



Synergistic Effects of a Smac Mimetic with Doxorubicin Against Human Osteosarcoma

Kamata, Etsuko

(Degree)

博士（医学）

(Date of Degree)

2018-03-25

(Resource Type)

doctoral thesis

(Report Number)

甲第7054号

(URL)

<https://hdl.handle.net/20.500.14094/D1007054>

※ 当コンテンツは神戸大学の学術成果です。無断複製・不正使用等を禁じます。著作権法で認められている範囲内で、適切にご利用ください。



(課程博士関係)

学位論文の内容要旨

Synergistic Effects of a Smac Mimetic with Doxorubicin Against Human Osteosarcoma

ヒト骨肉腫に対する Smac 模倣薬とドキソルビシンの併用効果

神戸大学大学院医学研究科医科学専攻
整形外科学

(指導教員：黒田 良祐 教授)
蒲田 悅子

はじめに

骨肉腫は若年者に好発する骨原発悪性腫瘍である。現在の治療で約70%の患者は長期予後を獲得しているが、この20年間治療法に大きな進歩はなく、新たな治療戦略が望まれる。アポトーシスは細胞のホメオスタシスに必要不可欠な経路であり、様々ながん種において抗アポトーシス因子 (Inhibitor of Apoptosis Proteins (IAPs)) の過剰発現がアポトーシスを抑制することでその腫瘍増生に寄与していることが知られている。

Smac (second mitochondria-derived activator of caspase) は、アポトーシス誘導時にミトコンドリアから細胞質に放出され、IAPsのアンタゴニストとして機能し、カスパーゼの活性化を介してアポトーシスを促進する作用を有する。近年、腫瘍治療薬としてSmac模倣薬の開発、治験がすすめられており、様々ながん種に対して単剤使用や従来の化学療法との併用での抗腫瘍効果が多く報告されている。しかしながら、骨肉腫におけるIAPsあるいはSmacの役割について注目した報告はほとんどない。

今回我々はヒト骨肉腫細胞に対するSmac模倣薬AT-406のドキソルビシンとの併用による抗腫瘍効果について、IAPsの一つであるcIAP1に着目し、in vitroおよびin vivoで検討した。

方法

ヒト骨肉腫細胞株に対するSmac模倣薬AT-406のドキソルビシン (DOX) との併用による抗腫瘍効果についてのin vitroでの検討

ヒト骨肉腫細胞株KHOSおよびMG63に対するSmac模倣薬AT-406とドキソルビシン (DOX) の抗腫瘍効果について、それぞれ単独または併用で作用させ、24, 48, 72時間後の生細胞率をWST assayで評価した。アポトーシス活性についてはFACS、蛍光免疫染色による解析を行った。さらにcIAP1, caspase-8およびcaspase-3, PARPの発現についてImmunoblot法で検討した。

ヒト骨肉腫細胞皮下移植モデルマウスに対するSmac模倣薬AT-406のDOXとの併用による抗腫瘍効果についてのin vivoでの検討

週齢5週のオスBALB/cヌードマウスの背部皮下にKHOS細胞株を移植しモデルマウスを作成した。AT-406 (50mg/kg) 単独投与群、DOX (3mg/kg) 単独投与群、AT-406/DOX併用群、コントロール群の4群に分け、週2回、2週間腹腔内投与による治療を行った。定期的に腫瘍径と体重を計測した。治療終了時に移植腫瘍を採取し、腫瘍内アポトーシス活性についてFACSおよび蛍光免疫染色にて評価し、cIAP1, caspase-8およびcaspase-3, PARPの発現についてImmunoblot法で検討した。

統計学的解析

2群間の比較にはt検定を用い、多群間の比較にはANOVA post hoc検定を用いた。p<0.05を統計学的に有意差ありとした。

結果

Smac模倣薬AT-406はヒト骨肉腫細胞株に対し、in vitroにおいてドキソルビシンと併用することで抗腫瘍効果が増強した。

WST assayによる生細胞率の評価では、KHOS、MG63両細胞株において、AT-406/DOX併用群でコントロール群およびそれぞれの単独群に比較して投与24時間後より有意に生細胞率が減少し、濃度・時間依存性の抗腫瘍効果を示した (Fig. 1A, 1B)。FACSによる検討では、AT-406/DOX併用群においてそれぞれの単独群よりも強いアポトーシスの亢進をみとめた (Fig. 2A, 2B)。Immunoblot法では、AT-406単独群およびAT-406/DOX併用群においてcIAP1の発現減弱をみとめ、さらにAT-406/ドキソルビシン併用群ではcleaved caspase-8およびcaspase-3, cleaved PARPの発現増強をみとめた (Fig. 2C, 2D)。蛍光免疫染色においてもAT-406/DOX併用群でアポトーシス陽性細胞の増加をみとめた (Fig. 2E, 2F)。

