

科学研究費助成事業（学術研究助成基金助成金）研究成果報告書

平成 25 年 6 月 14 日現在

機関番号：34519

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2011～2012

課題番号：23792159

研究課題名（和文）

ヒストン脱アセチル化阻害剤および DNA メチル化阻害剤を用いた腫瘍血管新生抑制

研究課題名（英文）

Effects of anti-angiogenesis by HDAC inhibitor and DNA methylation 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）：悪性腫瘍内では新生血管形成が盛んに行われており、この新生血管は腫瘍増生のみならず転移の機会を増やしている。本研究ではヒストン脱アセチル化阻害剤(VPA)および DNA メチル化阻害剤(Hy)を用いて、血管新生抑制因子の一つである血管内皮細胞成長抑制因子(VEGI)とそのレセプターである death receptor3(DR3)を介した腫瘍血管新生阻害によるヒト骨肉腫の再発・転移の抑制を検討した。VPA および Hy の併用はヒト骨肉腫において VEGI/DR3 を介した直接的腫瘍増殖抑制効果のみならず VPA によって発現が増強された腫瘍(由来)産生 VEGI がヒト血管内皮細胞に対する血管形成抑制効果(間接的腫瘍新生血管形成)を有することが示唆された。よって本研究はこれまで報告してきた抗腫瘍免疫細胞に対する感受性亢進作用との相加・相乗効果により腫瘍をより効率よく排除し、再発・転移の抑制が可能であると考えられる。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、かつ早期に骨肉腫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 anti-angiogenesis by valproic acid (VPA) (HDAC inhibitor) in combination with hydralazine (Hy) (DNA methylation inhibitor) on U-2 OS and SaOS-2 human osteosarcoma cells. Vascular endothelial growth inhibitor (VEGI) are potent inhibitors to suppress endothelial cell proliferation, angiogenesis, also tumor growth and neovascularization. These inhibitions are mediated by death receptor 3 (DR3) which induces apoptosis, and its function is blocked by decoy receptor 3 (DcR3). VPA increased VEGI expression and Hy increased DR3 expression. Their combination induced further increasing effect of both VEGI and DR3 without induction of DcR3 on osteosarcomas and human microvascular endothelial cells. Furthermore, VPA treated medium of osteosarcoma cells can inhibit tube formation in vitro. Thus, these results, together, suggest that VPA and Hy are considered to be one of the promising strategies in the development of novel anticancer therapy.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
交付決定額	3,200,000	960,000	4,160,000

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、HDAC inhibitor、DNA methylation inhibitor、腫瘍血管新生

1. 研究開始当初の背景固形悪性腫瘍組織は腫瘍微小環境(tumor microenvironment)を構築している。この微小環境のなかでも、癌の増殖・進展にもっとも関係するのが、血管である。癌は自制することなく増生していくにあたって、必要な酸素や栄養を供給するためにより多くの血液が必要であり、そのため盛んに新生血管(腫瘍血管新生)を誘導・形成する。またそれら腫瘍内新生血管は癌細胞が転移していく道筋にもなり、数多く形成される腫瘍内新生血管は癌が転移する機会を増やしている。この腫瘍血管新生を抑制することは、直接的な抗腫瘍効果をもたらすだけでなく、血行性遠隔転移を抑制すると考える。現在、血管新生因子として、Vascular endothelial growth factor (VEGF)等の因子が同定され、これに対する中和抗体や VEGF 受容体などを標的とするキナーゼ阻害薬が開発され、実際に治療薬として使用されている。しかし、改善すべき重篤な副作用や、癌の増悪とともにこの治療薬に対して抵抗性を示す例も報告されている。

2. 研究の目的

腫瘍微小環境の中で腫瘍の増殖に最も関係の深い腫瘍性新生血管形成を抑制し、腫瘍本体のサイズを縮小させ更に血行性転移の機会を最小限に抑ええることを目的とし、ヒストン脱アセチル化阻害剤および DNA メチル化阻害剤を用いて、vascular endothelial growth inhibitor (VEGI)とそのレセプターである death receptor 3 (DR3)を中心に VEGI/DR3 を介した直接的腫瘍増殖抑制効果および腫瘍(由来)産生 VEGI のヒト毛細血管内皮細胞に対する増殖抑制効果(間接的抑制効果)を検討する。また腫瘍内新生血管形成を抑制することによる腫瘍増殖抑制効果および転移抑制効果を検討する。

