骨肉腫の悪性化とプロテインフォスファターゼ 2A
～*in vivo* イメージングによる増殖・転移能の解析～

我々のグループは、骨芽細胞の分化および骨肉腫細胞のアポトーシスにおけるプロテインフォスファターゼの役割を中心に研究し、数々の成果を挙げてきた。本研究は過去の成果と新たな知見をもとに骨肉腫細胞の増殖・転移を細胞レベル・個体レベルで解明することであり、極めて重要な研究である。我々は新たに，PP2A は骨芽細胞の分化と石灰化および破骨細胞活性能など様々な機能に関与する重要な酵素であることを見出した（Okamura et al, 2011, 2012; Haneji et al, 2012; Morimoto et al, 2012)。一方、骨肉腫は他の悪性腫瘍に共通する原因遺伝子以外に、間葉系幹細胞から骨芽細胞への分化段階に関わる分子メカニズムが破綻することにより生じることが示されている。これらの所見は、PP2A の発現や活性が骨肉腫形成・悪性化に関与することを示唆している。

我々は、高い転移能をもつ骨肉腫細胞株（LM8 細胞）を見出した。LM8 細胞は正常骨芽細胞や株化骨芽細胞（MC3T3-E1 細胞）よりも PP2A の活性が高いことを見出した。我々はルシフェラーゼを恒常的に発現する細胞（LM8-Luc）を構築した。さらに我々は、LM8-Luc 細胞をヌードマウス皮下に移植した後、腹腔内にルシフェラーゼ基質を投与することにより、骨肉腫細胞の存在と動向を発光としてとらえることに成功した。高い転移能をもつ LM8 細胞で PP2A 活性が高いことから、PP2A が骨肉腫の悪性度・転移能に関与する可能性が高い。LM8-Luc 細胞に PP2A の shRNA を導入することにより、PP2A の発現が抑制されている細胞株（LM8-Luc-PP2AKD）を樹立した。この細胞は in vitro でルシフェリンを投与することにより蛍光を発することから、ノックダウンが成功していることが分かった。また、real-time PCR により、PP2A の mRNA 発現が低下していることも分かった。よって、以後の実験にはこの細胞株を用いることにした。

さらに我々は、LM8-Luc-PP2AKD 細胞では PP2A の酵素活性が低下していること、細胞増殖能が低下していることを確認した。PP2A の阻害剤（オカダ酸）は LM8 細胞の増殖を抑制し、アポトーシスを誘導することから PP2A が骨肉腫細胞の増殖と転移に関与していることは明らかである。

本研究の目的・提案とは直接関係しないが，蛋白質脱リン酸化酵素（PPs）に関連する我々が公表した論文を以下に示す。

1. 羽地達次
蛋白質リン酸化と脱リン酸化による骨形成と骨吸収
四国歯学会雑誌，24, 45-50, 2012

2. Haneji T, Teramachi J, Hirashima K, Kimura K, Morimoto H
Interaction of protein phosphatase 1δ with nucleophosmin in human osteoblastic cells.
Acta Histochemica et Cytochemica, 45, 1-7, 2012

3. Yoshida K, Okamura H, Ochiai K, Hoshino Y, Haneji T, et al
PKR plays a positive role in osteoblast differentiation by regulating GSK-3β activity through β-catenin-independent pathway.
Molecular and Cellular Endocrinology, 361, 99-105, 2012

4. Okamura H, Yang Di, Yoshida K, Haneji T
Protein phosphatase 2A Cα regulates osteoblast differentiation and the expressions of Bone sialoprotein and Osteocalcin via Osterix transcription factor.
Journal of Cellular Physiology, 228, 1031-1037, 2013

5. Okamura H, Yang Di, Yoshida K, Haneji T
Protein phosphatase 2A Cα is involved in osteoclastogenesis by regulating RANKL and OPG expression in osteoblasts.
FEBS Letters, 587, 48-53, 2013

6. Morimoto H, Baba R, Haneji T, Doi Y:
Double-stranded RNA-dependent protein kinase regulates insulin-stimulated chondrogenesis in mouse clonal chondrogenic cells, ATDC-5.
Cell and Tissue Research, 351, 41-47, 2013

7. Haneji T, Hirashima K, Teramachi J, Morimoto H
Okadaic acid activates PKR pathway and induces apoptosis through PKR-stimulation in osteoblastic MG63 cells.
International Journal of Oncology, 42, 1904-1910, 2013