Smac模倣薬AT-406とドキソルビシンの併用療法は、ヒト骨肉腫細胞株に対して、in vivoでのアポトーシス増強および腫瘍増殖抑制効果を示した。

ヒト骨肉腫細胞皮下移植モデルマウスを用いたin vivoの検討にて、AT-406/DOX併用群はコントロールおよびそれぞれの単独群と比較して腫瘍増大を有意に抑制した (Fig. 3A, B)。各治療群間で有意な体重差はみとめなかった (Fig. 3C)。治療後腫瘍組織の検討では、in vitroの結果と同様に、AT-406/DOX併用群においてコントロール群およびそれぞれの単独群に比較してアポトーシス活性の増強をみとめた (Fig. 4A)。Immunoblot法では、AT-406単独群とAT-406/DOX併用群でcIAP1の発現減弱をみとめ、AT-406/DOX併用群でcleaved caspase-8およびcleaved caspase-3, cleaved PARPの発現増強をみとめた (Fig. 4B)。蛍光免疫染色においてもAT-406/DOX併用群でアポトーシス陽性細胞の増加をみとめた (Fig. 4C)。

以上より、Smac模倣薬AT-406はヒト骨肉腫に対するDOXの抗腫瘍効果を増強することが示唆された。

考察

骨肉腫は、骨原発の悪性腫瘍で最多である。手術および化学療法の進歩によって、局所治療は良好な成績が得られているが、再発・遠隔転移症例に対するsecond line化学療法の選

択肢がなく、いまだ治療に難渋することも少なくない。それゆえ、より強く安全な治療戦略の開発が望まれる。

様々ながん種において、抗アポトーシス因子IAPsの過剰発現がみとめられ、その機能について焦点をあてた報告がなされている。ヒトIAPsとしては、cIAP1, cIAP2, XIAP, survivinなどが単離されており、アポトーシス活性を阻害することで悪性腫瘍の増生に寄与すると考えられている。骨肉腫での報告はほとんどないが、cIAP1は骨肉腫に関連すると報告されており、我々は骨肉腫の治療ターゲットとしてcIAP1に着目した。

Smac (second mitochondria-derived activator of caspase) は、アポトーシス誘導時にミトコンドリアから細胞質に放出され、IAPsのアンタゴニストとして機能し、アポトーシスを促進する。SmacはIAPsに結合することでそのdegradationを誘導し、caspase-8, caspase-3, PARPを介して細胞のアポトーシスを促進する。近年、腫瘍治療薬としてSmac模倣薬の開発、治療がすすめられており、様々ながん種に対して従来の化学療法との併用により、良好な治療効果が多く報告されている。Smac模倣薬は、cIAP1のdegradationを促進することが報告されている一方で、骨肉腫治療におけるkey drugであるドキソルビシンとの併用効果についても報告されている。

本研究で我々は、様々ながん種で抗腫瘍効果を増強するとされているSmac模倣薬AT-406を用い、ヒト骨肉腫に対するドキソルビシンとの併用による抗腫瘍効果について検討した。AT-406はドキソルビシンと併用することでヒト骨肉腫細胞に対して有意な殺細胞効果を示し、cIAP1の発現減弱、caspase-8の活性化を介してアポトーシスを誘導することを明らかにした。In vivoにおいても、この併用療法が明らかな体重減少を起こすことなく、より強い腫瘍増大抑制効果を示すことが明らかとなった。過去に骨肉腫に対するドキソルビシンの併用療法に関して、cIAP1をターゲットとした報告はない。

本研究のlimitationとしては、使用した骨肉腫細胞株が2株だけであること、ドキソルビシン以外の抗がん剤について評価していないこと、が挙げられる。しかしながら、本研究で我々が明らかにしたSmac模倣薬によるcIAP1のdegradationによりドキソルビシンの抗腫瘍効果を増強する、という知見は、骨肉腫治療においてbreakthroughになると確信する。

