



本件の報道解禁につきましては、平成29年1月5日(木)午後7時(日本時間)以降にお願いいたします。

平成28年12月28日

## Ameloblastin の骨肉腫における腫瘍抑制因子としての働きを解明

### 【本研究成果のポイント】

- 骨肉腫は小児や若年者の手足の骨（長管骨）に多く発生し、再発や肺転移で予後不良となる症例も少なくなく、より効果的な治療法の開発が望まれている。
- 本研究では、Ameloblastin (AMBN) が Src-Stat3 経路を介して骨肉腫の増殖進展を抑制し、ドキソルビシンに対する感受性を亢進させることを見出すとともに、骨肉腫における AMBN の発現と肺転移の間に負の相関、生存率との間に正の相関傾向が認められることを明らかにした。
- 本研究を通して、AMBN を指標とした骨肉腫患者の予後判定が可能となるとともに従来からの化学療法との併用による新たな治療法開発の可能性が示唆される。

### 【概要】

広島大学大学院医歯薬保健学研究院 口腔顎顔面病理病態学研究室（高田 隆教授）の安藤俊範助教を中心とした研究チームが、AMBN が骨肉腫細胞の Src-Stat3 経路を不活性化し、アポトーシスを誘導、コロニー形成能・遊走能を抑制、ドキソルビシンに対する感受性を亢進することで、in vivo での腫瘍原発巣の増大・転移を抑制することを見出しました。また、骨肉腫患者における AMBN の免疫組織化学染色での発現と臨床データを解析することで、AMBN の発現と肺転移・生存率との相関を明らかにしました。これらの結果から、AMBN を指標とした骨肉腫患者の診断や治療法開発の可能性を示しました。

本研究成果は、ロンドン時間の2017年1月5日午前10時（日本時間：2017年1月5日午後7時）「Scientific Reports」オンライン版に掲載されます。

- 掲載雑誌：Scientific Reports
- URL：<http://www.nature.com/srep/>
- 論文題目：Ameloblastin induces tumor suppressive phenotype and enhances chemosensitivity to doxorubicin via Src-Stat3 inactivation in osteosarcoma
- 著者：Toshinori Ando, Yasusei Kudo, Shinji Iizuka, Takaaki Tsunematsu, Hanako Umehara, Madhu Shrestha, Toshihiro Matsuo, Tadahiko Kubo, Shouji Shimose, Koji Arihiro, Ikuko Ogawa, Mitsuo Ochi, Takashi Takata\*  
\*Corresponding author（責任著者）
- doi: 10.1038/srep40187

### 【背景】

AMBN は、amelin あるいは sheathlin と呼ばれる non-amelogenin エナメルマトリックス蛋白（注1）で、エナメル質の結晶成長やエナメル芽細胞の分化に参与すると報告されてきました。しかし最近になって、AMBN が発生期の骨組織にも発現し、骨分化に参与している可能性が示唆され始め、当研究室では、AMBN が細胞

膜受容体である CD63 および Integrin  $\beta$  1 と複合体を形成し、下流シグナルである Src の抑制を介して骨芽細胞の分化を誘導することを明らかにしました。AMBN に関するこれまでの研究で、1) ヒト骨肉腫細胞株の大部分において AMBN の発現が抑制されている、2) AMBN 変異マウスで腫瘍の形成が認められる、3) AMBN の過剰発現が腫瘍細胞の増殖能を抑制するなど、骨肉腫において AMBN が腫瘍抑制因子としての役割を有する可能性が示唆されていました。

一方、骨肉腫は骨形成性の悪性腫瘍であり、小児や若年者の長管骨に好発します。最近では、化学療法と外科的治療を併用することによって5年生存率の改善がみられますが、未だ再発や肺転移によって予後不良となる症例も少なくなく、より効果的な治療法の開発が必要とされています。