3. 研究の方法

- (1) 2 種類のヒト骨肉腫細胞株(OS)を用いて VPA および Hy 単独もしくは併用が VEGI mRNA およびタンパク発現に及ぼす影響を *in vitro* で検討する。
- (2) 上記(1)より VPA および Hy の作用が VEGI の発現に影響を及ぼすなら、VEGI

がヒト骨肉腫細胞増殖抑制に及ぼす直接の効果を *in vitro* で検討する。(必要に応じて VEGI 発現ベクターを作成する)

- ① Recombinant VEGI または VEGI 発現ベクターを用いて作成した VEGI 強発現ヒト骨肉腫細胞株を VPA および Hy 作用群と比較検討する。
- (3) 上記(2)より VEGI がヒト骨肉腫の増殖を抑制するのであれば、その作用機序について検討する。
 - ① DR3 を介する細胞内シグナル伝達系を中心にそのメカニズムを検討する。
 - ② VEGI/DR3 結合を阻害する soluble decoy receptor 3 (DcR3)の発現を Real-time PCR および培養上清を ELISA 法にて測定する。(VPA および Hy の効果が DcR3 発現抑制を介する増殖抑制効果を検討できる)
- (4) ヒト血管内皮細胞株(HMVE)を用いて VPA および Hy 単独もしくは併用が VEGI mRNA およびタンパク発現におよぼす効果ならびに VEGI の直接的増殖抑制効果を *in vitro* で検討する。
 - ① 解析方法は(1)(2)に準ずる。(増殖抑制効果は MMT 法および Tube formation(管腔形成)にて測定、評価する)
- (5) 腫瘍(由来)産生 VEGI が HMVE の増殖に及ぼす影響について検討する。
 - ① 上記(2)で得られた培養上清をヒト血管内皮細胞株と共培養し、その増殖能を MMT 法および Tube formation(管腔形成)にて測定、評価する。
- (6) VEGI/DR3 を介する血管内皮細胞管腔形成抑制作用以外に VEGI が有する新生血管抑制機構を検討する。
 - ① VEGI 発現ベクターから抽出したタンパクを免疫沈降し VEGFA 抗体で染色し複合体を形成しているか確認する。また逆の検出方法でも同様の結果が得られるか検討する。
 - ② VPA を作用させた培養液から同様の結果が得られるか検証する。

4. 研究成果

- (1) VPA と Hy 作用による OS 膜表面の endothelial growth inhibitor (VEGI)お

よび death receptor 3 (DR3)の発現に関する検討。

- ① VEGI および DR3 は OS 細胞に発現を認めた。
- ② VPA 作用群では濃度依存的に、発現の増加が認められた。(2.5~4.0 倍) また DR3 に関しては増加傾向を示したが有意差は認めなかった。
- ③ Hy は VEGI に対して効果は認めなかったが、DR3 においては約 5 倍程度の増加を認めた。

(2) OS に対する VPA と Hy 作用による遊離型 VEGI (sVEGI) および DcR3 の形成に及ぼす影響。

- ① VPA 作用群では OS 細胞株の培養液中の sVEGI を約 2 倍程度増加させた。Hy 作用群では影響を及ぼさなかった。
- ② VPA および Hy 作用群の OS 細胞株の培養液中の DcR3 は増加傾向を認めたものの有意差は認めなかった。

(3) VEGI 発現ベクター導入 VEGI 強発現ヒト骨肉腫細胞株と VPA および Hy 作用群との比較検討。

- ① VPA は作用後 7 日目において、OS 細胞株に有意に細胞死を誘導した。
- ② ベクター導入(VEGI 強発現ヒト骨肉腫細胞株)は後 48 時間後の OS 細胞株では約 50%の減少を認め、導入と同時に VPA を作用させた群では約 80%以上が細胞死を引き起こした。
- ③ 細胞死のメカニズムはミトコンドリアにおけるチトクロム C の放出による apoptosis の誘導であり、VEGI/DR3 の経路によることが示唆された。

以上(1)~(3)はOS細胞株に対するVEGIの直接的増殖抑制効果で、VEGI強発現ヒト骨肉腫細胞株にVPAおよびHy作用させると、薬剤のみの作用よりも有意に細胞死を誘導した。このことは薬剤によるVEGIまたはDR3の増加による相加効果であることが示唆された。

