

平成 21年 6月 18日現在

研究種目：若手研究(B)  
 研究期間：2007～2008  
 課題番号：19791388  
 研究課題名（和文）IL-18 を用いたヒト骨肉腫に対するサイトカイン療法の有効性向上に関する研究  
 研究課題名（英文）Improvement of immunotherapy for human osteosarcoma  
 研究代表者  
 山根木 康嗣 (YAMANEGI KOJI)  
 兵庫医科大学・医学部・助教  
 研究者番号：00434944

研究成果の概要：ヒト骨肉腫細胞株(OS)を用い IL-18 が OS の FasL 抵抗性に及ぼす影響を検討した。4 種のヒト骨肉腫細胞株は IL-18 receptor を発現しているが、腫瘍増殖、Fas の発現には全く影響をおよぼさず、遊離型 Fas (sFas) の分泌においても変化はみられなかった。次に histone deacetylase inhibitor である sodium valproate (VPA) について上記と同様の目的にて検索した結果、VPA はヒト骨肉腫細胞の増殖を抑制した。また sFas の分泌を抑制し、FasL に対する感受性を増加させ、OS の免疫細胞抵抗性を減弱させることが示された。さらに VPA の前処置は Fas を介した apoptosis の signal 伝達を活性化させることが示された。VPA はすでに抗てんかん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。

## 交付額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2007 年度	1,700,000	0	1,700,000
2008 年度	1,600,000	480,000	2,080,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,300,000	480,000	3,780,000

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、免疫療法、histone deacetylase inhibitor、遊離型 Fas (sFas)

## 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使用して行う必要がある。その治療法の一つとして、NK細胞や細胞障害性T細胞等の抗腫瘍免疫細胞の活性化による免疫療法がある。しかしながら、骨肉腫細胞を含む多くの腫瘍細胞は、抗腫瘍免疫細胞に対して種々の抵抗性を示す。従って、骨肉腫の治療に免疫療法を適用するには、この抗腫瘍免疫細胞抵抗性を克服する方法を講じなければならず、化学療法併用または化学療法に変わる新たな治療法の開発が強く望まれている。

## 2. 研究の目的

骨肉腫は Fas を発現していることが知られている。Fas は cytotoxic CD8<sup>+</sup> T細胞などのキラー細胞が発現する Fas Ligand (FasL) と接着するとカスケード反応によって腫瘍細胞の DNA に障害が起こりアポトーシスが誘導される。ところが、多数のヒト骨肉腫細胞株を用いた実験成績では、ヒト骨肉腫細胞は、その細胞膜表面 Fas を発現しているが、同時に遊離(soluble)の Fas (sFas) も分泌している。この sFas の分泌が多い細胞株では、sFas により Fas ligand (FasL) が細胞膜上の Fas と結合することが阻害され、FasL による細胞障害効果が著しく減弱されることが報告されている。従って、IL-18 による骨肉腫の増殖抑制が実際にヒト骨肉腫細胞に対しても有効であるためには、ヒト骨肉腫細胞における Fas の発現を増加させるとともに、sFas の形成、分泌を抑制し、FasL に対する感受性を増加させることが必要である。

従って、本研究では

- (1) IL-18 がヒト骨肉腫細胞に対して、細胞膜上の Fas 発現を増加させ、sFas の発現を抑制する作用があり、FasL に対するヒト骨肉腫細胞の感受性を亢進させることができるか否かについて検索する。
- (2) ヒト骨肉腫細胞の FasL に対する感受性を亢進させることのできる薬剤を検索する。(この候補として、実際骨肉腫治療に用いられている抗癌剤や抗うつ薬の主成分である histone deacetylase inhibitor を考えている。)
- (3) FasL に対する感受性を亢進することので

きる薬剤が見つければ、次にこの薬剤の in vivo での投与が、IL-18 による抗腫瘍免疫細胞の Fas-FasL 系を介する細胞障害活性に影響を及ぼさないかどうか検討する。

免疫細胞活性作用を持つ IL-18 が、ヒト骨肉腫細胞の FasL に対する感受性の亢進作用があることが明らかになれば、単独でヒト骨肉腫の治療に応用できることが示される。もしその作用がなかった場合でも、その作用を持つ薬剤と免疫細胞活性作用を持つ IL-18 の併用で、ヒト骨肉腫を治療できることが示される。