そこで本研究では、AMBN を指標とした骨肉腫の悪性度診断法の開発や AMBN を用いた治療法開発の可能性を明らかにすることを目的として研究を行いました。

### 【研究成果の内容】

本研究では、ヒト骨肉腫細胞株を用い、AMBN 低発現細胞に対しては vector を用いて AMBN を安定的に過剰発現させ、あるいは AMBN 高発現細胞に対しては shRNA を用いて AMBN の発現を安定的に knockdown した細胞株を樹立し、それらの phenotype を解析しました。増殖能解析やアポトーシス解析(注2)、soft-agar colony formation assay (注3)、wound healing assay (注4)、一般的に使用させる抗がん剤であるドキソルビシン投与後のアポトーシス解析を行った結果、AMBN は骨肉腫細胞に対してアポトーシスを誘導、コロニー形成能・遊走能を抑制、ドキソルビシンに対する感受性を亢進させることが明らかになりました。そしてこれらの phenotype は、AMBN が Src (注5) 及びその下流シグナルである Stat3 (注6) を不活性化することで生じることが明らかになりました。また、ヌードマウスに腫瘍細胞を接種し、in vivo imaging assay (注7) や組織学的に比較検討したところ、AMBN は原発巣での腫瘍の増大および肺転移を抑制しました。さらに、骨肉腫患者 37 症例の生検標本を用い、AMBN の発現を免疫組織化学的染色にて検討したところ、AMBN の発現と肺転移との間には負の相関を、生存率との間には正の相関傾向を認めました。

### 【今後の展開】

AMBN の骨肉腫における腫瘍抑制因子としての機能が解明されたことで、AMBN を骨肉腫患者の診断・治療に応用しうる可能性が示唆されました。今後、骨肉腫の従来の化学療法に AMBN を併用するなど、より効果的な治療法の開発が期待されます。また本研究をきっかけとして、今後 AMBN を基盤とした骨肉腫の詳細な分子機構を解明するための研究が更に進んでいくことが期待されます。

### 【用語解説】

(注1) エナメルマトリックス蛋白

主にエナメル芽細胞から分泌され、エナメル質の形成に関わる蛋白。約 90%は amelogenin であるが、残りの non-amelogenin エナメルマトリックス蛋白に ameloblastin が含まれている。

(注2) アポトーシス解析

以下の3通りの方法でアポトーシス(細胞死)を解析。

- (1) PI 染色と FACS 解析にて、細胞周期の Sub-G1 期(死細胞)の割合の解析。
- (2) AnnexinV/7-AAD 染色と FACS 解析にてアポトーシス細胞の割合を解析。
- (3) Western blot 法にて cleaved caspase-3 (細胞死の指標)の発現量を解析。

(注3) soft-agar colony formation assay

軟寒天培地中で細胞を培養し、コロニー形成数や大きさを比較する方法。細胞の足場非依存的増殖能を比較する。

(注4) wound healing assay

培養ディッシュ上に空隙を作り、培養細胞がその空隙に遊走する速さを比較することで、細胞遊走能を比較する方法。

(注5) Src

非受容体型のチロシンキナーゼ蛋白であり、標的因子のリン酸化付与により最終的に増殖能を亢進させるがん遺伝子。

(注6) Stat3

Signal transducer and activator of transcription 3 Srcによってリン酸化されることで活性化し、二量体を形成後、核内移行して増殖関連遺伝子の転写を促す転写因子。

(注7) in vivo imaging assay

ルシフェラーゼを用いた蛍光イメージングにより、ヌードマウス体内での腫瘍の増大や転移を解析する方法。

#### 【研究支援】

本研究の遂行にあたり、文部科学省・JSPS 科研費 JP23689074、JP25670778、JP21259088の助成を受けました。また一部の共著者はJSPSの特別研究員(DC1)および海外特別研究員の助成を受けています。

#### 【お問い合わせ先】

広島大学大学院医歯薬保健学研究院 基礎生命科学部門口腔顎顔面病理病態学研究室 助教 安藤 俊範 Tel : 082-257-5632 E-mail : andome1985@hiroshima-u.ac.jp
--

発信枚数：A4版 3枚（本票含む）