

科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成25年 6月15日現在

機関番号：34519

研究種目：基盤研究（C）

研究期間：2010～2012

課題番号：22591671

研究課題名（和文） 骨肉腫の化学療法と免疫療法の有効性向上に関する研究

研究課題名（英文） Establishment of immunotherapy with chemotherapy in osteosarcomas

研究代表者

尅谷 博之 (FUTANI HIROYUKI)

兵庫医科大学・医学部・准教授

研究者番号：30248140

研究成果の概要（和文）：我々は、術前化学療法に加えて Interleukin-18 による免疫療法を併用することにより、術前化学療法のみより骨肉腫の転移が著しく抑制されることを示している。本研究ではこの併用療法の効果を増強するために、バルプロ酸（ヒストンアセチル化阻害剤）とヒドララジン（DNAメチル化阻害剤）について検討し、これらの薬剤が免疫細胞に対する骨肉腫の感受性を高めることを明らかにした。

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) to enhance the therapeutic effects of immunotherapy of interleukin-18 in osteosarcomas.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2010年度	1,400,000	420,000	1,820,000
2011年度	900,000	270,000	1,170,000
2012年度	1,100,000	330,000	1,430,000
年度			
年度			
総計	3,400,000	1,020,000	4,420,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：外科系臨床医学・整形外科学

キーワード：骨肉腫，肺転移，化学療法，免疫療法，悪性骨腫瘍

1. 研究開始当初の背景

(1) 骨肉腫は青年期に好発する高悪性腫瘍で、原発性悪性骨腫瘍の中で最も頻度が高い。骨肉腫治療に術前化学療法が導入されて、患者の5年生存率は10-20%から60-70%と飛躍的に向上した。しかし、これ以上に予後の改善はなく、抗癌剤単独による術前化学療法の限界が示されている。肺転移は骨肉腫治療で最大の予後不良因子であり、これを強く抑制し、且つ、副作用の少ない治療の開発が望まれている。

(2) 我々は骨肉腫の肺転移を抑制するため、兵庫医科大学で発見された interleukin-18 (IL-18) の免疫療法に注目して、継続的な研究を行っている。現在まで、この免疫療法が骨肉腫細胞の肺転移成立と、肺転移が成立した後の増殖抑制に作用することを証明した。さらに、ifosfamide (IFM) による術前化学療法と IL-18 による免疫療法の併用が、肺転移を著しく減少させることも証明した。しかし、骨肉腫に対する免疫療法の臨床応用には、骨肉腫がもつ免疫細胞抵抗性が問題となる。

具体的には、ヒト骨肉腫細胞は細胞障害性 CD8+T 細胞や NK 細胞の攻撃に対する抵抗性を有することが知られている。つまり、我々の併用療法の臨床応用には、骨肉腫細胞のもつ免疫細胞抵抗性を打破して、免疫細胞感受性を高める必要がある。

(3) 近年、ヒストン蛋白アセチル化阻害剤であるバルプロン酸及び、DNA メチル化阻害剤であるヒドララジンに我々は注目している。これらの薬剤は、腫瘍細胞の遺伝子発現を変化させる事が知られており、骨肉腫では、バルプロン酸がヒト骨肉腫細胞の Fas 受容体を介する細胞死の感受性を高めるとの報告がある。さらに、バルプロン酸はてんかんの治療に、ヒドララジンは血管拡張薬として用いられており、安全性が証明されているので、これらの薬剤を骨肉腫に臨床応用は直ちに行えると言った利点がある。

2. 研究の目的

ヒト骨肉腫細胞の持つ免疫抵抗性を抑制してその免疫細胞感受性を高める目的で、バルプロン酸及び、ヒドララジンが、骨肉腫細胞の持つ免疫抵抗性を抑制することで免疫細胞感受性を高めることと、併用療法の有効性をさらに向上させることを実証することである。

(1) バルプロン酸のヒト骨肉腫細胞の細胞膜 NKG2D ligand (MICA, MICB) の発現と、遊離 MICA, MICB の産生、細胞膜 Fas 発現と遊離 Fas 産生に及ぼす効果を検討する。

(2) バルプロン酸とヒドララジンの併用投与における、ヒト骨肉腫細胞の Fas または、NKG 2 D ligand 受容体の関与する免疫細胞感受性に及ぼす効果を検討する。

