

平成 30 年 6 月 15 日現在

機関番号：34519

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2014～2017

課題番号：26462279

研究課題名(和文) 骨肉腫の肺転移抑制におけるmTOR阻害剤とバルプロン酸併用による有効性向上の研究

研究課題名(英文) Sodium valproate and Rapamycin synergistically enhance the vascular endothelial growth inhibitor-mediated cell death in human osteosarcoma and vascular endothelial cells.

研究代表者

鉢谷 博之 (Futani, Hiroyuki)

兵庫医科大学・医学部・教授

研究者番号：30248140

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,700,000円

研究成果の概要(和文)：ラパマイシン標的蛋白質阻害剤(mTOR)単独、およびヒストン脱アセチル化阻害剤(VPA)の併用効果を内因性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ついて検討した。mTORおよびVPAの併用は、ヒト骨肉腫においてVEGI/DR3を介した直接的な腫瘍増殖抑制効果と、発現が増強された腫瘍産生VEGIがヒト血管内皮細胞に対する間接的腫瘍新生血管抑制効果を有していた。更に、血管新生関連遺伝子によるマイクロアレー解析で、mTOR阻害剤とVPAの併用は、幾つかの血管新生分子の発現抑制効果を確認した。

研究成果の概要(英文)：We investigated the effects of anti-angiogenesis by Rapamycin (mTOR) in combination with valproic acid (VPA) on human osteosarcoma cells (OS). mTOR increased vascular endothelial growth inhibitor (VEGI) and a little effect of death receptor 3 (DR3) expression. However, in combination with VPA induced further increasing effect of both VEGI and DR3 without induction of decoy receptor 3 (Dcr3) on OS and human microvascular endothelial cells (HMVE). Furthermore, combination of mTOR and VPA -induced soluble VEGI in the OS culture medium markedly inhibited the vascular tube formation of HMVE. These results suggest that mTOR and HDAC inhibitor has anti-angiogenesis and anti-tumor activities that mediate soluble VEGI/DR3-induced apoptosis via both autocrine and paracrine pathways. Finally, mTOR and VPA are considered to be one of the promising strategies in the development of novel anti-neovascularization therapy on osteosarcomas.

研究分野：整形外科

キーワード：骨肉腫 腫瘍新生血管抑制 ラパマイシン標的蛋白質阻害剤 ヒストン脱アセチル化阻害剤 免疫療法

1. 研究開始当初の背景

骨肉腫は若者に発生する高悪性骨腫瘍である。昨今の抗癌剤の発展により5年生存率は70%程度に飛躍的に向上した。しかし、その後治療法に画期的な進歩はなく、30%程度の患者は肺転移によって悲惨な経過をたどる。

これらの患者の予後を改善するには、肺転移を抑制するための新たな治療戦略が必須である。骨肉腫の転移機序における血管新生は vascular endothelial growth factor (VEGF)によって血管新生が誘導されている。現在、VEGF 対する中和抗体や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おり、腫瘍血管新生抑制をターゲットにした新たな治療法の確立が急務である。

2. 研究の目的

骨肉腫の肺転移に抗癌剤のみの治療では限界がある。我々はヒストン蛋白アセチル化阻害剤(バルプロン酸)が免疫細胞の効果を高め、肺転移を抑制することを明らかにした。

この免疫療法の精度を高めるため、肺転移の機序に必須である新生血管を抑制することが重要である。バルプロン酸は、低酸素状態での腫瘍の HIF-1 の増加を抑制し VEGF 産生を抑制する事が報告されている。さらに近年、哺乳類ラパマイシン標的蛋白質 (mTOR) の阻害剤も新生血管を抑制すると報告されているが、骨肉腫への効果は確立しておらず、免疫を抑制することや長期投与での薬剤耐性の獲得の問題もある。

我々はバルプロン酸との併用でこれらの問題を解決できると考えている。

本研究では、vascular endothelial growth inhibitor (VEGI)とそのレセプターである death receptor 3 (DR3)を中心に、腫瘍内新生血管形成を抑制することにより腫瘍増殖抑制効果および転移抑制効果を検討する。

(図1)

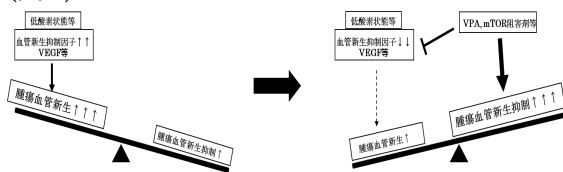


図1

3. 研究の方法

1) ヒト骨肉腫細胞株(OS)を用いて Rapamycin(mTOR)および VPA 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) 上記より mTOR および VPA 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的効果を in vitro で検討する。

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 mTOR および VPA 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。

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。

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。(mTOR および VPA 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 mTOR および VPA 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。解析方法は(1)(2)に準ずる。(増殖抑制効果は MMT 法にて評価する)

(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。

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 Tube formation(管腔形成)にて評価する。