論文審査の結果の要旨			
受付番号	甲 第 2748 号	氏名	蒲田 悅子
論文題目 Title of Dissertation	Synergistic Effects of a Smac Mimetic with Doxorubicin Against Human Osteosarcoma ヒト骨肉腫に対する Smac 模倣薬とドキソルビシンの併用効果		
審査委員 Examiner	主査 Chief Examiner 副査 Vice-examiner 副査 Vice-examiner	真庭 謙昌 溝渕 和司 古屋 敏之	

(要旨は1,000字~2,000字程度)

Smac (second mitochondria-derived activator of caspase)は、アポトーシス誘導時にミトコンドリアから細胞質に放出され、アポトーシス阻害因子(Inhibitor of Apoptosis Proteins; IAPs)の antagonist として機能することでアポトーシスを促進する。近年、抗腫瘍薬として Smac 模倣薬の開発、治験が進められており、様々ながん種に対して単剤使用や既存薬との併用による抗腫瘍効果が多く報告されている。今回研究者らはヒト骨肉腫細胞に対する Smac 模倣薬 AT-406 のドキソルビシンとの併用による抗腫瘍効果について、IAPs の一つである cIAP1 に着目し、in vitro および in vivo で検討した。

方法として、In vitro においては、ヒト骨肉腫細胞株 KHOS および MG63 に対する Smac 模倣薬 AT-406 とドキソルビシン(DOX)の抗腫瘍効果について、それぞれ単独または併用で作用させ、24, 48, 72 時間後の生細胞率を WST assay で評価した。アポトーシス活性について FACS および蛍光免疫染色で、cIAP1, caspase-8 および caspase-3, PARP の発現については Immunoblot 法で検討した。

In vivo において、週齢5週のオス BALB/c ヌードマウスの背部皮下に KHOS 細胞を移植してモデルマウスを作成した。AT-406(50mg/kg) 単独群、DOX(3mg/kg) 単独群、AT-406/DOX 併用群、コントロール群の 4 群に分け、週 2 回、2 週間腹腔内投与による治療を行った。定期的に腫瘍径と体重を計測した。治療終了時に移植腫瘍を採取し、腫瘍内アポトーシス活性について FACS および蛍光免疫染色で、cIAP1, caspase-8 および caspase-3, PARP の発現については Immunoblot 法で検討した。

結果は、In vitro において、WST assay による評価では、AT-406/DOX 併用群でコントロール群およびそれぞれの単独群に比較して、濃度・時間依存性の殺細胞効果を示し、FACS による検討では、AT-406/DOX 併用群においてそれぞれの単独群よりも強いアポトーシスの亢進をみとめた。Immunoblot 法にて、AT-406 単独群および AT-406/DOX 併用群において cIAP1 の発現減弱をみとめ、さらに AT-406/DOX 併用群では cleaved caspase-8 および caspase-3, cleaved PARP の発現増強をみとめた。蛍光免疫染色においても AT-406/DOX 併用群でアポトーシス陽性細胞の増加をみとめた。

In vivo の検討において、AT-406/DOX 併用群はコントロールおよびそれぞれの単独群と比較して有意な腫瘍増大抑制効果を示した。各治療群間で有意な体重差はみとめなかつた。治療後腫瘍組織の検討では、in vitro の結果と同様に、AT-406/DOX 併用群においてコントロール群およびそれぞれの単独群に比較してアポトーシス関連タンパクの発現を増強させ、アポトーシスを亢進させた。

本研究で研究者らは、様々ながん種で抗腫瘍効果を増強するとされている Smac 模倣薬 AT-406 を用い、ヒト骨肉腫細胞に対するドキソルビシンとの併用による抗腫瘍効果について検討した。AT-406 はドキソルビシンと併用することでヒト骨肉腫細胞に対して有意な殺

細胞効果を示し, cIAP1 の発現減弱, caspase-8 の活性化を介してアポトーシスを誘導することを明らかにした. In vivo においても, この併用療法が明らかな体重減少を起こすことなく, より強い腫瘍増大抑制効果を示すことが明らかとなった.

本研究は, IAPs の antagonist として機能することでアポトーシスを誘導するとされる Smac 模倣薬 AT-406 のヒト骨肉腫に対する抗腫瘍効果についてドキソルビシンとの併用効果を研究したものである. 従来, ヒト骨肉腫に対して IAPs を標的とした治療開発は行われておらず, Smac 模倣薬とドキソルビシンとの併用効果について, cIAP1 機能抑制の関与を初めて証明した報告であり, 本研究で得られた知見は, ヒト骨肉腫に対する新たな治療アプローチと成り得るとした点で価値ある業績であると認める. よって, 本研究者は, 博士(医学)の学位を得る資格があるものと認める.