## 3. 研究の方法

- (1) ヒト骨肉腫細胞株を用いて IL-18 が細胞膜 Fas (Fas) 及び遊離の Fas (sFas) 発現に及ぼす効果を in vitro で検討する。
  - ① ヒト骨肉腫細胞株の IL-18 受容体の発現を、RT-PCR 及び Western blot 法または FACS にて解析する。
  - ② IL-18 受容体が、機能しているか否かを NF $\kappa$ B の活性化を指標として検討する。
  - ③ IL-18 とヒト骨肉腫細胞を培養し、Fas 発現は FACS、sFas 発現は培養上清を ELISA 法にて評価する。
  - ④ IL-18 と培養したヒト骨肉腫細胞に抗 Fas 抗体を加えて、細胞死の程度を調べて検討する。  
(IL-18 によるヒト骨肉腫細胞の FasL 感受性亢進の効果を in vitro で評価できる。)
- (2) Histone deacetylase inhibitor である sodium valproate (VPA) がヒト骨肉腫細胞株の Fas 及び sFas 発現に及ぼす効果を in vitro および in vivo で検討する。
  - ① VPA とヒト骨肉腫細胞を培養し、Fas 発現は FACS、sFas 発現は培養上清を ELISA 法にて評価する。
  - ② VPA と培養したヒト骨肉腫細胞に抗 Fas 抗体を加えて、細胞死の程度を調べて

検討する。  
(VPAによるヒト骨肉腫細胞のFasL感受性亢進の効果を *in vitro* で評価できる。)

- ③ ヒト骨肉腫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Fas発現を解析し、同時に生細胞を分離する。
  - ④ 上記③の生細胞を24時間(short culture)培養し、培養液中のsFasをELISA法で検討する。
  - ⑤ 上記③の生細胞を抗Fas抗体を含む培養液で24時間培養し、細胞死の程度を比較する。  
(VPAによるヒト骨肉腫細胞のFasL感受性亢進の効果を *in vivo* で評価できる。)
- (3) ヒト骨肉腫細胞の検索株の種類を増やし、IL-18、VPA、各種抗癌剤のFasL感受性に及ぼす効果を検討すると共に、新しいHDAC-Iの効果を検討する。
- (4) 各種抗癌剤によるヒト骨肉腫細胞株のFas及びsFas発現に及ぼす効果を *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 cyclophosphamide (CTX)、ifosfamide (IFX)、etoposide、doxorubicin、cisplatin、methotreatate 等を使用する。)
- ① 各種抗癌剤とヒト骨肉腫細胞を培養、FACSでFas発現を解析し、同時に生細胞を分離する。
  - ② 上記①の生細胞を24時間(short culture)培養し、培養液中のsFasをELISA法で検討する。
  - ③ 上記①の生細胞を抗Fas抗体を含む培養液で24時間培養し、細胞死の程度を比較する。  
(各種抗癌剤によるヒト骨肉腫細胞のFasL感受性亢進の効果を *in vitro* で評価できる。)
  - ④ ヒト骨肉腫細胞をスキッドマウスの皮

下に移植し、各種抗癌剤又は溶媒を1週間から連日投与。3週後に腫瘍を摘出し、腫瘍細胞をFACSでFas発現を解析すると同時に生細胞を分離する。

- ⑤ 上記④の生細胞を24時間(short culture)培養し、培養液中のsFasをELISA法で検討する。
  - ⑥ 上記④の生細胞を抗Fas抗体を含む培養液で24時間培養し、細胞死の程度を比較する。  
(各種抗癌剤によるヒト骨肉腫細胞のFasL感受性亢進の効果を *in vivo* で評価できる。)
- (5) ヒト骨肉腫細胞株のFasL感受性を亢進させる薬剤(VPA, etc.)及び各種抗癌剤がIL-18によって活性化される免疫細胞に及ぼす影響を検討する。
- ① マウスにDunn細胞を移植し、一週間後からIL-18と上記各種薬剤を単独及び併用投与する。これら投与の効果を3日毎に腫瘍径を測定して、腫瘍増殖に及ぼす影響を評価する。
  - ② 移植3-4週後にマウス脾を摘出、脾の浮遊細胞数を調べると共にCD8<sup>+</sup>T細胞をMACS<sup>R</sup>(抗体 selection法)で分離し、CD8<sup>+</sup>T細胞の脾での数を計測する。
  - ③ Dunn細胞を標的細胞として、CD8<sup>+</sup>T細胞の細胞障害活性をcytotoxic activity assayによって比較する。  
(各種薬剤がIL-18の免疫細胞活性に影響するか評価できる。)

