

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 6 月 17 日現在

機関番号：34519

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2012～2014

課題番号：24592247

研究課題名(和文) ヒストン脱アセチル化及び遺伝子メチル化阻害剤による骨肉腫細胞抗癌剤耐性誘導の抑制

研究課題名(英文) Inhibition of inducing multidrug resistance in human osteosarcoma cells by histone deacetylase inhibitor and DNA methylation inhibitor

研究代表者

寺田 信行 (TERADA, NOBUYUKI)

兵庫医科大学・医学部・名誉教授

研究者番号：50150339

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,100,000円

研究成果の概要(和文)：非ステロイド系抗炎症剤celecoxibがhistone deacetylase (HDAC) inhibitorおよびhydra-lazineによる免疫細胞感受性亢進に影響を及ぼさずに薬剤汲み出し蛋白質(MDR-1、MRP-1)の発現誘導を抑制するかを検討した。HDAC inhibitorとcelecoxibの併用添加は骨肉腫細胞の増殖を著しく抑制した。この併用添加は、細胞の種類により異なる反応を示したが、概ねMDR-1とMRP-1の発現を抑制した。また単独添加では薬剤耐性活性を増加させたが、併用添加は薬剤耐性活性を抑制した。この結果からこの併用は、今後の骨肉腫治療に有用と考えられる。

研究成果の概要(英文)：We investigated that the combination of histone deacetylase (HDAC) inhibitor, hydralazine (DNA methylation inhibitor) and celecoxib (nonsteroidal anti-inflammatory drugs, cyclooxygenase-2 inhibitor) inhibit inducing the expression of multidrug resistance (MDR) protein (MDR-1, MRP-1) in osteosarcoma cells without inhibiting cytotoxic sensitivity. The combination of HDAC inhibitor and celecoxib significantly inhibits cell-proliferation. This combination showed different reactions depending on the type of cells but generally inhibited. HDAC inhibitor alone increased MDR activity, however, combined with celecoxib reduced the activity depended on MDR-1 and MRP-1. These results suggest that combined treatment of HDAC inhibitor, hydralazine and celecoxib may be a useful for enhancing the effect of chemotherapy for osteosarcoma.

研究分野：実験病理学

キーワード：骨肉腫 薬剤耐性 非ステロイド系抗炎症剤

## 1. 研究開始当初の背景

我々は、histone deacetylase (HDAC) inhibitor である valproic acid (VPA) がヒト骨肉腫細胞の増殖を抑制する他に、それらの細胞の遊離の FAS 産生を抑制すると共に FAS ligand による細胞死の感受性を増強させることを明らかにした (Yamanegi et al., J Cancer Res Clin Oncol. 135: 879, 2009)。更に VPA は、ヒト骨肉腫細胞膜の MHC class I-related chain molecule(MICA) 及び MICB (NK 細胞活性化受容体 NKG2D の ligand) の発現を増強させ、ヒト骨肉腫細胞の NK 細胞感受性を増強させることを明らかにした (Yamanegi et al., Oncol Rep. 24: 1621, 2010)。また VPA は、DNA methylation inhibitor である hydralazine と強調してヒト骨肉腫細胞の細胞膜の FAS 発現を増加させると共に FAS ligand による細胞死の感受性も更新させる他に、細胞膜の MICA 及び MICB の発現も増加させ NK 細胞に対するヒト骨肉腫細胞の感受性を増加させることを明らかにした (Yamanegi et al., Oncol Rep. 28: 5, 2012; Yamanegi et al., Int J Oncol. 41: 1, 2012)。一方、マウス骨肉腫モデルを使用して骨肉腫の治療で標準的に行われている術前化学療法、手術、術後化学療法において術前化学療法から手術後にかけて interleukin-18 による免疫療法を行うと術後の肺転移が著しく抑制されることを我々は報告した (Yamada et al. Tumor Biol. 303:176, 2009)。ヒト骨肉腫の治療において術後の肺転移の出現は予後を著しく悪くするので、従来の治療法に免疫療法を併用することはヒト骨肉腫の予後の改善に非常に有効であると思われる。この免疫療法を賦活化するために免疫療法と併用して HDAC inhibitor と DNA methylation inhibitor を添加すれば、更に免疫療法の効果が高まり肺転移を減少させることができると予想される。特に我々が使用している VPA、

hydralazine は各々躁うつ病、高血圧の治療薬として臨床で使用されている薬剤であり、有効濃度は患者血清で十分に到達する濃度である。しかしながら HDAC inhibitor や DNA methylation inhibitor は、癌細胞において可逆的ではあるが MDR-1 (P-glycoprotein)、MRP-1 等の ABC トランスポーター (薬剤汲み出しタンパク質) の発現を誘導し、化学療法の効果を減弱させることが報告されている (Ando et al., Leukemia. 14: 1915, 2000; Okada et al., Int J Cancer. 118: 90, 2006)。従って HDAC inhibitor と DNA methylation inhibitor を免疫療法と併用する時、これらの薬剤による MDR-1、MRP-1 の発現誘導を抑制しなければならない。

