、化学療法の効果や予後と相関するという報告もあるが、否定的な報告もあり、その他の多剤耐性遺伝子も関与している可能性がある。

2. 研究の目的

骨・軟部肉腫患者の中には、化学療法や放射線療法抵抗性を示し、予後不良となる症例が存在する。本研究では、新しいタンパク質分析法である SILAC(Stable isotope labeling using amino acids in cell culture)法を用いて薬剤耐性細胞株におけるタンパク質発現を網羅的定量解析し、リアルタイムに発現タンパク質の変動を検出することを目的とする。

3. 研究の方法

(1) 薬剤耐性骨肉腫細胞株の作成と薬剤耐性能の評価

骨肉腫細胞株培養液にアドリアマイシン、シ

スプラチン、メソトレキセートを添加し細胞を薬剤に馴化させて、薬剤耐性細胞株を作製する。薬剤耐性の評価には、MTT assay を用いる。

(2) 耐性薬剤投与時の細胞株のタンパク質解析

薬剤投与時の DMEM に馴化させてある各種抗がん剤耐性骨肉腫細胞株 (U2OS, MNNG/HOS) を SILAC DMEM, 10% Dialyzed FBS, 0.1 mg/ml $^{13}\text{C}_6\text{L}$ -Lysine-2HCl (Heavy) または L-Lysine-2HCl (Light) で 6 代継代培養 (10 日間) して、細胞に同位体を完全に取り込ませる。 $^{13}\text{C}_6\text{L}$ -Lysine 標識細胞を 24 時間 5 μM camptothecin で処理した後、双方の細胞を回収して、混合した細胞ライセートの SDS-PAGE を行い、バンド切り出し、ゲル内トリプシン消化、LCMS/MS 解析を行う。タンパク質発現量について、Heavy/Light 比が大きい (Heavy 細胞で発現増加している) タンパク質について the International Protein Index database (IPI: Human, V3.18) を用い SEQUEST program で同定した。当初、SILAC 法を用いたタンパク質分析法のみを用いる予定であったが、複数の細胞株の比較を行うため、定量解析に最適な安定同位体標識キットである iTRAQ[®] 試薬を用いて、網羅的なタンパク質の発現解析を行い複数の骨肉腫細胞株間での比較解析を行った。

4. 研究成果

(1) 薬剤耐性骨肉腫細胞株の作成と薬剤耐性能の評価

各細胞株ごとにアドリアマイシン耐性株では 1 μM 以上、シスプラチン耐性株では 100nM 以上、メソトレキセート耐性株 10 μM 以上の IC50 を示し、各抗がん剤に耐性の細胞株を得た。

(2) 耐性薬剤投与時の細胞株のタンパク発現解析

アドリアマイシン耐性骨肉腫細胞株 (MNNG/HOS, U2OS) 株についてタンパク発現解析を行った。

親株, 耐性株各株について, アドリアマイシン添加群, 非添加群でタンパク回収し, 8-plex iTRAQ 安定同位体標識を使用して, サンプル間相対定量を行った。全体で 3000 のタンパクを同定可能であった。耐性株において, 既知の ABC 輸送タンパクである ABCB1 などの発現亢進を認めた。その他の発現タンパクは現在検討中である。

これらの手法によって, 薬剤耐性の機序に関与するタンパクを見出すことが可能であった。

結語

骨肉腫患者の予後に関して, 化学療法の奏効性は重要なファクターである。化学療法が奏効する症例では, 肺転移の発生が抑制され長期予後が得られる。反面, 化学療法の効果が不十分, あるいは認められない場合には, 肺転移を生じる危険性が高くなるほか, 局所の腫瘍が増大し, 患肢温存術が困難となり, 四肢の切離断術を行わざるを得ない場合も生じる。本研究により, 骨肉腫細胞の薬剤耐性に関与しているタンパク質を同定することが可能となれば, そのタンパク質の合成を阻害することにより薬剤耐性を減少させ, 化学療法の感受性が向上し, 治療予後の改善も期待できる。臨床分野において, 薬剤感受性の亢進を目的とした, 効率的な抗癌剤投与と治療効果をもたらす可能性がある。

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 4 件)

1. Ozaki T. Diagnosis and treatment of Ewing sarcoma of the bone: a review article. J Orthop Sci. 20(2): 250-263, 2015, 査読有
2. Ogura K, Fujiwara T, Yasunaga H, Matsui H, Jeon DG, Cho WH, Hiraga H, Ishii T, Yonemoto T, Kamoda H, Ozaki T, Kozawa E, Nishida Y, Morioka H, Hiruma T, Kakunaga S, Ueda T, Tsuda Y, Kawano H, Kawai A. Development and external validation of nomograms predicting distant metastases and overall survival after neoadjuvant chemotherapy and surgery for patients with nonmetastatic osteosarcoma: A multi-institutional study. Cancer. 121(21): 3844-3852, 2015, 査読有
3. 国定 俊之, 武田 健, 藤原 智洋, 魚谷 弘二, 杉生 和久, 尾崎 敏文:【整形外科領域における集学的診療体制の構築】整形外科腫瘍領域(肉腫)における集学的治療(解説/特集) 整形・災害外科 58(3), 303-313, 2015, 査読無
4. 武田 健, 藤原 智洋, 国定 俊之, 尾崎 敏文: [骨腫瘍の診断と治療] 化学療法 Ewing 肉腫に対する化学療法(解説/特集) 関節外科 34(4), 338-343, 2015, 査読無

[学会発表](計 0 件)

[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

<http://www.okayama-u.ac.jp/user/med/orthop/japanese/index.htm>

6 . 研究組織

(1)研究代表者

尾崎 敏文 (OZAKI TOSHIFUMI)

岡山大学・医歯(薬)学総合研究科・教授

研究者番号：40294459

(2)研究分担者

杉原 進介 (SUGIHARA SHINSUKE)

独立行政法人国立病院機構四国がんセンター（臨床研究センター）・研究員

研究者番号：60314671

武田 健 (TAKEDA KEN)

岡山大学・医歯(薬)学総合研究科・助教

研究者番号：70614923