

機関番号 : 34519

研究種目 : 若手研究 (B)

研究期間 : 2009~2010

課題番号 : 21791835

研究課題名 (和文)

ヒストン脱アセチル化阻害剤を用いたヒト骨肉腫に対する免疫療法への応用

研究課題名 (英文)

Improvement of immunotherapy for human osteosarcoma by HDAC inhibitor

研究代表者

山根木 康嗣 (YAMANEGI KOJI)

兵庫医科大学・医学部・講師

研究者番号 : 00434944

研究成果の概要 (和文) : sodium valproate(VPA)単独および Hydralazine(Hy)との併用による Fas および NKG2D を介する OS の感受性に及ぼす影響を検討した. VPA と Hy の併用は膜結合型 Fas および MIC の発現を亢進させ, sFas(10-40%)や sMIC(最大 30%程度)を有意に減少させた. またこれらの結果より Fas 抗体および NKG2D を介した OS の細胞死を有意に増加させた. 更に MMP9 が sMIC 形成機構に関与していることを証明した. 以上の結果より, DNAメチル化阻害剤とヒストン脱アセチル化阻害剤の併用は OS の抗腫瘍免疫細胞に対する感受性を増加させることが示された. VPA はすでに抗てんかん薬として, また Hy は降圧剤として広く臨床応用され, 安全性・至適濃度はすでに確認されている. 今回使用した濃度はその範囲内であることから, 人体への影響が少なく, かつ早期に OS の治療に応用可能であることが示唆された.

研究成果の概要 (英文) : We investigated the effects of valproic acid (VPA) (a histone deacetylase inhibitor) in combination with hydralazine (Hy) (a DNA methylation inhibitor) on expression of cell-surface Fas and MHC-class I-related chain molecules A and B (MICA and B), which are ligands of NKG2D, and on production of their soluble forms in HOS, U-2 OS and SaOS-2 human osteosarcoma cells. VPA showed no significant effect on expression of Fas on surface of osteosarcoma cells while Hy increased it and their combination showed the more increasing effect. VPA decreased the production of soluble Fas by osteosarcomas cells but Hy increased it and VPA reduced the increasing effect of Hy. VPA or hydralazine increased expression of cell-surface MICA and B, and their combination induced its further increase. VPA inhibited the production of soluble MICA and B in osteosarcoma cells and the inhibitory effect of VPA did not affected by Hy, which alone showed no significant effect. VPA and Hy enhanced Fas-mediated cell death and susceptibility to NK cells on osteosarcoma cells and their combination showed the more augmenting effect. These results suggest that combined administration of VPA and hydrazine may be useful for enhancing the therapeutic effect of immunotherapy for osteosarcomas.

交付決定額

(金額単位 : 円)

	直接経費	間接経費	合計
2009 年度	1,700,000	510,000	2,210,000
2010 年度	1,600,000	480,000	2,080,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,300,000	990,000	4,290,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：歯学・病態科学系歯学・歯科放射線学

キーワード：骨肉腫、histone deacetylase inhibitor、NKG2D、NKG2D ligand

1. 研究開始当初の背景

骨肉腫は、骨原発悪性腫瘍の中では頻度の高い腫瘍であり、その大部分は10代の青年期に発生する。骨肉腫の治療では、腫瘍の広範切除に加え、多剤の抗癌剤による術前・術後の系統的化学療法が一般的に用いられている。この化学療法の進歩により、最近では術前に転移のない症例では5年生存率は約75%にまで改善されており、手術時に顕在化していない転移巣の、化学療法による腫瘍の増殖抑制又は消滅によるものであると考えられる。しかしながら、一度、転移（主に肺転移）が起こると、化学療法を行っても予後は著しく悪い。従って、骨肉腫の治療成績の向上のためには、転移巣の増殖を抑制又は転移巣を消滅させる新たな治療法を化学療法と併用して行う必要があり、新たな治療法の開発が強く望まれている。