最近の研究では、cyclooxygenase-2 (COX-2) の inhibitor は prostaglandin 依存性または非依存性に癌細胞での MDR-1、MRP-1 の発現を抑制することが報告されている (Xia et al., J Cell Biochem. 108: 181, 2009; Roy et al., Cancer Chemother Pharmacol. 65: 903, 2010)。従って、本研究では COX-2 の特異的 inhibitor である非ステロイド系抗炎症剤 celecoxib が VPA 単独及び hydralazine 併用によるヒト骨肉腫細胞での MDR-1、MRP-1 の発現誘導を抑制するか否かを検討する。同時に VPA 単独及び hydralazine 併用によるヒト骨肉腫細胞の細胞障害性免疫細胞感受性亢進作用に及ぼす celecoxib の影響について検討する。

## 2. 研究の目的

我々は、HDAC inhibitor の一つであるバルプロ酸 (VPA) がヒト骨肉腫細胞の細胞増殖を抑制し、更にその細胞傷害性免疫細胞の感受性を亢進させること、また DNA methylation inhibitor の一つである hydralazine が HDAC inhibitor による細胞障害性免疫細胞の感受性亢進作用を増強させることを明らかにし、骨肉腫に対する免疫療法の効果増強に HDAC

inhibitor や DNA methylation inhibitor が有用であることを示した。しかしこれらの薬剤は、薬剤排出能をもつトランスポーターの MDR-1 や MRP-1 の発現を増加させ、がん細胞の抗がん剤耐性を誘導する。そこで本研究は、非ステロイド性消炎・鎮痛薬であり抗がん作用をもつ celecoxib (cyclooxygenase-2 inhibitor) が HDAC inhibitor (VPA、TSA、FK228)、DNA methylation inhibitor による細胞障害性免疫細胞感受性亢進作用に影響を及ぼさずに MDR-1 や MRP-1 の発現誘導を抑制することができるか否かを検討することを目的とした。

### 3. 研究の方法

ヒト骨肉腫細胞として HOS, SaOS-2, U-2 OS の3株を使用し、HDAC inhibitor として VPA、トリコスタチン A (TSA)、romidepsin (FK228) を用いた。

(1) HDAC inhibitor、hydralazine、celecoxib の組み合わせの検討と併用添加による細胞増殖への効果を調べる。

ヒト骨肉腫細胞を HDAC inhibitor (VPA、TSA、FK228)、hydralazine、celecoxib 単独添加した培養液で 3、6 日間培養し、細胞増殖率を調べ、各薬剤の至適条件を検討する。

各薬剤の単独添加の至適条件の結果をもとに、HDAC inhibitor (VPA、TSA、FK228)、hydralazine、celecoxib を併用添加した培養液でヒト骨肉腫細胞を 3、6 日間培養し、細胞増殖率を調べ、薬剤併用の至適条件を検討する。至適条件下でヒト骨肉腫細胞を培養し、細胞増殖に及ぼす薬剤の併用添加の効果を調べる。

(2) MDR-1、MRP-1 の mRNA の発現量を調べる。

HDAC inhibitor (VPA、TSA、FK228)、hydralazine、celecoxib を単独または併用添

加した培養液で 1、3、6 日間培養したヒト骨肉腫細胞から mRNA を回収し、Real Time PCR 法により mRNA の発現量を調べる。

(3) MDR-1、MRP-1 のタンパク質の発現量を調べる。

HDAC inhibitor (VPA、TSA、FK228)、hydralazine、celecoxib を単独または併用添加した培養液で 3、6 日間培養したヒト骨肉腫細胞からタンパク質を回収し、Western blotting および flow cytometry を用いてタンパク質の発現量を調べる。

(4) ローダミン等を用いて MDR-1、MRP-1 による薬剤耐性活性を調べる。

HDAC inhibitor (VPA、TSA、FK228)、hydralazine、celecoxib を単独または併用添加した培養液で 6 日間培養したヒト骨肉腫細胞に、膜透過性のあるローダミンや反応性蛍光化合物 (eFluxx-ID) を取り込ませる。取り込ませる時に、薬剤排出トランスポーターの特異的阻害剤である MDR-1 inhibitor (Verapamil)、MRP-1 inhibitor (MK-571) をそれぞれ添加する。最終的に細胞に取り込まれたローダミンや反応性蛍光化合物の量を FACS で検出し、平均蛍光強度 (MFI: mean fluorescence intensity) から薬剤耐性活性を評価する。

