

---

---

原 著

---

---

## バルプロ酸による骨肉腫細胞に対する 化学療法薬の抗腫瘍効果の増強

根 本 妙

新潟大学大学院医歯学総合研究科生体機能調節医学

内部環境医学講座小児科学分野

(主任：内山 聖教授)

### Valproic Acid Enhances Anti-tumor Activity Exerted by Anti-cancer Agents in Osteosarcoma Cells

Tae NEMOTO

*Department of Pediatrics*

*Niigata University Graduate School of Medical and Dental Sciences*

*(Director: Prof. Makoto UCHIYAMA)*

#### 要 旨

骨肉腫は、小児や若年成人の原発性骨腫瘍において最も頻度の高い悪性腫瘍である。その治療成績は1980年以降の多剤併用化学療法、集学的治療の発達により著しく向上したが、現在に至り生存率の向上は頭打ちとなっている。さらに、転移性骨肉腫、特に初発時に多発肺転移を有するハイリスク症例の治療成績は未だに不良であり、新たな治療の開発が急務である。

バルプロ酸は数十年前から実臨床で広く用いられており、安全性の認められている薬剤であるが、本剤がヒストン脱アセチル化酵素 (HDAC) 阻害活性を持つことが近年に報告された。さらに、HDAC 阻害薬が乳がん、卵巣癌、脳腫瘍などの種々のがん細胞に対して抗腫瘍効果を発揮することが示されており、欧米では一部の腫瘍に対して臨床試験も開始されている。

本研究では、骨肉腫細胞に対してバルプロ酸単独の抗腫瘍効果と既存の抗がん剤との併用効果について検討した。3種類の骨肉腫細胞株に対して、バルプロ酸は濃度依存性に抗腫瘍効果を示し、ヒストンのアセチル化、細胞周期調節に関わる遺伝子の発現変化が認められた。さらに、骨肉腫の主要な治療薬であるアドリアマイシンとシスプラチンの抗腫瘍効果が、臨床的に安全で容易に達成可能な濃度のバルプロ酸によって相乗的に増強されることが示された。

以上の結果より、バルプロ酸と既存の薬剤との併用がハイリスク骨肉腫患者の新規の治療戦略となりうる可能性が示された。

キーワード：バルプロ酸、ヒストン脱アセチル化酵素阻害剤、骨肉腫、アドリアマイシン、シスプラチン

---

Reprint requests to: Tae NEMOTO  
Department of Pediatrics  
Niigata University Graduate School of Medical  
and Dental Sciences  
1-757 Asahimachi-dori Chuo-ku,  
Niigata 951-8510 Japan

別刷請求先：〒951-8510 新潟市中央区旭町通1-757  
新潟大学医歯学総合研究科小児科学分野

根 本 妙

## 緒言

骨肉腫は、原発性骨腫瘍の最も多くを占める、10歳代に好発する腫瘍である。患肢切断のみの治療による生存率は20%以下であったが<sup>1)</sup>、1980年以降の多剤併用化学療法、集学的治療の発達により限局性骨肉腫の生存率は60～70%へ著しく向上した<sup>2)</sup>。しかし、その後の生存率の向上は頭打ちとなっている。また、転移性骨肉腫、特に初発時多発肺転移を有する症例の治療成績は未だに不良であり、新たな治療の開発が必要である。

バルプロ酸 (valproic acid: 2-propylpentanoic acid) は、1967年にフランスで抗てんかん薬として承認されて以来、世界中で広く用いられている薬剤である。今日では双極性障害、片頭痛、統合失調症の治療薬としても承認されており<sup>3)</sup>、小児科領域でも抗てんかん薬として広く用いられている安全性の認められた薬剤である。1980年代に、バルプロ酸の悪性腫瘍細胞に対する増殖抑制効果を示す初めての研究結果が報告され<sup>4)5)</sup>、1990年代に、*in vitro/in vivo*における神経芽腫、神経膠腫に対する抗腫瘍効果が報告された<sup>6)7)</sup>。これらを基盤とし、小児神経膠腫に対するバルプロ酸の抗腫瘍効果についての初めての臨床試験が開始されたが<sup>8)9)</sup>、その抗腫瘍効果の詳細な機序については明らかにされていなかった。

1970年代にすでに、ブチル酸などの短鎖脂肪酸がヒストン脱アセチル化酵素 (HDAC) 阻害活性を示すことが報告されていた<sup>10)</sup>。その後、短鎖脂肪酸だけでなく、Suberoylanilide hydroxamic acid (SAHA) などのヒドロキサム酸等も同様の活性をもつことが報告された。2001年に、バルプロ酸もそれらと同様にHDAC阻害活性を示すこと、さらにこの活性が抗腫瘍効果における重要な役割を担っていることが発見された<sup>11)–14)</sup>。