2. 研究の目的

様々な種類の癌において、DNAのメチル化やDNAと結合しているヒストンにアセチル化などの異常が生じ、その異常が発癌に関与していることが報告されている。これらは、放射線・化学・免疫療法等に対して腫瘍が抵抗性を示す要因の一つであるともいわれており、このepigenetic eventを制御することが、ヒト悪性腫瘍に対して各種療法の奏効率を上げ、術後再発や転移を抑制することができるのではないかと考える。そこで我々はヒストン脱アセチル化阻害剤が抗腫瘍免疫細胞抵抗性に及ぼす効果を検討する。NK細胞や一部のCD8(+) T-cellはその細胞膜表面にNKG2Dレセプター(NKG2D)が存在する事が報告されている。NKG2DはそのリガンドとしてMHC class I類似分子であるMICを認識する。NK細胞のNKG2Dを介する腫瘍細胞膜上のMICとの結合はNK細胞を活性化し、perforinやgranzymeなどの産生・分泌を増加させ、殺腫瘍細胞作用を増強する。これらの事からもNKG2Dは生体において腫瘍に対する免疫監視機構として極めて重要な役割を担うレセプターである。しかし、多くの腫瘍細胞では遊離型(soluble) MIC (sMIC)が存在し、ヒト癌患者の末梢血中にも存在することが確認されている。sMICは免疫細胞が標的細胞に到

達する前に、循環血中もしくは腫瘍周囲でNKG2D/sMIC complexを形成し、NKG2Dを介するNK細胞の腫瘍障害作用を著しく減弱させる。これらNKG2Dを介するNK細胞の抗腫瘍効果を増加させるためには、膜表面MIC発現を増加させ、かつsMICを減少させる必要がある。

従って、本研究は

- (1) ヒト骨肉腫細胞がVPAの作用によってNK細胞に対する感受性を亢進することを検討する。
- (2) VPAによるsMICの分泌抑制効果が認められた時、その機構を検索する。
- (3) epigenetic drugを併用することによる免疫細胞感受性の更なる亢進を検討する。
- (4) 上記(1)、(3)の結果より、ヒト骨肉腫の治療に用いられている抗癌剤との併用を検討する。

3. 研究の方法

(1) ヒト骨肉腫細胞株にHistone deacetylase inhibitorであるsodium valproate(VPA)を作用させMICのヒストンのアセチル化を亢進させる事を確認し、至適条件を決定する。

① 4種の細胞株をVPA(最大濃度1.0mM)と培養し、濃度・経時的にWestern blot法にてヒストンのアセチル化の状況を検討する。またMICのヒストンにアセチル化が促進・維持されているかをChIP法を用いて評価する。

(2) VPAが骨肉腫細胞株のMIC発現及びsMIC産生におよぼす効果をin vitroで検討する。

① VPAと細胞株を培養し、細胞膜上MIC発現をFACSにて検討する。mRNAをReal-time PCRで評価する。

② sMIC発現は培養上清をELISA法に測定し、細胞単位でのsMIC産生量を

検討する。

(3) ヒト末梢血 NK 細胞による Killing 能を評価する。

① 健常ヒト末梢血から NK 細胞を MACSR(抗体 selection 法)で分離し、サイトカイン(IL-2+IL-15 等)を含む培養液に短期培養し、NK 細胞を活性化させる。

② ヒトNK細胞をVPA前処理⁵¹Cr標識ヒト骨肉腫細胞株又はVPA非処理⁵¹Cr標識ヒト骨肉腫細胞と反応させ、放出された⁵¹Cr量を測定し、ヒト骨肉腫細胞のNK細胞に対する感受性に及ぼすVPAの効果を評価する。

(4) 上記(2)の検討で、VPAがsMIC産生を抑制するならば、そのメカニズムをin vitroで検索する。

① VPAを作用させた4種の細胞のMMPのmRNAの発現をRT-PCRにて確認し、Real-time PCRにて定量し、対照群と比較する。

②上記の結果からMMP inhibitor作用群とVPA作用群でsMICを測定・比較する。

(5) VPAが4種の細胞株のMIC発現、sMICの産生に及ぼす効果をin vivoで検討する。

① 4種の細胞をスキッドマウスの皮下に移植する。VPA又は溶媒を1週間から連日投与し、3週後に腫瘍を摘出、FACSで腫瘍細胞のMIC発現を解析し、同時に生細胞を分離する。

② 上記a.の生細胞を24時間(short culture)培養し、培養液中sMICをELISA法で検討する。

③ 上記a.の生細胞を⁵¹Crで標識し、ヒトNK細胞を含む培養液で24時間培養し、VPAによるヒト骨肉腫細胞のNK細胞感受性の亢進を検討する。

(6) VPAとその他epigenetic drugの併用によるヒト骨肉腫細胞における細胞膜MICの発現、sMIC産生に及ぼす効果

をin vitroおよびin vivoで検索する。候補として塩酸ヒドララジン(Hy)(最大濃度10μM)を考えている。(解析方法は(1)～(5)に準ずる)

