

## 論文の内容の要旨

論文提出者氏名	出 田 宏 和
論文審査担当者	主 査 中沢 洋三 教授 副 査 平塚 佐千江 教授・柴 祐司 教授・河野 博隆 教授
論文題目	Antitumor effect of sclerostin against osteosarcoma (骨肉腫に対するスクレロスチンの抗腫瘍効果)
(論文の内容の要旨)	<p><b>【研究の背景と目的】</b></p> <p>骨肉腫は骨芽細胞系細胞に由来する悪性腫瘍であり、異常な骨や類骨の形成が骨肉腫に共通する現象である。骨肉腫の治療には外科的治療と多剤併用化学療法が行われているが、過去数十年間は新薬が開発されておらず、生存率は頭打ちの状態となっている。</p> <p>Wnt 経路は、恒常性の維持や幹細胞の発生・成長・分化など、生体の幅広い現象を制御している。βカテニンを介する古典的 Wnt 経路は、Wnt が Frizzled と LRP5/6 の受容体複合体に結合し、βカテニンが細胞内に蓄積され、核に移行すると標的遺伝子の発現を制御し、細胞の増殖や分化を調節する。骨代謝において古典的 Wnt 経路は骨芽細胞の分化・増殖を制御している。</p> <p>スクレロスチンは主に骨細胞から分泌される Wnt 経路阻害因子のひとつで、骨形成を抑制し、骨量減少や骨粗鬆症を引き起こす。一方、抗スクレロスチン抗体はスクレロスチンに結合して古典的 Wnt 経路を活性化させ骨形成を促進させる作用があり、骨粗鬆症治療薬として利用されている。骨形成促進性の骨粗鬆症治療薬は、動物実験において過量投与により骨肉腫を含む骨腫瘍の発生頻度が増加したという報告がある。しかし、スクレロスチンや抗スクレロスチン抗体による骨肉腫への作用は不明である。そこで我々は、スクレロスチンが骨肉腫に対して抑制的に作用するのではないかと仮説を立てた。本研究の目的は骨肉腫に対するスクレロスチンの抗腫瘍効果を検討することである。</p> <p><b>【方法】</b></p> <p>マウス骨肉腫細胞株 LM8 およびヒト骨肉腫細胞株 143B を用いた。In vitro の実験で骨肉腫細胞株の増殖と遊走を評価した。細胞増殖の評価には AlamarBlue assay と scratch assay を用い、細胞遊走能の評価には migration assay を用いた。AlamarBlue assay では、143B および LM8 細胞株をスクレロスチンで 3 日間処理した。96 ウェルプレートに細胞を播種し、4 時間接着させた後 alamarBlue 試薬を添加した。ネガティブコントロールとして、細胞を含まない培地に alamarBlue 試薬を添加しないウェルを準備した。マニュアルに従い 3 時間後の蛍光強度を測定した。測定値からネガティブコントロールの平均値を差し引き、補正を行った。Scratch assay では、143B および LM8 細胞をスクレロスチンで 3 日間処理した。細胞単層にピペットチップで傷をつけ、スクレロスチンを培地に再度添加した。経時的に画像を撮影し、スクラッチ領域の面積を定量化した。Migration assay には、孔径 8 μm のポリカーボネートメンブレンのついた Transwell chamber kit を用いた。143B および LM8 細胞はスクレロスチンで 3 日間処理した。無血清培地で懸濁した</p>

143B 細胞および LM8 細胞をアッパーチャンバーに播種した。血清を含む培地をボトムチャンバーに添加し、143B は 4 時間、LM8 は 16 時間培養した。メンブレン上面の非遊走細胞を綿棒で除去し、メンブレン下面の細胞を固定・染色した。光学顕微鏡で無作為に選んだ 5 つの領域で遊走細胞の数を計測した。

*In vivo* の実験では、それぞれ C3H/He および BALB/c-nu/nu マウスの背部に移植し、骨肉腫モデルマウスを作製した。スクレロスチンを腫瘍移植日より 7 日間連日腹腔内注射し、腫瘍サイズと生存期間を検討した。

#### 【結果】

マウスおよびヒト骨肉腫細胞にスクレロスチンを投与すると、AlamarBlue assay および scratch assay において、マウスおよびヒト骨肉腫細胞の増殖が優位に抑制され、migration assay においてマウスおよびヒト骨肉腫細胞の遊走が有意に抑制された。骨肉腫モデルマウスにスクレロスチンを投与すると、非投与群と比較して腫瘍の成長が有意に抑制され、生存期間が延長した。

#### 【考察】

スクレロスチンは主に骨細胞から分泌され、骨組織に特異的に作用すると考えられている。スクレロスチンを骨肉腫治療に臨床応用する際には、いくつかの利点がある。骨組織への特異性が高いため、全身的な副作用は軽度で、他の臓器への影響はほとんどない可能性がある。また、スクレロスチンはすべての骨肉腫に共通する定義である骨形成を阻害するため、多様性の高い骨肉腫であってもより多くの患者に有効かもしれない。さらに、スクレロスチンは細胞毒性を有さないため、既存の抗がん剤治療との併用が可能な可能性がある。骨肉腫治療の主要薬剤の一つであるドキソルビシンは、骨肉腫の Wnt 経路を活性化させて薬剤耐性を生じさせることが知られているが、Wnt 阻害剤であるスクレロスチンを併用することでドキソルビシンの薬剤耐性を克服できる可能性がある。