バルプロ酸の抗腫瘍効果の機序は単一ではなく多岐に渡る複雑な機序が示されているものの、HDAC阻害活性がその抗腫瘍効果の機序の中心的役割を担っていることは広く認められている。バルプロ酸はすでに、白血病、脳腫瘍などの様々な腫瘍細胞に対して *in vitro/in vivo* における有効

性が示され、欧米では臨床試験も行われている<sup>15)16)</sup>。

種々のHDAC阻害薬と比較して、バルプロ酸の最大の特徴は、すでに確立した臨床上的有用性 (bioavailability など) と安全性である。そこで本研究ではこの点に着目し、バルプロ酸の骨肉腫に対する抗腫瘍効果について検討した。はじめに、3種類の骨肉腫細胞株を用いてバルプロ酸単剤による抗腫瘍効果を評価し、その機序について検討した。さらに、骨肉腫の治療における主要な化学療法薬であるアドリアマイシンとシスプラチンについて、バルプロ酸との併用効果について検討した。

## 材料と方法

### 1. 細胞培養

骨肉腫の細胞株である Saos2 細胞、U2OS 細胞、NOS-1 細胞 (新潟大学整形外科 生越章先生より分与) を、10%非働化牛胎仔血清 (Equitec - bio, Ingram, TX, USA)、penicillin (100U/ml)、streptomycin (100  $\mu$ g/ml) を添加した RPMI1640 培養液 (SIGMA, St. Louis, MO, USA) 中にて細胞培養用フラスコ内で 37  $^{\circ}$ C、5% CO<sub>2</sub> 存在下で培養した。

### 2. トリパンブルー色素排除試験による増殖抑制の評価

96 ウェルプレート上で、各濃度 (0～500  $\mu$ g/ml) のバルプロ酸存在下で1ウェルあたり1  $\times$  10<sup>4</sup>個の Saos2 細胞、U2OS 細胞、NOS-1 細胞の培養を開始し、1, 2, 3, 4, 5, 6日目にトリプシン処理によりそれぞれの細胞を再浮遊させ全量を回収し、得られた細胞浮遊液から各サンプル10  $\mu$ l ずつを採取し、0.4%トリパンブルー液 (SIGMA) で染色し、Burker-Turk 計算板を用いて光学顕微鏡下で生細胞数を計測し、各時点でのウェル内の生細胞数を算定した。

### 3. ウェスタンブロット法によるアセチル化ヒストン (acetylated-H3) の検出

各濃度 (0～1,000  $\mu$ g/ml) のバルプロ酸存在下で24時間培養した1ウェルあたり2  $\times$  10<sup>6</sup>個

のSaos2細胞と、200  $\mu$ g/mlのバルプロ酸存在下で0, 4, 12, 24時間培養した1ウェルあたり $2 \times 10^6$ 個のSaos2細胞を、それぞれトリプシン処理により全て剥離し試験管内に回収後、遠心分離し上清を除去した。さらに、氷冷したPBSで2回洗浄し、0.5% Triton X-100, 300mM NaCl, 50mM Tris-HCl (pH7.5), aprotinin, leupeptin, phenylmethanesulfonyl fluoride (PMSF)を混和した溶液各200  $\mu$ lに再浮遊させ、4°Cで30分間インキュベートした後、4°C下で14,000回転/分で15分間遠心分離し上清を回収し、95°Cで5分間煮沸し冷却後、試料とした。各試料のタンパク質濃度をBradford protein assay 試薬 (Bio-Rad, Hercules, CA, USA) を用いて測定した。0.5M Tris-HCl (pH6.8) 1ml, 10%ドデシル硫酸ナトリウム (SDS) 2ml,  $\beta$ メルカプトエタノール 0.6ml, グリセロール 1ml, 蒸留水 0.4ml, 1% bromophenol blue (BPB)を含むサンプル溶液を作成し、等量(1レーンあたり20  $\mu$ g) ずつのタンパク質を含む試料を同量のサンプル溶液で2倍希釈し、15%ポリアクリルアミドゲルを使用しSDS-ポリアクリルアミド電気泳動を行い、さらに、poly vinylidene difluoride 膜へ転写した。その後、5%無脂肪乳を含む緩衝液中でブロッキングを行い、抗アセチル化ヒストン(H3)抗体(1:1000, Upstate Biotechnology, Lake Placid, NY, USA)と、対照の抗- $\beta$  actin 抗体(1:2000, SIGMA)と反応させ、間接酵素抗体法でアルカリホスファターゼ発色により検出した。