(4) ヒト毛細血管内皮細胞(HMVE)に対する

VPA と Hy 作用による細胞増殖能に関する検討。

- ① VPA および Hy 作用群は対照群との比較では増殖能に有意差は認めなかった。

(5) HMVE に対する VPA と Hy 作用による VEGI および DR3 の発現に関する検討。

- ① VPA は HMVE の VEGI 発現を約 2 倍増加させたが、DR3 には影響を及ぼさなかった。
- ② Hy は VEGI 発現に対して効果は認めなかったが、DR3 発現を約 4 倍増加させた。

(6) HMVE に対する VPA と Hy 作用による遊離型 VEGI (sVEGI) および DcR3 の形成に及ぼす影響。

- ① VPA 作用群では HMVE 培養液中の sVEGI を約 2 倍程度増加させたが、Hy 作用群では影響を及ぼさなかった。
- ② VPA および Hy 作用群の HMVE 培養液中の DcR3 は増加傾向を認めたものの有意差は認めなかった。

(7) OS(由来)産生 VEGI がヒト血管内皮細胞の増殖に及ぼす影響に関する検討。

- ① 1.0mM VPA および 10uM Hy 直接作用群では HMVE の管腔形成能を有意に抑制したが、HMVE の細胞死は認めず、増殖抑制の結果であった。
- ② 1.0mM VPA 前処置 OS 培養液で HMVE を培養したところ、HMVE の細胞死を有意に増加させ、管腔形成を有意に阻害した。

(8) VEGI/DR3 を介する管腔形成抑制作用以外に VEGI が有する新生血管抑制機構の検索。

- ① VPA 作用群は VEGFA 発現を有意に減少させた。(その結果として HMVE の管腔形成能を抑制することが示唆された。)
- ② 免疫沈降の結果より VEGI (VEGI 発現ベクターより抽出)は VEGFA と複合体を形成していた。

VEGI は DR3 を介する血管内皮細胞

apoptosisによる新生血管形成抑制のみならず、VEGFAと直接複合体を形成することによって血管形成抑制作用を有している可能性が示唆された。

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腫瘍新生血管抑制が期待できることを明らかにした。

VPAは既に抗てんかん薬として、また Hyは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9件)

1. Yukitatsu Y, Hata M, Yamanegi K, Yamada N, Ohyama H, Nakasho K, Kojima Y, Oka H, Tsuzuki K, Sakagami M, Terada N., Decreased expression of VE-cadherin and claudin-5 and increased phosphorylation of VE-cadherin in vascular endothelium in nasal polyps, *Cell Tissue Res.*, 352, 647-657, 2013
(doi: 10.1007/s00441-013-1583-0)査読(有)
2. Hata M, Iida H, Yamanegi K, Yamada N, Ohyama H, Hirano K, Nakasho K and Terada N., Phenotypic characteristics and proliferative activity of hyperplastic ductule cells in cholangiofibrosis induced by thioacetamide in rats, *Exp Toxicol Pathol.*, 65, 351-356, 2013
(doi: 10.1016/j.etp.2011.11.004.)査読(有)
3. Yamanegi K, Yamane J, Kobayashi K, Kato-Kogoe N, Ohyama H, Nakasho N, Yamada N, Hata M, Fukunaga S, Futani H, Okamura H and Terada N., Down-regulation 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 cell-surface of human osteosarcoma cells, *Oncol Rep.*, 28, 1585-1590, 2012
(doi: 10.3892/or.2012.1981.)査読(有)
4. Yamanegi K, Yamane J, Kobayashi K, Kato-Kogoe N, Ohyama H, Nakasho N, Yamada N, Hata M, Fukunaga S, Futani H, Okamura H and 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.*, 41, 83-91, 2012
(doi: 10.3892/ijo.2012.1438.)査読(有)
5. Itoyama M, HaTa M, Yamanegi K, Yamada N, Ohyama H, Hirano K, Terada N and Nakasho K., Expression of carcinoma and cholangiocarcinoma components in combined hepatocellular and cholangiocarcinoma, *Med Mol Morphol.*, 45(1), 7-13, 2012
(doi: 10.1007/s00795-010-0534-z.)査読(有)
6. Kato-Kogoe N, Nishioka T, Kawabe M, Kataoka F, Yamanegi K, Yamada N, Hata M, Yamamoto T, Nakasho K, Urade M, Terada N, Ohyama H., The promotional effect of IL-22 on mineralization activity of periodontal ligament cells, *Cytokine.*, 59, 41-48, 2012
(doi: 10.1016/j.cyto.2012.03.024.)査読(有)
7. 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.*, 41, 2005-2012, 2012
(doi: 10.3892/ijo.2012.1630.)査読(有)
8. Iida H, Hata M, Kakuno A, Hirano H, Yamanegi K, Yamada N, Ohyama H, Terada N, Yasui C, Yamanaka N and Nakasho K., Expression of hepatocyte markers in mass-forming peripheral and periductal-infiltrating hilar intrahepatic cholangiocarcinomas,