(3) バルプロン酸によるヒト骨肉腫細胞株の Vascular endothelial growth factor (VEGF), vascular endothelial growth inhibitor (VEGI), VEGI 受容体 (DR3), soluble decoy receptor (DcR3) の mRNA, 蛋白の発現に及ぼす効果を in vitro で調べる。

3. 研究の方法

(1) ヒト骨肉腫細胞 4 株をバルプロン酸と培養し、骨肉腫細胞の細胞膜 Fas 発現、NKG2D ligand 発現をフローサイトメトリーで定量した。同時に培養液中の遊離の Fas, 遊離 NKG2D ligand を ELISA 法で測定した。バルプロン酸の免疫細胞による腫瘍細胞障害の効果は、ヒト骨肉腫細胞を抗 Fas 抗体、またはヒト NK 細胞株と培養し、その細胞死の程度

により評価した。

(2) バルプロン酸とヒドララジンの併用投与によるヒト骨肉腫細胞の増殖抑制に及ぼす効果を(1)と同様に検討した。

(3) バルプロン酸の骨肉腫細胞の増殖に及ぼす効果を MMT 法で調べる。細胞の mRNA を抽出し、VEGF, VEGI, DcR3 の mRNA 量を RT-PCR を用いて検討する。また、Western blot 法を用いて、細胞の VEGF, 細胞膜の VEGI の発現を調べる。回収した培養液中の VEGF, 遊離 VEGI, DcR3 量を ELISA 法で検討する。

4. 研究成果

(1) バルプロン酸のヒト骨肉腫細胞への作用

①細胞膜 NKG2D ligand (MICA, MICB) の発現を増加させる。

②遊離 MICA, MICB の産生を抑制する。

③NK 細胞に対する感受性を亢進させる。

④バルプロン酸による遊離 MICA, MICB の産生抑制の機序は、細胞膜の MICA, MICB を切断する matrix metalloproteinase-9 の産生抑制による。

(文献, Oncol Rep, 28: 1585-1590, 2012)

(2) バルプロン酸とヒドララジンの併用によるヒト骨肉腫細胞への作用

①遊離の Fas を増加させないが、細胞膜 Fas 発現を増加させる。

②細胞膜の MICA, MICB の発現を増加させるが遊離 MICA, MICB 産生は減少させる。

③NK 細胞に対する感受性を単独使用の場合よりも更に亢進させる。

④ヒドララジンは骨肉腫細胞の増殖を抑制しないが、バルプロン酸はその増殖を抑制する事を明らかにした。

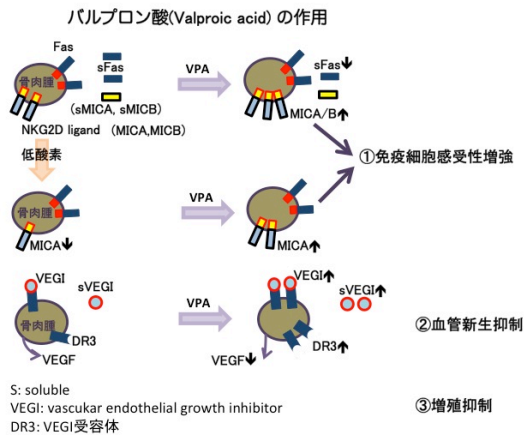
(文献, Int J Oncol, 41: 83-91, 2012)

⑤低酸素の状態では、hypoxia inducing factor -1 α 依存性に骨肉腫細胞の細胞膜 MICA が減少する

⑥バルプロン酸は、低酸素による細胞膜 MICA の減少を抑制する

(文献, Int J Oncol, 41: 2005-2012, 2012)

(3) バルプロン酸はヒト骨肉腫細胞の細胞膜 VEGI の産生を増加させ、遊離 VEGI を増加させること及び、VEGF の産生を抑制することを明らかにした。この二つの作用によりバルプロン酸は、骨肉腫細胞による血管新生を抑制することを明らかにした。また骨肉腫には VEGI 受容体 (DR3) があり、バルプロン酸は DR3 の発現も増加させ、その結果増加した遊離 VEGI と DR3 が結合し、骨肉腫細胞の細胞死が誘導されることも明らかにした。



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9件)

① Futani H, Fukunaga S, Tsukamoto Y, Terada N, Ono J, Okamura N, Otsuka Y, Tanizawa T, Tomatsuri M, Yoshiya S. Small cell osteosarcoma successfully treated by high-dose ifosfamide and methotrexate, combined with carboplatin and pirarubicin. *Anticancer Res.*, 査読有, 32(3), 2012, 965-971