(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。

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。

mTOR および 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。

(7) mTOR および VPA の効果による血管新生因子、内因性血管抑制因子およびそれらの受容体の発現の変化を、リアルタイム PCR アレーにて検索する。

4. 研究成果

(1) mTOR および VPA 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。

VEGI と DR3 は OS 細胞に発現を認めた。

mTOR および VPA 作用は濃度依存的に、VEGI (2.5 倍) および DR3 (2.0 倍) の発現の増加を認めた。

mTOR と VPA の併用は、単独作用と比較し更なる発現の増加(VEGI : 4.0 倍, DR3 : 3.0

倍)を認めた。

(2) OS に対する mTOR および VPA 作用による遊離型 VEG1 (sVEGI) および DcR3 の形成に及ぼす影響の検討。

VPA 作用群では OS 細胞株の培養液中の sVEGI を約 2 倍程度増加させたが、mTOR 作用群では影響を及ぼさなかった。

mTOR と VPA の併用は、OS 細胞株の培養液中の sVEGI を約 4 倍程度増加させた。

mTOR および VPA 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) VEG1 発現ベクター導入 VEG1 強発現ヒト骨肉腫細胞株と mTOR および VPA 作用群との比較検討。

mTOR および VPA 作用後 7 日目において、約 20% 程度細胞死を誘導した。

mTOR と VPA の併用は 50% 程度細胞死を誘導した。

ベクター導入 (VEG1 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 mTOR および 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。

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 の誘導であった。

以上 (1) ~ (3) は OS 細胞株に対する VEG1 の直接的増殖抑制効果で、VEG1 強発現ヒト骨肉腫細胞株に mTOR および VPA 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 VEG1 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 mTOR および VPA 作用による細胞増殖能に関する検討。

mTOR および VPA 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 mTOR および VPA 作用による VEG1 および DR3 の発現に関する検討。

mTOR と VPA は HMVE の VEG1 発現を約 2 倍増加、DR3 発現を約 1.5 倍程度増加させた。

mTOR と VPA の併用は VEG1 発現を約 3.0 倍増加、DR3 発現を約 4.0 倍程度増加させた。

(6) HMVE に対する mTOR および VPA 作用による遊離型 VEG1 (sVEGI) および DcR3 の形成に及ぼす影響の検討。

VPA 作用群では OS 細胞株の培養液中の sVEGI を約 1.5 倍程度増加させたが、mTOR 作用群では影響を及ぼさなかった。

mTOR と VPA の併用は、OS 細胞株の培養液中の sVEGI を約 3 倍程度増加させた。

mTOR および VPA 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。

(7) OS (由来) 産生 VEG1 がヒト血管内皮細胞の増殖に及ぼす影響に関する検討。

mTOR 100nM および VPA 1.0mM 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。

mTOR 100nM および VPA 1.0mM 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) VEG1 / DR3 を介する管腔形成抑制作用以外に VEG1 が有する新生血管抑制機構の検索。免疫沈降の結果より VEG1 (VEG1 発現ベクターより抽出) は VEGF-A と複合体を形成していた。

VEG1 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、VEGF-A 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。

(9) mTOR および VPA の効果による血管新生因子、内因性血管抑制因子およびそれらの受容体の発現の変化を、リアルタイム PCR アレーにて検索する。mTOR および VPA 作用により、2 倍以上の発現の変化を示した因子を確認し、現在、詳細を検討・解析中である。

以上より、mTOR および VPA 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。Rapamycin は mTOR 阻害能を持っており、mTOR 阻害剤としてテムシロリムとエベロリムスは腎細胞癌の進行例に対する治療薬として臨床応用されている。また VPA は既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

〔雑誌論文〕(計 13 件)

1. Tsuchida Y, Tsukamoto Y, Futani H, Kumanishi S, Watanabe T, Kajimoto N, Matsuo S, Yoshiya S, and Hirota S, A rare case of low-grade fibromyxoid sarcoma with ossification which was radiologically detected as apparent calcification and histopathologically proven. Human Pathology: Case Reports, 査読有, 12, 2018, 24-28

2. Yamanegi K, Yamada N, Nakasho K, and Nishiura H, Erythroblast differentiation at spleen in Q137E mutant ribosomal protein S19 gene knock-in C57BL/6J mice. *Immunobiology*, 査読有, 223, 2018, 118-124,

DOI: 10.1016/j.imbio.2017.10.003

3. Yamanegi K, Yamada N, Nakasho K, and Nishiura H, Participation of delta annexin A3 in the ribosomal protein S19 C-terminus-dependent inhibitory mechanism of the neutrophil C5a receptor through delta lactoferrin, *Pathol int*, 査読有, 68, 2018, 109-116

DOI: 10.1111/pin.12626

4. Tsukamoto Y, Futani H, Yoshiya S, Watanabe T, Kihara T, Matsuo S, and Hirota S, Primary undifferentiated small round cell sarcoma of the deep abdominal wall with a novel variant of t(10;19) CIC-DUX4 gene fusion. *Pathol Res Pract*, 査読有, 2017, 213,1315-1321

