

## 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 5 月 30 日現在

機関番号：83901

研究種目：基盤研究（C）

研究期間：2010～2012

課題番号：22591672

研究課題名（和文）骨肉腫転移阻止の為の血管新生抑制剤と抗体投与による併用療法の開発

研究課題名（英文）The effect of anti-angiogenic therapy and antibody therapy for distant metastasis in osteosarcoma.

研究代表者 杉浦 英志（SUGIURA HIDESHI）

愛知県がんセンター（研究所）・腫瘍免疫学部・研究員

研究者番号：50303615

研究成果の概要（和文）：

抗 IL-2 $\alpha$ モノクローナル抗体（PC61）と抗 IL-2 モノクローナル抗体（S4B6）を投与したマウスに骨肉腫株（LM8）を皮下移植し、腫瘍の増殖抑制と転移抑制の程度を検討した。その結果、正常血清投与したマウスに比べて両群ともに腫瘍増殖及び転移を有意に抑制することが出来た。また、制御性 T 細胞の消長を FACS で検討した結果、PC61 や S4B6 投与による Treg 削除が確認された。次に、Candesartan の併用効果について検討したが、有意差は得られなかった。LM8 の増殖や転移への抑制は S4B6 あるいは PC61 による影響が大きいものと考えられた。

研究成果の概要（英文）：

We evaluated the antitumor activity of anti-interleukin 2 receptor (IL2R) $\alpha$  (CD25) monoclonal antibody (PC61) or an anti-interleukin-2 monoclonal antibody (S4B6) in a murine osteosarcoma model (LM8). Tumors size and the numbers of lung and liver metastatic colonies were significantly decreased in both PC61 and S4B6 groups. Flow cytometry revealed that mouse regulatory T cells (Treg) can be deleted by intraperitoneal injection of PC61 or S4B6. Next, we examined the effectiveness of PC61 or S4B6 combined with Candesartan, but there were significantly no differences. It was suggested that PC61 and S4B6 strongly will suppress metastases and tumor progression.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2010 年度	1,600,000	480,000	2,080,000
2011 年度	900,000	270,000	1,170,000
2012 年度	1,000,000	300,000	1,300,000
年度			
年度			
総計	3,500,000	1,050,000	4,550,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：外科系臨床医学

キーワード：骨・軟部腫瘍学

## 1. 研究開始当初の背景

骨肉腫は原発性悪性骨腫瘍中 44%で最も多数

を占めている腫瘍である。この腫瘍は 1970 年代までは 5 年生存率は約 20%と極めて予後不良の腫瘍であったが、その後化学療法など

の進歩により、現在では 70%まで改善している。しかし、術後に肺転移を起こす症例が 40–50%あるといわれており、肺転移は最大の予後不良因子である。骨肉腫肺転移への機構を調べ、新たな転移抑制につながる治療法を開発することが急務である。

腫瘍が増殖・転移をするためには血管新生を伴うことが必須と考えられており、Leverらは 1998 年に、ACE 阻害剤を定期的に内服している場合がんの発生率が低下する可能性がある、5207 症例の retrospective cohort study の結果として報告している。ACE 阻害剤は、一般的にはレニン・アンギオテンシン経路を阻害し、アンギオテンシン II による血管収縮を抑制し血圧を下げる薬剤として使用されている。最近、アンギオテンシン II が血管新生促進因子である VEGF (血管内皮細胞増殖因子) の発現に関与していることが分かり、マウス癌モデルを用い ACE 阻害剤や Angiotensin II receptor antagonist を投与することで、VEGF の発現が抑制され、その結果癌転移が抑制されたという報告がなされている。しかしながら、骨肉腫では、血管新生を抑制する方法による転移抑制を試みた報告は見られていない。また、抗 IL-2 レセプター (IL-2R)  $\alpha$  (CD25) モノクローナル抗体 (PC61) はマウスの IL-2R $\alpha$  (CD25) に対するラット抗体であり、PC61 をマウスに投与すると CD25 陽性細胞が削除され、それに伴って臓器局在性の自己免疫病が発症することが見出され、CD25 陽性細胞の中に regulatory T cells が存在することが見出された。PC61 を投与したマウスに腫瘍を移植しておくとも腫瘍細胞の増殖が抑制されることが報告されている。これにより PC61 投与による regulatory T cells の削除が一部の悪性腫瘍に対して抗腫瘍効果をきたすことが示された。しかしながら、PC61 の投与が骨肉腫に対