(5) MICA、MICB、FAS の mRNA およびタンパク質の発現量を調べる。

研究の方法 (2) (3) と同様に、MICA、MICB、FAS の mRNA およびタンパク質の発現量を調べる。

### 4. 研究成果

(1) HDAC inhibitor、hydralazine、celecoxib の組み合わせの検討と併用添加による細胞増殖への効果を調べる。

ヒト骨肉腫細胞の HOS、SaOS-2、U-2 OS

の3株を3、6日間培養し、細胞増殖率を調べた。その結果、単独添加では、VPA 1-10 mM、TSA 10-50 mM、FK228 0.5-3 ng/ml、hydralazine 5-50  $\mu$ M、celecoxib 5-50  $\mu$ Mが至適培養濃度の範囲であることが分かった。この結果をもとにヒト骨肉腫細胞をHDAC inhibitor (VPA、TSA、FK228)、hydralazine、celecoxibを組み合わせて培養液に添加して3、6日間培養し、細胞増殖率を調べた。どの細胞においても併用添加時の細胞増殖率が無添加時の細胞増殖率の10%以下にならない条件を求めた結果、各々の薬剤濃度は、VPA 1mM、TSA 25mM、FK228 0.5ng/ml、hydralazine 10  $\mu$ M、celecoxib 25  $\mu$ Mが最適であることが分かった。以降の実験にはこの濃度を用いた。HDAC inhibitor (VPA、TSA、FK228)とcelecoxibを併用添加した場合は、単独添加に比べどのHDAC inhibitorでも細胞増殖は著しく抑制された。一方HDAC inhibitor (VPA、TSA、FK228)とhydralazineを併用添加した場合は、単独添加に比べどのHDAC inhibitorでも細胞増殖はわずかに増加した。培養期間が3日間でも6日間でも同様の結果が得られた。

(2) MDR-1、MRP-1のmRNAの発現量を調べる。

MDR-1の発現は、VPAの単独添加およびcelecoxibまたはhydralazineとの併用添加により著しく増加したが、TSA、FK228の単独・併用添加では変化しなかった。一方MRP-1の発現は、単独・併用添加に関わらず大きく変化しなかった。この結果は、HOS、SaOS-2、U-2 OSのどの細胞でも見られ、1、3、6日間培養のどの培養期間でも見られた。

(3) MDR-1、MRP-1のタンパク質の発現量を調べる。

Western blottingを行った結果、MDR-1の発現は、HOS、SaOS-2、U-2 OSの3株は異なる

反応を示した。

HOSでは、HDAC inhibitor (VPA、TSA、FK228)の単独添加により、MDR-1の発現が増加し、HDAC inhibitor (VPA、TSA、FK228)とcelecoxibまたはhydralazineの併用添加により、MRP-1の発現が抑制された。SaOS-2では、HDAC inhibitor (VPA、TSA、FK228)あるいはHDAC inhibitor (VPA、TSA、FK228)とhydralazineの併用添加の添加により、MDR-1の発現はほとんど増加しなかったが、HDAC inhibitor (VPA、TSA、FK228)とcelecoxibの併用添加により、MRP-1の発現がわずかに増加した。U-2 OSでは、TSAおよびFK228の単独添加によりMDR-1の発現が増加したが、VPA単独添加ではMDR-1の発現は抑制された。HDAC inhibitor (VPA、TSA、FK228)とcelecoxibまたはhydralazineの併用添加により、MRP-1の発現が抑制された。

MRP-1の発現は、3種類の細胞で同様の変化を示した。MRP-1の発現は、celecoxibの単独添加およびcelecoxibとHDAC inhibitor (VPA、TSA、FK228)の併用添加により著しく抑制された。MRP-1の発現は、hydralazineとTSAまたはFK228の併用添加により、抑制された。MRP-1の発現は、HDAC inhibitor (VPA、TSA、FK228)の単独添加およびhydralazineとVPAの併用添加によりほとんど変化しなかった。

flow cytometryを行った結果、3種類の細胞はどの条件で培養した場合でも細胞表面にMDR-1およびMRP-1を強く発現しており、発現量の変化は見られなかった。