#### 4. 研究成果

- (1) IL-18によるヒト骨肉腫細胞(OS)への直接的な作用の検討。
- ① OSはIL-18 receptorをmRNAレベルで発現していた。
  - ② IL-18はOSに対して細胞増殖能、FasにおけるmRNAおよびタンパク発現には全く影響をおよぼさなかった。
  - ③ 遊離型Fas(sFas)の分泌においても対照群に比して変化はみられなかった。

- (2) Histone deacetylase inhibitor である sodium valproate (VPA) による OS の増殖能に関する検討。
- ① 0.5mM, 1.0mM 濃度において VPA 作用 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 その抑制機序は G1 期および G2/M 期における細胞周期の拘束によるものであった。
- (3) VPA による OS 膜表面 Fas および Fas ligand の発現に関する検討。
- ① MG63, U-2OS, SaOS-2 では VPA 0.5mM, 1.0mM 濃度で 7 日目において、有意に減少した。HOS に関しては増加傾向を示したが、有意差は認めなかった。
  - ② さらにこれら 4 種類の OS では Fas ligand の発現が認められないか、わずかであり、VPA の作用による変化は認めなかった。
- (4) Fas 抗体を用いた apoptosis の検討。
- ① VPA 作用後 7 日目には 4 種類全ての細胞株において 0.5mM, 1.0mM 濃度で有意に細胞死を誘導した。
  - ② 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 を介した系によって apoptosis が誘導されていることを証明した。
- (5) 分泌型 Fas (sFas) の形成に及ぼす影響。
- ① VPA 作用 7 日目において、すべての細胞株で有意に sFas の形成を抑制した。
  - ② 別の Histone deacetylase inhibitor である Trichostatin A (TSA) においても同様に作用 7 日目においてすべての OS 細胞株で有意に sFas が減少した。
- (6) VPA 前処置による細胞死の変化の検討。
- ① VPA 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。

これらの結果より、VPA は骨肉腫細胞の増殖を抑制した。また sFas の分泌を抑制し、FasL に対する感受性を増加させた。さらに VPA の前処置は Fas を介した apoptosis の signal 伝達を活性化させることが示された。

以上より、Histone deacetylase inhibitor (VPA および TSA) はヒト骨肉腫細胞の Fas ligand に対する抵抗性を減弱させることが示され、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 3 件)

- ① Yamanegi K, Yamane J, Hata M, Ohyama H, Kato-Kogoe N, Futani H, Nakasho K, Okamura H and Terada N., Sodium valproate, a histone deacetylase inhibitor, decreases the secretion of soluble Fas by human osteosarcoma cells and increases their sensitivity to Fas-mediated cell death, *Journal of Cancer Research and Clinical Oncology.*, 135(7), 879-889, 2009, 査読 (有)
- ② Nishio S, Ymada N, Ohyama H, Yamanegi K, Nakasho K, Hata M, Nakamura Y, Fukunaga S, Futani H, Yoshiya S, Ueda H, Taniguchi M, Okamura H and Terada N., Enhanced suppression of pulmonary metastasis of malignant melanoma cells by combined administration of  $\alpha$ -galactosylceramide and interleukin-18, *Cancer Sci.*, 99(1), 113-20, 2008, 査読 (有)

- ③ Ohyama H, Kato-Kogoe N, Nishimura F, Takeuchi-Hatanaka K, Matsushita S, Yamanegi K, Yamada N, Hata M, Nakasho K and Terada N., Differential effects of polymorphisms in the 5' flanking region of IL12RB2 on NK- and T-cell activity, *J. Interferon Cytokine Res.*, 28(9), 563-570, 2008, 査読 (有)

[学会発表] (計 1 件)

- ① 山根木康嗣、山根順子、秦正樹、大山秀樹、山田直子、中正恵二、寺田信行、ヒト骨肉腫細胞の免疫療法抵抗性に対する histone deacetylase inhibitor の効果、第 9 7 回日本病理学会総会、平成 2 0 年 5 月 1 6 日、金沢

## 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・助教

研究者番号：00434944