DOI: 10.1016/j.prp.2017.06.008

5. Uwa N, Terada T, Mohri T, Tsukamoto Y, Futani H, Demizu Y, Okimoto T, and Sakagami M, An unexpected skin ulcer and soft tissue necrosis after the nonconcurrent combination of proton beam therapy and pazopanib: A case of myxofibrosarcoma. *Auris Nasus Larynx*, 査読有, 44, 2017, 484-488

DOI: 10.1016/j.anl.2016.07.016

6. Yamanegi K, Kawakami T, Yamada N, Kumanishi S, Futani H, Nakasho K, and Nishiura H, The roles of a ribosomal protein S19 polymer in a mouse model of carrageenan-induced acute pleurisy. *Immunobiology*, 査読有, 222, 2017, 738-750

DOI: 10.1016/j.imbio.2017.02.001

7. Tsukamoto Y, Futani H, Kumanishi S, Watanabe T, Kihara T, and Hirota S, A rare case of Ewing sarcoma with elevated plasma pro-gastrin-releasing peptide (proGRP) level, *Human Pathol*, 査読有, 6, 2016, 13-18

DOI: 10.1016/j.ehpc.2015.12.001

8. Okada T, Futani H, Kanto R, Kumanishi S, Tsukamoto Y, and Yoshiya S, Chondromyxoid fibroma of the femur can not be differentiated from chondrosarcoma by 18F-FDG PET/CT, and histopathology is still the final diagnostic tool, *J Clin Case Rep*, 査読有, 5, 2015, 661

DOI: 10.4172/2165-7920.1000661

10. Nishiura H, Yamanegi K, Kawabe M, Kato-Kogoe N, Yamada N, and Nakasho K, The roles of ribosomal protein S19C-terminus in a shortened neutrophil lifespan through delta lactoferrin. *Immunobiology*, 査読有, 220, 2015, 1085-1092

DOI: 10.1016/j.imbio.2015.05.006

11. Konishi E, Nakashima Y, Mano M, Tomita Y, Nagasaki I, Kubo T, Araki N, Haga H, Toguchida J, Ueda T, Sakuma T, Imahori M, Morii E, Yoshikawa H, Tsukamoto Y, Futani H, Wakasa K, Hoshi M, Hamada S, Takeshita H, Inoue T, Aono M, Kawabata K, Murata H, Katsura K, Urata Y, Ueda H, and Yanagisawa A, Primary central chondrosarcoma of long bone, limb girdle and trunk: Analysis of 174 cases by numerical scoring on histology, *Pathol Int*, 2015, 65, 468-475

DOI: 10.1111/pin.12324

12. Yamanegi K, Kawabe M, Futani H, Nishiura H, Yamada N, Kato-Kogoe N, Kishimoto H, Yoshiya S, and Nakasho K. Sodium valproate, a histone deacetylase inhibitor, modulates the vascular endothelial growth inhibitor mediated cell death in human osteosarcoma and vascular endothelial cells. 査読有, *Int J Oncol*, 2015, 46, 1994-2002

DOI: 10.3892/ijo.2015.2924

13. Morimoto S, Futani H, Tsuchiyama K, Fukunaga S, Tsukamoto Y, and Yoshiya S, Usefulness of PET/CT for diagnosis of periosteal chondrosarcoma of the femur: A case report. 査読有, *Oncol Lett*, 2014, 7, 1826-1828

DOI: 10.3892/ol.2014.2010

[学会発表](計 3件)

1. Kumanishi S, Yamanegi K, Futani H, Nakasho K, and Yoshiya S, Sodium valproate, a histone deacetylase inhibitor, induces the expression of cell-surface NKG2D ligand, MICA and B, without increasing their soluble forms to enhance susceptibility of human osteosarcoma cells to NK cell-mediated cytotoxicity, The Orthopaedic Research Society, Annual Meeting, San Diego, USA, 2017

2. Futani H, Yamanegi K, Kumanishi S, Nakasho K, and Yoshiya S, 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, The 9th International

Combined Orthopaedic Research Societies,  
China, 2016

3. 麩谷 博之, 山根木 康嗣, 中正 恵二, 吉  
矢 晋一, 骨肉腫の免疫療法におけるバルブ  
ロン酸併用の効果, 第 29 回日本整形外科学  
会基礎学術集会, 鹿児島, 2014

〔図書〕(計 1 件)

1. Futani H and Yoshiya S: Limb-Salvage  
Surgery and Reconstruction for Skeletally  
Immature Childhood Osteosarcoma:  
Extendible Endoprosthesis, In  
“Osteosarcoma: A Multidisciplinary  
Approach to Treatment” (Ed. Ueda T. and  
Kawai A.) Springer, 2016, 125~133

#### 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・教授  
研究者番号: 30248140

##### (2) 研究分担者

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

##### (3) 連携研究者

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

##### (4) 研究協力者

熊西 俊介 (KUMANISHI, Shunsuke)