

氏 名 わたなべ けんた
渡邊 健太

学位の種類 博士 (医学)

学位記番号 富医薬博甲第 298 号

学位授与年月日 平成 31 年 3 月 26 日

学位授与の要件 富山大学学位規則第 3 条第 3 項該当

教育部名 富山大学大学院医学薬学教育部 博士課程
生命・臨床医学 専攻

学位論文題目 **Low-dose eribulin suppresses lung metastasis of
osteosarcoma in vitro and in vivo**
(低用量エリブリンによる骨肉腫の肺転位抑制効果)

論文審査委員

(主査) 教授 戸邊 一之
(副査) 教授 笹原 正清
(副査) 教授 服部 裕一
(副査) 教授 林 龍二
(指導教員) 教授 木村 友厚

論文内容の要旨

〔目的〕

骨肉腫は、10歳代に好発する最も頻度の高い原発性悪性骨腫瘍である。化学療法の導入により5年生存率は約70%と改善したが、肺転移を有する患者に関してはいまだ約20%と予後不良であり、転移に対する新たな治療方法の開発が必要である。エリブリンは微小管ダイナミクス阻害作用を有する化学療法薬で、手術不能もしくは再発乳がんと悪性軟部腫瘍に適応がある。その臨床効果の特徴は、既存の化学療法と異なり、無増悪生存期間 (progression free survival; PFS) は延長しないが全生存期間 (overall survival; OS) を延長することである。また、エリブリンの血中動態は、投与後短期間では高濃度であるが、その後1週間は低濃度で持続的に存在する。これらのことより、エリブリンの濃度の差異により抗腫瘍効果が異なり、ある濃度では肺転移抑制効果を強く示し、OSを延長させる可能性があるかと推論した。本研究の目的は、マウス骨肉腫肺転移モデルを用いエリブリンの肺転移抑制効果を検証し、さらにその機序を解析することである。

〔方法並びに成績〕

マウス骨肉腫細胞株Dunn細胞より、高肺転移株として樹立されたLM8細胞を用いた。

1. LM8細胞をC3Hマウスの背部に皮下移植し、作成したマウス骨肉腫肺転移モデルを用いてエリブリンの抗腫瘍効果及び肺転移抑制効果を検討した。皮下移植後2週後から1 mg/kg/dayを週1回の2週間投与 (通常投与群) した。抗腫瘍効果は、原発巣に関して腫瘍体積の変化と組織TUNEL染色を、転移抑制効果は末梢血循環腫瘍細胞 (circulating tumor cell ; CTC) の数、肺転移結節数、肺転移巣の面積を未治療群と比較検討した。その結果、原発巣では腫瘍体積は有意に増殖抑制を認めた。また、CTCを有意に減少させ、肺転移結節と肺転移巣の面積を有意に減少させていたことから転移抑制効果も認めていた。
2. 次に細胞レベルでのエリブリンの細胞障害性を検討するため CCK-8 assay による細胞障害を、細胞周期への影響とアポトーシスの有無をフローサイトメトリーにて検討した。その結果、LM8 に対するエリブリンの 50%阻害濃度 (IC₅₀) は、22.8 nM であった。IC₅₀ よりも高濃度で細胞周期は G2/M arrest を認め、アポトーシスを確認できたが、IC₅₀ よりも低濃度では細胞周期の変化とアポトーシスは認めなかった。

エリブリンの血中濃度には、静脈投与後の数時間の高濃度期と、それ以降1週間程度続く約10 nMの低濃度期の2つのphaseがある。IC₅₀がエリブリンの血中維持濃度である10 nMよりも高値であるため、低濃度期に転移抑制効果があると考え、低濃度のエリブリンがLM8細胞の細胞形態、細胞運動、3次元培養に与える影響を検討した。

3. エリブリンによる細胞形態変化を検討するため、 α -Tubulinの細胞免疫染色にて細胞の形や突起の数、微小管の長さを検討した。エリブリン低濃度からLM8細胞の形は丸くなり、浸潤

