

学 位 論 文 の 要 旨

三 重 大 学

所 属	三重大学大学院医学研究科 甲 生命医科学専攻 病態修復医学講座 運動器外科学分野	氏 名	大 井 徹
<p>主論文の題名</p> <p>STAT3 inhibitor, cucurbitacin I, is a novel therapeutic agent for osteosarcoma</p> <p>主論文の要旨</p> <p>【目的】</p> <p>悪性腫瘍に対する分子標的治療薬は、細胞増殖、浸潤、転移、血管増殖、免疫などに関わる分子を阻害し、抗腫瘍効果を得るものである。現在、様々な癌腫に対する分子標的治療薬の開発が進んでおり、すでに素晴らしい効果を実証しているものもある。一方、骨原発の悪性腫瘍である骨肉腫は、希少がん、遺伝子的不安定性のため新たな治療薬の開発が難しく、doxorubicin, cisplatin, methotrexate, ifosfamide の4種を基本とした標準治療は20年以上前に確立したものである。これにより、約70%の5年生存率を達成しているが、初診時に転移を認めた症例の5年生存率は20%程度に過ぎない。さらなる予後の改善には、新たな治療薬の開発が急務である。本研究は、悪性腫瘍に対する新しい分子標的の発見、および化合物の開発のために提供されている化合物ライブラリーを用いることで、骨肉腫に効果を示す新たな薬剤の探索を目的とした。</p> <p>【方法】</p> <p>① ヒト骨肉腫細胞（143B, MG-63, HOS, SAOS-2, HUO9）5種に対して化合物ライブラリー（文科省科研費・新学術領域・がん支援・化学療法基盤支援活動班より提供）の薬剤(324種)を各腫瘍細胞に10μMで散布、24時間後に cell proliferation assay を行い、効果のある薬剤をスクリーニングした。</p> <p>② 候補薬剤を濃度依存性に単層培養、3D コラーゲン培養した腫瘍細胞に散布し、cell proliferation assay を施行した。</p> <p>③ スクリーニングの結果選択された cucurbitacin I をヒト骨肉腫細胞に10μMで散布し、24時間後、フローサイトメトリーで annexin V および propidium iodide (PI)を用いてアポトーシス誘導の確認を行った。</p> <p>④ JAK /STAT3 経路に関わる STAT3 タンパクの骨肉腫細胞での発現、phospho-STAT3 タンパクの発現を cucurbitacin I 投与12時間後に、cleaved caspase-3、phospho-cyclin D1、c-Myc、Mcl-1、survivin、cleaved PARP タンパクの発現を cucurbitacin I 投与24時間後に WB 法にて測定した。</p>			

- ⑤ Cucurbitacin I (10 μ M) 投与によるアポトーシス効果を caspase-3 (Active) ELISA にて測定した。
- ⑥ Xenograft mouse model に cucurbitacin I を 3 回/週 \times 4 週間、control/0.25/0.5/1.0 mg/kg に分けて腹腔内投与し、腫瘍体積の評価、生存期間、体重変化を調査した。
- ⑦ Xenograft mouse model から採取した組織を免疫組織学的に評価した。

【結果】

- ① Cucurbitacin I、AKT inhibitor IV、SU11652、sunitinib、pazopanib が増殖抑制を示す薬剤として選択された。
- ② Tyrosin kinase inhibitor である pazopanib、sunitinib、SU11652 は骨肉腫細胞での増殖抑制効果は限定的であったこと、AKT inhibitor IV は in vivo 投与にて毒性が強く認められたことから、最終的に cucurbitacin I を詳細な研究対象とした。
- ③ Cucurbitacin I はヒト骨肉腫細胞に対して、アポトーシスへ誘導することを確認した。
- ④ ヒト骨肉腫細胞では STAT3 の高発現が認められた。また cucurbitacin I 投与群(12 時間治療群)のヒト骨肉腫細胞では、コントロール群と比較し phospho-STAT3 の発現が抑制され、24 時間治療群では phospho-STAT3 以下の anti-apoptotic タンパクである MCL-1 を抑制し、アポトーシスを反映する cleaved caspase-3 と cleaved PARP の発現を増強させた。また同様に cucurbitacin I 投与群(24 時間治療群) では、cell cycle regulator タンパクである survivin、phospho-cyclin D1、C-myc の発現を抑制することが確認された。
- ⑤ Cucurbitacin I 投与群は control 群と比較し caspase-3 (Active)の発現上昇を認めた。(HUO9 を除く)
- ⑥ Cucurbitacin I 投与後 2 週以降で 0.5、1.0 mg/kg 投与群では control 群と比較し、有意な腫瘍増殖抑制効果を示し、さらに生存期間の延長が認められた。また有害事象と考えられる体重減少は認められなかった。
- ⑦ Cucurbitacin I 投与群の腫瘍免疫染色標本では TUNEL 染色陽性の周囲で phospho-STAT3 の発現が抑制された。

【考察】

Cucurbitacin I はウリ科植物に特有のステロイドの一種で、キュウリ、メロン、スイカなどのへたに近い部分、特にゴーヤに多く含まれ、苦みの元で中毒の原因物質であるが、一方で、抗がん作用や抗炎症作用があることから、古代より生薬として使用されていたといわれている。Cucurbitacin には A~T までの sub group が存在し、A、B、D、E、I、Q で抗がん作用が報告されている。その機序の一つとして、JAK /STAT3 に対する選択的阻害作用が挙げられる。JAK /STAT3 経路の活性化は、細胞増殖、生存延長などに関与しているが、cucurbitacin は JAK /STAT3 のリン酸化を抑制することで、ヒトがん細胞株(膵、肺、乳がん)に対して抗腫瘍効果を示したとの報告がある。

今回の結果から、cucurbitacin I はヒト骨肉腫細胞 5 種に対して global な細胞増殖抑制効果が認められた。ヒト骨肉腫細胞では JAK /STAT3 経路が活性化していたため、

cucurbitacin I は JAK /STAT3 経路を抑制することで、細胞分裂活性の抑制のみならずアポトーシスへ誘導し、細胞の増殖を抑えることが明らかになった。また *in vivo* においても cucurbitacin I が骨肉腫に対して抗腫瘍効果のみならず、生存期間も延長することが実証された。JAK /STAT3 の選択的阻害薬である cucurbitacin I は、骨肉腫に対し、実際に臨床で応用できる可能性が示された。

【結語】

JAK /STAT3 は、骨肉腫に対する新たな治療標的になり得る可能性があり、JAK /STAT3 の選択的阻害薬である cucurbitacin I は、骨肉腫の新たな治療薬として期待できる薬剤であると考えられた。