(7) 各種抗癌剤およびVPA、Hyとの併用がヒト骨肉腫細胞の細胞膜MICの発現及びsMIC産生に及ぼす効果をin vitroおよびin vivoで検討する。(抗癌剤としては、実際の骨肉腫の治療に使用されているcisplatin, etoposide, doxorubicin等を使用する。)解析方法は上記(6)に準じる。(以下のことが評価、検討できる)

① 各種抗癌剤によるヒト骨肉腫細胞のNK細胞NKG2D感受性に及ぼす効果および、抗癌剤とVPA、Hy併用による感受性に及ぼす効果をin vitro、in vivoで評価できる。

② 多剤投与それぞれの薬効に及ぼす影響を検討することができ、かつ生体での許容量も検討できる。

③ VPA、Hyを併用することで、抗癌剤の投与濃度を下げることができ、かつ転移・再発抑制効果が得られることが検討できる。

4. 研究成果

(1) ヒストン脱アセチル化阻害剤であるsodium valproate (VPA)によるOS膜表面NKG2D ligand(MIC)およびHLA class Iの発現に関する検討。

① MIC発現はVPA 0.5mM, 1.0mM濃度、7日目において、4種(MG-63, HOS, U-2OS, SaOS-2)全てのOS細胞株で有意に増加が認められた。

② 3種(HOS, U-2OS, SaOS-2)のOS細胞株においてHLA class Iの発現は増加したが、MICの発現増加に比べ、その程度は劣っていた。

(2) VPAによる遊離型MIC(sMIC)の形成に及ぼす影響。

① VPA作用7日目において、3種(HOS, U-2OS, SaOS-2)のOS細胞株で培養液中のsMICを有意に抑制した。

(3) NK細胞株(NK-92)を用いた cytotoxic activity の検討。

- ① VPA 作用後 7 日目において、3 種(HOS, U-2OS, SaOS-2)の OS 細胞株で有意に細胞死を誘導した。
- ② 細胞死は anti-NKG2D 抗体を用いた阻害実験で有意に減少することから、そのメカニズムは、NKG2D/MIC を介した特異的殺腫瘍効果であることを証明した。

(4) 遊離型 MIC(sMIC) の形成に及ぼす matrix-metalloprotease(MMP) の関与。

- ① MMP 阻害剤である M6001 を用いた結果、対照群と比較して培養液中の sMIC は有意に減少したことから、sMIC 形成には MMP が関与していることが示唆された。
- ② (OS 細胞は MMP2 および MMP9 を多量に産生する腫瘍であることが知られている)
MMP2 および MMP9 は VPA 単独もしくは VPA および Hy 併用群で、U-2OS では MMP9 が、SaOS-2 では MMP2 および MMP9 ともに mRNA の発現量が有意に減少していた。
- ③ 上記の結果より、SiRNA を用いて MMP2 および MMP9 mRNA を knock-down し、培養液中の sMIC を測定したところ、MMP2 mRNA knock-down では対照群との差は認めなかったが、MMP9 mRNA knock-down では対照群と比較して有意に sMIC を減少させた。

VPA 単独作用では OS 細胞の膜表面 NKG2D ligand(MIC) の発現を増加させ、遊離型 MIC(sMIC) 形成を減少させた。このことにより、NK 細胞の発現する NKG2D を介する殺腫瘍作用を誘導し、効率よく OS 細胞を排除することが可能であった。
sMIC の形成には MMP の関与が示唆され、MMP2 および MMP9 の mRNA を定量したところ、VPA 作用群では MMP9 の mRNA 量が減少しており、SiRNA を用いた knock-down assay から、VPA による sMIC 抑制作用は MMP9 の発現抑制が関与していることを証明した。

(5) ヒストン脱アセチル化阻害剤である VPA および DNA メチル化阻害剤である hydralazine(Hy) の併用による OS の増殖能に関する検討。

- ① VPA 単独投与は 0.5mM, 1.0mM 濃度において 5 日目、7 日目で、全ての細胞株で有意に増殖能を低下させた。
- ② Hy 単独投与では対照群と比較して増殖能に変化はなかったが、VPA と Hy の併用では VPA 単独投与と同様、5 日目、7 日目で、増殖能を有意に低下させた。