しても同様の腫瘍抑制効果を示すかどうか、またこの投与が悪性腫瘍の遠隔転移を抑制するかどうかは今のところ明らかではない。さらに、また最近、マウスに抗 IL-2 モノクローナル抗体 (S4B6) を注射しておくとも、臓器抗原反応性のリンパ球には影響を及ぼさないが CD25 陽性リンパ球を極端に抑制されることが見出された。しかしながら、S4B6 の投与が骨肉腫に対して腫瘍抑制効果を示すかどうかは今のところ明らかにされていない。

## 2. 研究の目的

C3H マウス由来の骨肉腫細胞株 Dunn とこの株から樹立された肺に高転移をきたす LM8 骨肉腫細胞株を使用して、骨肉腫の肺転移を抑制する方法を見出すことを目的とする。抗 IL-2 レセプター (IL-2R)  $\alpha$  (CD25) モノクローナル抗体 (PC61) あるいは抗 IL-2 モノクローナル抗体 (S4B6) により、Regulatory T 細胞 (Treg) を削除したマウスに骨肉腫細胞株を移植したとき、腫瘍に対する増殖・進展抑制があるかどうか。また、血管新生抑制剤として Angiotensin II type1 receptor antagonist である Candesartan (CV-11974) が腫瘍増殖や転移の抑制効果を示すのかどうかにつき検討を行う。さらに、PC61 と S4B6 との間において腫瘍の増殖抑制と転移抑制の程度に差があるのか、血管新生抑制剤との併用効果があるのかにつき検討を行う。

## 3. 研究の方法

### (1) 細胞培養と腫瘍移植

高肺転移をきたす骨肉腫細胞株である LM8 に対し DMEM 液で継代培養を行い、PBS 液中で維持した培養液 100  $\mu$ l (細胞数  $1 \times 10^6$ ) を C3H マウスの背部の皮下に注射し腫瘍を移植した。C3H マウスに腫瘍移植 1 週間前から実験終了まで、週 2 回 PC61 及び S4B6 を 0.2mg

腹腔内投与した（移植前投与群：Pre-PC61、Pre-S4B6）。また、PC61 及び S4B6 の投与を腫瘍移植後 2 日目から実験終了まで投与した群を Post-2 PC61 及び Post-2 S4B6（移植後投与群）とした。さらに、PBS を投与した群をコントロール群（PBS control）とし、腫瘍の抑制効果や転移抑制効果を比較検討した。腫瘍の皮下移植から 4 週を目処に屠殺し、肺、肝臓等を取り出し、重量を計測した。各組織は病理標本とし、標本にて肺や肝臓への転移結節数を計測した。尚、移植したマウス骨肉腫 LM8 の皮下腫瘍重量と肺・肝・腎の転移結節数の比較検討には T 検定を行い、P 値が 0.05 以下を有意とした。

#### (2) Regulatory T 細胞 (Treg) の検討

C3H マウスに抗 IL-2R $\alpha$  モノクローナル抗体 (PC61) あるいは抗 IL-2 モノクローナル抗体 (S4B6) を週 2 回 0.2mg を腹腔内投与し、最終投与後 3 日で脾臓やリンパ節を採取し、CD25 陽性細胞の比率を FACS で検討し、Treg のポピュレーションの消失を確認した。