(4) ローダミン等を用いてMDR-1、MRP-1による薬剤耐性活性を調べる。

HOSでは、VPA、TSA、FK228の単独添加により、薬剤耐性活性が増加した。celecoxibとの併用添加により、薬剤耐性活性が減少し、MDR-1、MRP-1依存性に薬剤耐性抑制効果が増加した。またVPAとcelecoxibの併用添加に

より、薬剤耐性活性が減少し、MDR-1 依存性に薬剤耐性抑制効果が増加した。SaOS-2 では、VPA、TSA、FK228 の単独添加による薬剤耐性活性は増加せず、celecoxib との併用添加により、MDR-1、MRP-1 依存性に薬剤耐性抑制効果が増加した。U2-OS では、VPA、TSA、FK228 の単独添加により、MRP-1 依存性薬剤耐性活性が増加した。また、VPA と celecoxib の併用添加、および hydralazine の単独・併用添加により、MDR-1 依存性に薬剤耐性抑制効果が増加した。

(5) MICA、MICB、FAS の mRNA およびタンパク質の発現量を調べる。

Real Time PCR 法により、HDAC inhibitor (VPA、TSA、FK228) の単独添加群と、HDAC inhibitor (VPA、TSA、FK228) と celecoxib または hydralazine の併用添加群を比較したところ、MICA、MICB、FAS の mRNA の発現量は変化しなかった。

Western blotting を行った結果、MICA、MICB、FAS のタンパク質の発現量は、HDAC inhibitor (VPA、TSA、FK228) と celecoxib または hydralazine の併用添加により変化しなかった。

## 5 . 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計7件)

Yamanegi K, Kawabe M, Futani H, Nishiura H, Yamada N, Kato-Kogoe N, Kishimoto H, Yoshiya S, Nakasho K. Sodium valproate, a histone deacetylase inhibitor, modulates the vascular endothelial growth inhibitor-mediated cell death in human osteosarcoma and vascular endothelial cells. *Int J Oncol*. 2015 May;46(5):1994-2002. doi: 10.3892/ijo.2015.2924. 査読有

Kawabe M, Ohyama H, Kato-Kogoe N, Yamada N, Yamanegi K, Nishiura H, Hirano H,

Kishimoto H, Nakasho K. Expression of interleukin-34 and colony stimulating factor-1 in the stimulated periodontal ligament cells with tumor necrosis factor- $\alpha$ . *Med Mol Morphol*. 2014 Dec 30. [印刷中] 査読有

Hata M, Yamanegi K, Yamada N, Ohyama H, Yukitatsu Y, Nakasho K, Okamura H, Terada N. Estrogen decreases the expression of claudin-5 in vascular endothelial cells in the murine uterus. *Endocr J*. 2014;61(7):705-15. 査読有

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*. 2013 Jun;352(3):647-57. doi: 10.1007/s00441-013-1583-0. 査読有

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 $\alpha$ -dependent manner. *Int J Oncol*. 2012 Dec;41(6):2005-12. doi: 10.3892/ijo.2012.1630. 査読有

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*. 2012 Nov;28(5):1585-90. doi: 10.3892/or.2012.1981. 査読有

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. 2012 Jul;41(1):83-91. doi: 10.3892/ijo.2012.1438. 査読有

〔学会発表〕(計4件)

山田直子、山根木康嗣、大山秀樹、寺田信行、中正恵二 低酸素による細胞表面 MICA の糖鎖修飾の低下 第36回日本分子生物学会 2013.12.3 神戸ポートアイランド(兵庫県、神戸市)

山田直子、山根木康嗣、大山秀樹、中正恵二、秦正樹、寺田信行 骨肉腫細胞における低酸素誘導性の細胞表面 MICA の発現低下 第35回日本分子生物学会 2012.12.11-14 福岡国際会議場・マリンメッセ福岡(福岡県、福岡市)

山根木康嗣、小林健太、中正恵二、大秀樹、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 2012.04.26-28 京王プラザ(東京都、新宿区)

大山秀樹、片岡芙紗、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 2012.04.26-28 京王プラザ(東京都、新宿区)

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

寺田信行 (TERADA, Nobuyuki)  
兵庫医科大学・医学部・名誉教授  
研究者番号: 50150339

### (2) 研究分担者

中正恵二 (NAKASHO, Keiji)  
兵庫医科大学・医学部・教授  
研究者番号: 00217712

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

山田直子 (YAMADA, Naoko)  
兵庫医科大学・医学部・講師  
研究者番号: 10319858

秦正樹 (HATA, Masaki)  
兵庫医科大学・医学部・研究生(研究員)  
研究者番号: 10446057

大山秀樹 (OHYAMA, Hideki)  
兵庫医科大学・医学部・非常勤講師  
研究者番号: 90280685