(6) VPA および Hy による OS 膜表面 Fas および NKG2D ligand(MIC) の発現に関する検討。

- ① OS 細胞膜表面 Fas 発現の検討
 - (a) VPA 単独作用における U-2OS および SaOS-2 では VPA 0.5mM, 1.0mM 濃度で 7 日目において減少傾向を示し、HOS に関しては増加傾向を示したが、いずれも有意差は認めなかった。
 - (b) Hy 単独作用は 3 種(HOS, U-2OS, SaOS-2)の OS 細胞株の Fas 発現を増加させ、VPA と Hy の併用ではその発現を最大 7.5 倍増加させた。
 - (c) Fas promoter 領域には CpG island が存在し、Hy を作用させることで、これらメチレーションが解除されていることを、メチレーション感受性制限酵素を用いた PCR 法にて確認した。このことから Fas の発現を亢進する Hy 作用機序を証明した。

② OS 細胞膜表面 MIC 発現の検討

- (a) Hy 単独作用は 3 種(HOS, U-2OS, SaOS-2)の OS 細胞株の MIC 発現を有意に増加させたが、上記 VPA 単独作用と比較してその増加率は低かった。
- (b) VPA と Hy の併用は MIC 発現を最大 5 倍程度増加させ、上記 VPA 単独作用を上回る結果であった。

(7) VPAおよびHyによる分泌型Fas (sFas) および遊離型 MIC (sMIC) の形成に及ぼす影響。

① 分泌型 Fas (sFas)に及ぼす影響

- (a) VPA 単独作用では、培養液中の sFas 分泌量は 4 種(MG-63, HOS, U-2OS, SaOS-2) 全ての細胞株で有意に減少した。
- (b) Hy 単独作用では sFas は増加傾向を示したが有意差は認められなかった。
- (c) VPA と Hy の併用は、それぞれ単独作用と比較して sFas 分泌量を 20~30%減少させた。

② 遊離型 MIC (sMIC)に及ぼす影響

- (a) VPA 単独作用は上記(2)を参照。(3 種(HOS, U-2OS, SaOS-2)の OS 細胞株で培養液中の sMIC を有意に抑制)
- (b) Hy 単独作用では sMIC は減少傾向にあったが、有意差は認められなかった。
- (c) VPA と Hy の併用は、対照群と比較して sMIC を有意に減少させたが、VPA 単独作用と比較して、その効果は低かった。

(8) VPA および Hy の前処置による Fas および MIC を介した腫瘍細胞死の変化の検討。

① Fas 抗体を用いた apoptosis の検討 (Fas を介した腫瘍細胞死の検討)

- (a) VPA 単独作用後 7 日目では 3 種 (HOS, U-2OS, SaOS-2) の OS 細胞株において 0.5mM, 1.0mM 濃度で有意に細胞死を誘導した。また、Hy 単独作用でもほぼ同様の結果を得た。
- (b) VPA および Hy の併用は、それぞれ単独作用よりも更に有意に細胞死を誘導した。そのメカニズムは Caspase8 と 3 の活性増加が認められ、Fas からの signal を介する apoptosis が誘導されていることを証明した。

(c) 前処置は sFas を減少させ Fas 抗体を効率よく OS が発現する Fas に結合させることにより apoptosis を誘導したが、sFas の存在しない状態でも対照群に比べて有意に apoptosis を誘導した。

② NK 細胞株 (NK-92) を用いた cytotoxic activity の検討 (MIC を介した腫瘍細胞死の検討)

- (a) VPA 単独作用後 7 日目では 3 種 (HOS, U-2OS, SaOS-2) の OS 細胞株で有意に細胞死を誘導した。
- (b) Hy 単独作用では対照群に比べて有意に細胞死を誘導した。VPA 単独作用との比較では有意差は認めないものの細胞死の効率は低かった。
- (c) VPA および Hy の併用は、それぞれ単独作用よりも更に有意に細胞死を誘導した。
- (d) これら NK 細胞による腫瘍細胞死は anti-NKG2D 抗体を用いた阻害実験で有意に減少することから、そのメカニズムは、NKG2D/MIC を介した特異的殺腫瘍反応であることを証明した。

VPAとHyの併用は、それぞれの単独作用よりも、OS細胞膜表面FasおよびMIC発現を増加させ、分泌型Fas (sFas)および遊離型MIC (sMIC)を減少させた。またFas/Fas ligandを介したapoptosis誘導およびNKG2D/MICを介したNK細胞の殺腫瘍作用を有意に促進した。