#### (3) Candesartan (CV-11974) による腫瘍抑制効果

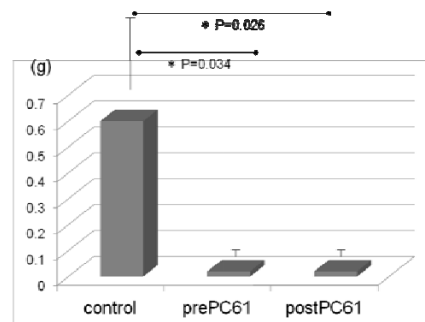
Candesartan (CV-11974) を数段階の濃度 (0.01~3mg/kg/day) で用意し、C3H マウスに骨肉腫 LM8 移植 2 日前より腹腔内投与させ、PBS を腹腔内投与する群を対照とした。腫瘍の皮下移植から 4 週を目処に屠殺し、肺、肝臓等を取り出し、重量を計測した。各組織は病理標本とし、標本にて肺や肝臓への転移結節数を計測した。また抗 Angiotensin II type1 receptor 抗体、抗 VEGF 抗体による免疫染色にて Angiotensin II type1 receptor、VEGF の発現に各群で差がみられるかを解析し、さらに CV-11974 の最小有効投与量を確定後、CV-11974 の薬剤投与と抗 IL-2R $\alpha$  抗体 (PC61) あるいは抗 IL-2 抗体 (S4B6) 投与を併用したマウスに骨肉腫細胞 (LM8) を移植

した場合の腫瘍の消長を検討した。

#### 4. 研究成果

##### 1. 抗 IL-2R $\alpha$ (CD25) 抗体 (PC61) 及び抗 IL-2 モノクローナル抗体 (S4B6) 投与による腫瘍重量の比較検討

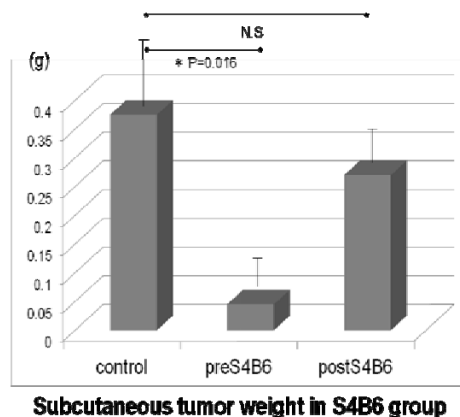
LM8 を皮下移植する前に PC61 を投与した群 (Pre-PC61 群) と LM8 移植後に PC61 を投与した群 (Post-PC61 群) の腫瘍重量はともに PBS 投与したコントロール群と比較して明らかに小さかった (図 1)。



Subcutaneous tumor weight in PC61 group

図 1 PC 投与群における腫瘍重量の比較

次に、抗 IL-2 モノクローナル抗体 (S4B6) を移植した皮下腫瘍の重量の比較検討をしたところ、移植前投与群 (Pre-S4B6) ではコントロール群と比較して有意に縮小していた ( $p=0.016$ ) が、移植後投与群 (Post-S4B6 群) ではコントロール群とは腫瘍重量に差は見られなかった (図 2)。

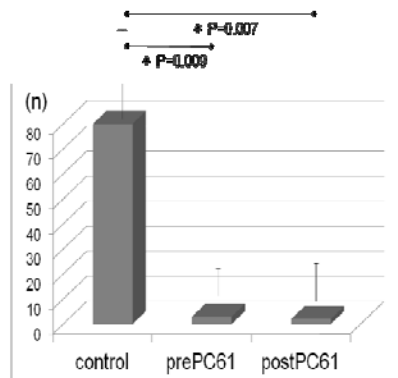


Subcutaneous tumor weight in S4B6 group

図 2 S4B6 投与群における腫瘍重量の比較

(2) 抗 IL-2R $\alpha$  (CD25)抗体 (PC61) 及び抗 IL-2 モノクローナル抗体 (S4B6) 投与による肺転移結節数、肝転移結節数の比較検討

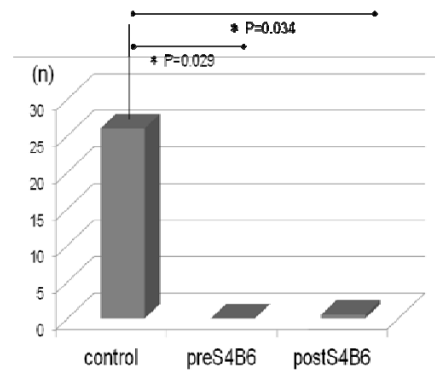
抗体の投与により肺と肝臓への LM8 の転移数が減少するかどうかを調べるため、顕微鏡弱拡大にて実際に肉眼的に組織切片内の転移数を計測した。肺転移結節数の比較においては LM8 を皮下移植する前に PC61 を投与した群 (Pre-PC61 群) では肺転移例は 11 例中 1 例、LM8 移植後に PC61 を投与した群 (Post-PC61 群) では 10 例中 0 例、PBS 投与したコントロール群では 10 例中 7 例であり、Pre-PC61 群、Post-PC61 群ともに有意に肺転移を抑制していた (図 3)。