突起の数や微小管長は有意に減少していた。

4. 細胞運動能への影響を検討するためmigration assayとwound healing assayを行った。また、microtubule-organizing center (MTOC) の細胞免疫染色で運動の方向性を検討した。その結果、細胞運動能は低濃度から抑制され、運動の方向性も低下していた。LM8細胞は接着斑のターンオーバーが亢進していることで高い浸潤能を示すため、接着斑に注目し、大きさをvinculinの細胞免疫染色で、ターンオーバーをリン酸化FAKの細胞免疫染色とウエスタンブロットで検討した。その結果、低濃度のエリブリンによって接着斑は大きくなり、FAKのリン酸化は低下し、接着斑のターンオーバーが阻害されていた。さらに、接着斑のターンオーバーを促進する微小管関連タンパク質であるadenomatous polyposis coli (APC) の細胞免疫染色では、APCが細胞の辺縁まで分布しておらず、エリブリンによりAPCの細胞内輸送が阻害されていることが明らかとなった。
5. 肺を模して硬さを調整したコラーゲン 3 次元培養にてエリブリンの影響を検討した。その結果、低濃度のエリブリンからコロニーの生着率、浸潤突起の長さ、サイズが有意に減少していた。

これまでの結果から、エリブリンは低濃度からLM8細胞の運動能、肺への生着および増殖を抑える可能性が示唆されたため、さらにin vivoで検証した。

6. マウス骨肉腫肺転移モデルに、通常投与群に加え、移植後2週から0.3 mg/kg/dayを週2回の2週間投与（少量頻回投与群）を追加し、原発巣と転移巣に与える影響を比較検討した。その結果、少量頻回投与群では原発巣の増殖抑制効果は認めなかったが、CTCの数、肺転移結節数および肺転移巣の面積の有意な減少を認め、転移を抑制していた。さらに、有害事象として経時的な体重変化を検討したところ、通常投与群よりも少量頻回投与群で体重減少が有意に少なかった。エリブリンの少量頻回投与による転移に対する有用性と安全性が確認できた。

〔総括〕

骨肉腫において、エリブリンは高濃度では直接的な細胞障害性変化、低濃度では軽微な有害事象で転移抑制効果を示すことを明らかにした。エリブリンはIC50以下の低濃度からAPCの細胞内輸送を阻害し、細胞辺縁にある接着斑の分解を抑制することを示した。その結果、細胞骨格を変化させ接着斑のターンオーバーが低下し、運動能の低下および転移抑制につながる機序を明らかにした。エリブリンは、骨肉腫に対する転移抑制やメトロニック療法として、新たな治療法となり得る。

学位論文審査の要旨

〔目的〕

骨肉腫は、10歳代に好発する最も頻度の高い原発性悪性骨腫瘍である。化学療法の導入により5年生存率は約70%と改善したが、肺転移を有する患者に関してはいまだ約20%と予後不良であり、転移に対する新たな治療方法の開発が必要である。エリブリンは微小管ダイナミクス阻害作用を有する化学療法薬で、手術不能もしくは再発乳がんと悪性軟部腫瘍に適応がある。その臨床効果の特徴は、既存の化学療法と異なり、無増悪生存期間 (progression free survival; PFS) は延長しないが全生存期間 (overall survival; OS) を延長することである。また、エリブリンの血中動態は、投与後短期間では高濃度であるが、その後1週間は低濃度で持続的に存在する。渡邊健太君はこれらのことより、エリブリンの濃度の差異により抗腫瘍効果が異なり、ある濃度では肺転移抑制効果を強く示し、OSを延長させる可能性があるかと推論し、マウス骨肉腫肺転移モデルを用いエリブリンの肺転移抑制効果を検証し、さらにその機序を解析することを目的として本研究を立案した。