以上より、ヒストン脱アセチル化阻害剤である sodium valproate (VPA) および DNA メチル化阻害剤である hydralazine (Hy) の併用は、それぞれ単独作用より更なる抗腫瘍(殺腫瘍)効果が期待できることを明らかにした。免疫療法とこれらを併用することにより、従来よりも免疫療法の奏効率が改善されることが期待できる。さらに VPA はすでに抗てんかん薬として、また Hy は抗高血圧治療薬として、現在広く臨床応用されており、安全性・至適濃度はすでに確認されている。今回使用した濃度はその範囲内であることから、人体への影響が少なく、骨肉腫の治療に応用可能であることが示された。

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文] (計 6 件)

1. Yamanegi K, Yamane J, Kobayashi K, Kato-Kogoe N, Ohyama H, Nakasho K, Yamada N, Hata M, Nishioka T, Fukunaga S, Futani H, Okamura H and Nobuyuki Terada., Sodium valproate, a histone deacetylase inhibitor, augments the expression of cell-surface NKG2D ligand, MICA and B, without increasing their soluble forms to enhance susceptibility of human osteosarcoma cells to NK cell-mediated cytotoxicity, *Oncol Rep.*, 24, 1621-1627, 2010. 査読有り
2. Khan SG, Yamanegi K, Zheng Z-M, Boyle J, Imoto K, Oh KS, Baker CC, Gozukara E, Metin A and Kraemer KH., XPC branch-point sequence mutations disrupt U2 snRNP binding resulting in abnormal pre-mRNA splicing in xeroderma pigmentosum patients, *Human Mutation.*, 31, 167-175, 2010. 査読有り
3. Kato-Kogoe N, Ohyama H, Nishimura F, Meguro M, Yoshizawa S, Okada Y, Nakasho K, Yamanegi K, Yamada N, Hata M, Higashi T, Terada N and Matsushita S., Fibroblasts stimulated via HLA-II molecules produce prostaglandin E₂ and regulate cytokine production from helper T cells, *Lab Invest*, 90, 1747-1756, 2010. 査読有り
4. Ohyama H, Kato-Kogoe N, Kuhara A, Nishimura F, Nakasho K, Yamanegi K, Yamada N, Hata M, Yamane J and Terada N., The involvement of IL-23 and the Th17 pathway in periodontitis, *J. Dent. Res.*, 88(7), 633-638, 2009. 査読有り
5. Yamada N, Hata M, Ohyama H, Yamanegi K, Kogoe N, Nakasho K, Futani H, Okamura H and Terada N., Immunotherapy with interleukin-18 in combination with preoperative chemotherapy with ifosfamide effectively inhibits postoperative progression of pulmonary metastases in a mouse osteosarcoma model, *Tumor Biol.*, 30(4), 176-184, 2009. 査読有り

6. Okimura A, Hirano H, Nishigami T, Ueyama S, Tachibana S, Fukuda Y, Yamanegi K, Ohyama H, Terada N and Nakasho K., Immunohistochemical analyses of E-cadherin, β -catenin, CD44s, and CD44v6 expressions, and Ki-67 labeling index in intraductal papillary mucinous neoplasms of the pancreas and associated invasive carcinomas, *Med Mol Morphol.*, 42, 222-229, 2009. 査読有り

[学会発表] (計 3 件)

1. 山根木康嗣、小林 健太、大山秀樹、小越菜保子、秦 正樹、山田直子、中正恵二、寺田信行、ヒストン脱アセチル化阻害剤とDNAメチル化阻害剤の併用による抗腫瘍免疫細胞に対する感受性増加、**第 99 回日本病理学会総会**、東京、2010. 4. 27.
2. 山根木康嗣、山根順子、大山秀樹、小越菜保子、秦 正樹、山田直子、中正恵二、寺田信行、ヒストン脱アセチル化阻害剤によるヒト骨肉腫細胞の免疫療法抵抗性の減弱、**第 98 回日本病理学会総会**、京都、2009. 5. 3.
3. 山根順子、山根木康嗣、大山秀樹、小越菜保子、秦 正樹、山田直子、中正恵二、寺田信行、DNAメチル化阻害剤とヒストン脱アセチル化阻害剤の併用によるヒト骨肉腫細胞の抗腫瘍免疫細胞抵抗性の減弱、**第 98 回日本病理学会総会**、京都、2009. 5. 3.

6. 研究組織

(1) 研究代表者

山根木 康嗣 (YAMANEGI KOJI)
兵庫医科大学・医学部・講師
研究者番号：00434944