Oncol Letters, 2, 1041-1046, 2011
(doi: 10.3892/ol.2011.405)査読(有)

9. Hatano A, Chiba H, Moesa HA, Taniguchi T, Nagaie S, **Yamanegi K**, Takai-Igarashi T, Tanaka H and Fujibuchi W., CELLPEDIA: a repository for human cell information for cell studies and differentiation analyses, *Database*, 2011 Oct 29; 2011:bar046.
(doi: 10.1093/database/bar046.)査読(有)

[学会発表] (計 10 件)

(特別招聘講演)

1. **山根木康嗣**、ヒストン脱アセチル化阻害剤の癌細胞に及ぼす効果、**第 54 回日本病理学会近畿支部学術集会 (平成 22 年度公募部門学術奨励賞受賞講演)** 2011.9.10、兵庫

(国内学会)

1. **山根木康嗣**、大山秀樹、和唐雅博、富永和也、益野一哉、国分麻佑、嘉藤弘仁、西川哲成、田中昭男、エナメル上皮腫術後再発悪性転化を疑った症例、**第 23 回日本臨床口腔病理学会総会**、2012.08.30、東京
2. **山根木康嗣**、小林健太、中正恵二、大山秀樹、山田直子、秦正樹、寺田信行、ヒストン脱アセチル化阻害剤を用いた腫瘍血管新生抑制、**第 101 回日本病理学会総会**、2012.04.28、東京
3. 大山秀樹、片岡英紗、川辺睦記、小越菜保子、**山根木康嗣**、山田直子、秦正樹、中正恵二、寺田信行、Th17 細胞産生性サイトカインが血管石灰化に及ぼす影響、**第 101 回日本病理学会総会**、2012.04.28、東京
4. 中正恵二、**山根木康嗣**、大山秀樹、平野博嗣、山田直子、秦正樹、寺田信行、肝内胆管嚢胞性腫瘍の 2 例、**第 101 回日本病理学会総会**、2012.04.27、東京
5. 秦正樹、**山根木康嗣**、山田直子、大山秀

樹、平野博嗣、寺田信行、中正恵二、チオアセトアミド誘導ラット肝胆管様管状構造における胆管上皮細胞および肝細胞形質発現と細胞増殖能の検討、**第 101 回日本病理学会総会**、2012.04.27、東京

6. Yamada N, Hata M, **Yamanegi K**, Ohyama H, Nakasho K, Futani H, Okamura H, Terada N, Effective inhibition of postoperative pulmonary metastasis of osteosarcoma cells by a combination of ifosfamide and interleukin-18、**第 34 回日本分子生物学会年会**、2011.12.13、横浜
7. 幡野晶子、千葉啓和、谷口丈晃、**山根木康嗣**、高井貴子、田中博、藤渕航、細胞分化解析を目指した網羅的ヒト細胞データベース「CELLPEDIA」、2011 統合データベースシンポジウム、2011.10.05、東京
8. **山根木康嗣**、大山秀樹、和唐雅博、富永和也、国分麻佑、嘉藤弘仁、益野一哉、西川哲成、田中昭男、左舌口底部腫瘍の 1 例、**第 22 回日本臨床口腔病理学会総会**、2011.08.24、福岡

(国際学会)

1. Hatano, A., Chiba, H., Taniguchi, T., **Yamanegi, K.**, Takai, T., Tanaka, H., Fujibuchi, W., CELLPEDIA: Comprehensive human cell database toward cell differentiation analysis., **Systems Biology : Global regulation of gene expression**, 2012.03.22, New York, USA

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