Number of lung metastatic colonies in PC61 group

図 3 PC61 投与における肺転移数の比較

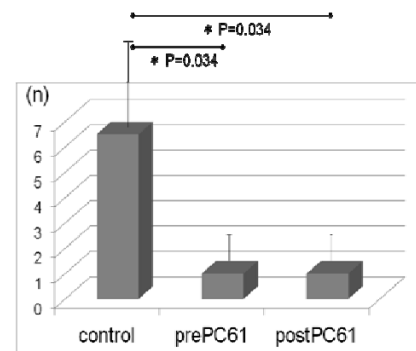
また、抗 IL-2 モノクローナル抗体 (S4B6) を投与した場合においても肺における転移結節数をカウントして比較すると、LM8 を皮下移植前に S4B6 を投与した群 (Pre-S4B6) と LM8 を皮下移植後に S4B6 を投与した群 (Post-S4B6) とともに、コントロール群と比較して有意に肺転移は抑制されていた ( $p=0.029$ ,  $p=0.034$ ) (図 4)。



Number of lung metastatic colonies in S4B6 group

図 4 S4B6 投与における肺転移数の比較

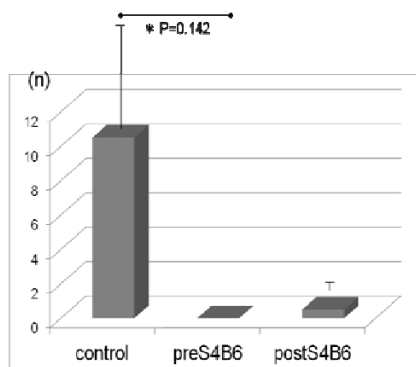
同様に、PC61 投与による肝転移結節数を比較したところ、肝転移巣の数もコントロール群と較べて Pre-PC61 群、Post-PC61 群ともに有意に少なかった ( $P=0.013$ )。PC61 投与により肝臓への転移は抑制された (図 5)。



Number of liver metastatic colonies in PC61 group

図 5 PC61 投与における肝転移数の比較

また、S4B6 投与による肝転移結節数の比較においても肝における転移結節数は移植前投与群 (Pre-S4B6)、移植後投与群 (Post-S4B6) とともにコントロール群と比較して肝臓への転移結節数が減少する傾向が認められた (図 6)。

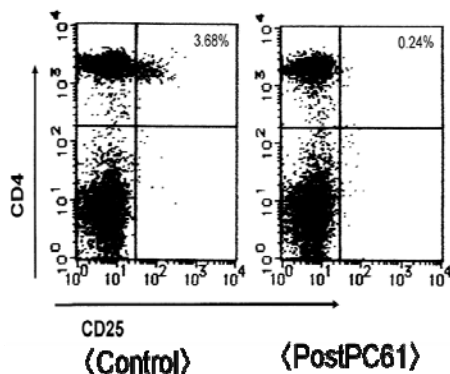


Number of liver metastatic colonies in S4B6 group

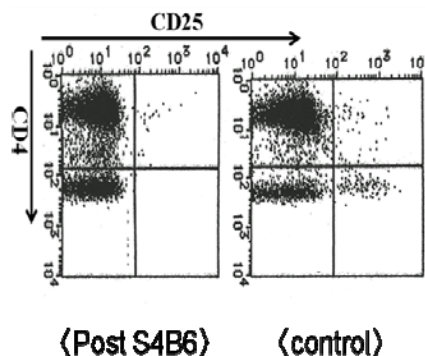
図6 S4B6投与における肝転移数の比較

(3) Regulatory T細胞 (Treg) の検討

抗 IL-2R $\alpha$  (CD25)抗体 (PC61) および抗 IL-2モノクローナル抗体 (S4B6) 投与により、実際に CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>T cell が減少するかを調べるため、Flow cytometryにて CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>T cellを検出した。flow cytometryを用いて、コントロールマウスと PC61 投与マウス及び S4B6 投与マウスにおける脾臓中の CD4 と CD25 の割合を検討したところ、CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>T cellの割合はコントロールマウスでは 3.68%、PC61 投与マウスでは 0.24%、S4B6 投与マウスでは 0.02%であった (図7)。PC61 投与及び S4B6 投与により末梢の CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>T cell 数は減少したことが証明された。



CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>T-cell population was reduced by in vivo PC61 administration.



CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>T-cell population was reduced by in vivo S4B6 administration.

図7 フローサイトメトリーによる CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>T cell の検出率の比較

(4) Candesartan (CV-11974) による腫瘍抑制効果

Candesartan 投与の実験ではコントロール群の腫瘍の重量は 1.97g (1.36-2.92g) であったのに対し、Candesartan 1mg/kg/day 投与では 1.39g (0.76-2.53g) で Candesartan 投与群の方が腫瘍は縮小しており、肺転移結節数の減少傾向が見られた。次に、CV-11974 (Candesartan) と S4B6 あるいは PC61 を併用投与することによって、より強力な抗腫瘍効果が発揮されないかについて検討を行ったが、Candesartan 1mg/kg/day 投与を併用した群と併用しなかった群において有意差は得られず、マウス骨肉腫 (LM8) の増殖や転移への抑制は S4B6 あるいは PC61 による影響が大きいものと考えられた。

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) Kohyama K, Sugiura H, Kozawa E, Wasa J, Yamada K, Nishioka A, Kamei Y, Taguchi O: Antitumor activity of an interleukin-2 monoclonal antibody in a murine osteosarcoma transplantation model. Anticancer Res, 32(3), 2012, 779-82.

<http://ar.iarjournals.org/content/32/3/779.full.pdf+html>.

2) Wasa J, Sugiura H, Kozawa E, Kohyama K, Yamada K, Taguchi O : The tumor suppressive effect of angiotensin II type 1 receptor antagonist in a murine osteosarcoma model. Anticancer Res.、31(1),2011,123-7.

<http://ar.iarjournals.org/content/31/1/123.full.pdf+html>.

3)Kozawa E, Sugiura H, Wasa J, Kohyama K, Yamada K, Nishioka A, Nishida Y, Ishiguro N, Taguchi O : Suppression of Tumour Metastasis in a Murine Osteosarcoma Model with Anti-CD25 Monoclonal Antibody Treatment. Anticancer Res 30, 2010, 5019-5022.

<http://ar.iarjournals.org/content/30/12/5019.full.pdf+html>.

〔学会発表〕（計2件）

1) Sugiura H, Kozawa E, Kohyama K, Yamada K, Nishida Y, Taguchi O : Tumor Suppression with Anti-Interleukin-2 and Anti-CD25 Monoclonal Antibodies in a Murine Osteosarcoma Model . 9<sup>TH</sup> Asia Pacific Musculoskeletal Tumour Society Meeting、2012年9月6～10日、ヒルトン・クアララルンプール（クアララルンプール・マレーシア）

2) Kohyama K, Sugiura H, Taguchi O, Kozawa E, Wasa J, Yamada K, Nishida T, Kamei Y : Tumor-suppressive Effect of Anti-interleukin-2 Monoclonal Antibody in a Murine Osteosarcoma Model. I ISOLS 2011 16<sup>TH</sup> General Meeting、2011年9月15～18日、北京（中国）

〔図書〕（計0件）

〔産業財産権〕

○出願状況（計0件）

名称：  
発明者：  
権利者：  
種類：  
番号：  
出願年月日：  
国内外の別：

○取得状況（計0件）

名称：  
発明者：  
権利者：  
種類：  
番号：  
取得年月日：  
国内外の別：

〔その他〕  
ホームページ等

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

杉浦 英志 (SUGIURA HIDESHI)  
愛知県がんセンター（研究所）・腫瘍免疫  
学部・研究員  
研究者番号：50303615

### (2) 研究分担者

京ヶ島 守 (KYOGASHIMA MAMORU)  
日本薬科大学・薬学部・教授  
研究者番号：50225091

### (3) 連携研究者

( )

研究者番号：