<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22399618>

② Yamada N, Yamanegi K, Ohyama H, Hata M, Nakasho K, Futani H, Okamura H, Terada N. Hypoxia downregulates the expression of cell surface MICA without increasing soluble MICA in osteosarcoma cells in a HIF-1 α -dependent manner. *Int J Oncol.*, 査読有, 41(6), 2012, 2005-2012
DOI:10.3892/ijo.2012.1630

③ Yamanegi K, Yamane J, Kobayashi K, Ohyama H, Nakasho K, Yamada N, Hata M, Fukunaga S, Futani H, Okamura H, Terada N. Downregulation of matrix metalloproteinase-9 mRNA by valproic acid plays a role in inhibiting the shedding of MHC class I-related molecules A and B on the surface of human osteosarcoma cells. *Oncol Rep.*, 査読有, 28(5), 2012, 1585-1590
DOI:10.3892/or.2012.1981

④ Yamanegi K, Yamane J, Kobayashi K, Kato-Kogoe N, Ohyama H, Nakasho K, Yamada

N, Hata M, Fukunaga S, Futani H, Okamura H, Terada N. Valproic acid cooperates with hydralazine to augment the susceptibility of human osteosarcoma cells to Fas- and NK cell-mediated cell death. *Int J Oncol.*, 査読有, 41(1), 2012, 83-91

DOI:10.3892/ijo.2012.1438

⑤ 市橋真理子, 福永訓, 石川貴己, 麩谷博之, 吉矢晋一, 高悪性を疑う所見を呈した傍骨骨肉腫の1例, 査読有, 中部日本整形外科災害外科学会雑誌, 査読有, 55巻, 2012, 317-318

⑥ 石川貴己, 福永訓, 麩谷博之, 市橋真理子, 吉矢晋一, 上腕骨に発生した骨膜性ユーイング肉腫の1例, 中部日本整形外科災害外科学会雑誌, 査読有, 55巻, 2012, 319-320

⑦ 福永訓, 麩谷博之, 石川貴己, 羅本尚樹, 吉矢晋一, 血清CEAはユーイング肉腫の補助診断、病勢を反映するマーカーとなりうるか?, 中部日本整形外科災害外科学会雑誌, 査読有, 55巻, 2012, 1139-1140

⑧ Fujioka H, Futani H, Fukunaga S, Okuno H, Kano M, Tsukamoto Y, Tanaka J, Yoshiya S. Posterior interosseous nerve palsy caused by synovial chondromatosis arising in the annular periradial recesses of the elbow. *Mod Rheumatol.*, 査読有, 21(2), 2011, 192-196

DOI:10.1007/s10165-010-0358-7

⑨ 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, Terada N. Sodium valproate, a histone deacetylase inhibitor, augments the expression of cell-surface NKG2D ligands, MICA/B, without increasing their soluble forms to enhance susceptibility of human osteosarcoma cells to NK cell-mediated cytotoxicity. *Oncol Rep.*, 査読有, 24(6), 2010, 1621-1627

<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21042760>

[学会発表] (計5件)

① 麩谷博之, 大腿骨遠位に発生した骨膜性軟骨肉腫の1例, 第119回中部日本整形外科災害外科学会, 2012/10/05, 福井市

② 麩谷博之, 軟部腫瘍の良性と悪性の鑑別における超音波診断の有用性, 第45回日本整形外科学会骨軟部腫瘍学会, 2012/07/15, 東京

③ 麩谷博之, 四肢における転移性骨腫瘍手術の切除縁, 第 45 回日本整形外科学会骨軟部腫瘍学会, 2012/07/14, 東京

④ 麩谷博之, 小細胞型骨肉腫の 1 例, 第 118 回中部日本整形外科災害外科学会, 2012/04/06, 大阪

⑤ 麩谷博之, 四肢軟部腫瘍に対する画像診断 軟部腫瘍の超音波診断におけるパワー Doppler の有用性, 第 115 回中部日本整形外科災害外科学会, 2010/10/08, 大阪

6. 研究組織

(1) 研究代表者

麩谷 博之 (FUTANI HIROYUKI)
兵庫医科大学・医学部・准教授
研究者番号：30248140

(2) 研究分担者

福永 訓 (FUKUNAGA SATORU)
兵庫医科大学・医学部・助教
研究者番号：40441290

寺田 信行 (TERADA NOBUYUKI)
兵庫医科大学・医学部・教授
研究者番号：50150339

(3) 連携研究者

()

研究者番号：