〔方法並びに成績〕

[1] マウス骨肉腫細胞株Dunn細胞より、高肺転移株として樹立されたLM8細胞を用いた。

1. LM8細胞をC3Hマウスの背部に皮下移植し、作成したマウス骨肉腫肺転移モデルを用いてエリブリンの抗腫瘍効果及び肺転移抑制効果を検討した。皮下移植後2週後から1 mg/kg/dayを週1回の2週間投与 (通常投与群) した。抗腫瘍効果は、原発巣に関して腫瘍体積の変化と組織TUNEL染色を、転移抑制効果は末梢血循環腫瘍細胞 (circulating tumor cell ; CTC) の数、肺転移結節数、肺転移巣の面積を未治療群と比較検討した。その結果、原発巣では腫瘍体積の増加を有意に抑制した。また、CTCを有意に減少させ、肺転移結節と肺転移巣の面積を有意に減少させていたことから転移抑制効果も認めた。
2. 次に細胞レベルでのエリブリンの細胞障害性を検討するためCCK-8 assayによる細胞障害の検討と、フローサイトメトリーにより細胞周期への影響とアポトーシスの有無を検討した。その結果、LM8に対するエリブリンの50%阻害濃度 (IC50) は、22.8 nMであった。IC50よりも高濃度で細胞周期はG2/M arrestを認め、アポトーシスを確認できたが、IC50よりも低濃度では細胞周期の変化とアポトーシスは認めなかった。
エリブリンの血中濃度には、静脈投与後の数時間の高濃度期と、それ以降1週間程度続く約10 nMの低濃度期の2つのphaseがある。IC50がエリブリンの血中維持濃度である10 nMよりも高値であるため、低濃度期に転移抑制効果があると考え、低濃度のエリブリンがLM8細胞の細胞形態、細胞運動、3次元培養に与える影響を検討した。
3. エリブリンによる細胞形態変化を検討するため、 α -Tubulinの細胞免疫染色にて細胞の形や突起の数、微小管の長さを検討した。エリブリン低濃度からLM8細胞の形は丸くなり、浸潤突起の数や微小管長は有意に減少していた
4. 細胞運動能への影響を検討するためmigration assayとwound healing assayを行った。また、microtubule-organizing center (MTOC) の細胞免疫染色で運動の方向性を検討した。その結果、細胞運動能は低濃度から抑制され、運動の方向性も低下していた。LM8細胞は接着斑のターンオーバーが亢進していることで高い浸潤能を示すため、接着

斑に注目し、大きさをvinculinの細胞免疫染色で、ターンオーバーをリン酸化FAKの細胞免疫染色とウエスタンブロットで検討した。その結果、低濃度のエリブリンによって接着斑は大きくなり、FAKのリン酸化は低下し、接着斑のターンオーバーが阻害されていた。さらに、接着斑のターンオーバーを促進する微小管関連タンパク質であるadenomatous polyposis coli (APC) の細胞免疫染色では、APCが細胞の辺縁まで分布しておらず、エリブリンによりAPCの細胞内輸送が阻害されていることが明らかとなった。

5. 肺を模して硬さを調整したコラーゲン3次元培養にてエリブリンの影響を検討した。その結果、低濃度のエリブリンからコロニーの生着率、浸潤突起の長さ、サイズが有意に減少していた。

これまでの結果から、エリブリンは低濃度からLM8細胞の運動能、肺への生着および増殖を抑える可能性が示唆されたため、さらにin vivoで検証した。

6. マウス骨肉腫肺転移モデルに、通常投与群に加え、移植後2週から0.3 mg/kg/dayを週2回の2週間投与（少量頻回投与群）（メトロニック療法）を追加し、原発巣と転移巣に与える影響を比較検討した。その結果、少量頻回投与群では原発巣の増殖抑制効果は認めなかったが、CTCの数、肺転移結節数および肺転移巣の面積の有意な減少を認め、転移を抑制していた。さらに、有害事象として経時的な体重変化を検討したところ、通常投与群よりも少量頻回投与群で体重減少が有意に少なかった。エリブリンの少量頻回投与による転移に対する有用性と安全性が確認できた。

〔総括〕

渡邊健太君は、骨肉腫において、エリブリンは高濃度では直接的な細胞障害性変化、低濃度では軽微な有害事象で転移抑制効果を示すことを明らかにした。エリブリンはIC50以下の低濃度からAPCの細胞内輸送を阻害し、細胞辺縁にある接着斑の分解を抑制することを示した。その結果、細胞骨格を変化させ接着斑のターンオーバーが低下し、運動能の低下および転移抑制につながる機序を明らかにした。渡邊健太君は、エリブリンは、骨肉腫に対する転移抑制やメトロニック療法として、新たな治療法となり得ることを実験データをもって証明した。

以上のことから、低濃度のエリブリンが骨肉腫細胞株の転移を抑制しうることを初めて明らかにした点は新規性がある。また、少量頻回投与で転移を抑制できることを明らかにしたことは、ヒトの骨肉腫でも効果が認められる可能性があり、今後の臨床的発展性が期待できる。

以上より本審査会は本論文を博士（医学）の学位に十分値すると判断した。