#### 4. RT-PCR

各濃度(0~500  $\mu$ g/ml)のバルプロ酸存在下で、cyclin Aについては72時間、cyclin-dependent kinase inhibitor p21<sup>WAF1/Cip1</sup>については96時間培養した、1ウェルあたり $1 \times 10^5$ 個のSaos2細胞をトリプシン処理により再浮遊させ回収し、TRIzol 試薬 (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA) を用いてTotal RNAを抽出し、complementary DNA (cDNA)を作製し、Thermal Cycler (TAKARA, Shiga, Japan)を用いてcyclin A, p21<sup>WAF1/Cip1</sup>, 対照のGlyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase (GAPDH)の3種類についてRT-PCRを行った。

プライマーは、p21<sup>WAF1/Cip1</sup>: Forward primer: 5' - GGAAGACCATGTGGACCTGT - 3', Reverse primer: 5' - CCAAGAGGAAGCCCTAATCC - 3' cyclin A: Forward primer: 5' - ACCCCTTAAGGATCTTCCTG - 3', Reverse primer: 5' - TCCAGGGTATATCCAGTCTTTTCG - 3'を使用した。PCR産物のうち1レーンあたり10  $\mu$ lを2%アガロースゲルで電気泳動し、エチジウムブロマイド染色を行い、増幅産物を検出した。

#### 5. MTS アッセイによる、バルプロ酸と化学療法薬との併用効果の検討

CellTiter 96 AQUEOUS One Solution Cell Proliferation Assay キット (Promega, Madison, WI, USA)を用いた。実験は基本的にアッセイキット製造者のプロトコールに従って行った。96ウェルプレート上の各ウェルで、1ウェルあたり $1 \times 10^4$ 個の骨肉腫細胞を計6日間培養した。その間、後述の各々の時点で、底面に貼りついた細胞は剥離せずに培養液のみをすべて吸引除去し、1ウェルあたり100  $\mu$ lのPBSで2回すすぎ、バルプロ酸のみを含む培養液、化学療法薬のみを含む培養液、バルプロ酸と化学療法薬の両者を含む培養液、いずれの薬剤も含まない培養液へそれぞれのウェルの計画に従って交換し培養した。培養終了時点でウェル内の全ての液体を吸引除去後、1ウェルあたり100  $\mu$ lのPBSで1回すすぎ、培養液を1ウェルあたり100  $\mu$ l加え、さらにCell Titer96 AQUEOUS One Solution Reagentを1ウェルあたり20  $\mu$ lずつ加え十分混和し、プレートを37°C, 5% CO<sub>2</sub>存在下で4時間インキュベートした後、マイクロプレートリーダー (Model 550; Bio-Rad)を用いて490nmの吸光度を測定し、各ウェル内の残存細胞数を算定した。

#### 6. 統計学的検討と相乗効果有無の判定

トリパンブルー色素排除試験およびMTSアッセイは、それぞれtriplicateで行い、平均値と標準偏差を算出した。群間の差はt検定により比較し、 $p < 0.05$ をもって有意とした。

バルプロ酸と既存の化学療法薬との相乗効果有

無の判定は、Fractional Product Method of Webb<sup>17)</sup>を適用した。バルプロ酸単独使用後の生細胞残存率を $\gamma_{VPA}$ 、既存の化学療法薬(X：アドリアマイシンあるいはシスプラチン)単独使用後の生細胞残存率を $\gamma_X$ 、2剤併用後の生細胞残存率を $\gamma_{VPA+X}$ とし、 $\gamma_{VPA} \gamma_X > \gamma_{VPA+X}$ ならば相乗効果、 $\gamma_{VPA} \gamma_X = \gamma_{VPA+X}$ ならば相加効果、 $\gamma_{VPA} \gamma_X < \gamma_{VPA+X}$ ならば拮抗効果と判定した。

## 結 果

### 1. バルプロ酸単剤による骨肉腫細胞の増殖抑制

バルプロ酸は、検討した3種類の骨肉腫細胞株すべてに対して濃度依存性に細胞増殖抑制作用をもたらした(図1-A, B)。バルプロ酸に対する感受性は細胞株により異なっており、NOS-1細胞で最も増殖抑制効果が高く、臨床的にてんかんの治療薬として用いられる場合の血中濃度の範囲内である $100 \mu\text{g/ml}$ の存在下での6日間の培養でほぼ完全に増殖が阻害された。バルプロ酸非存在下での6日間の培養後の細胞数を対照とすると、6日間の $100 \mu\text{g/ml}$ 存在下での培養でSaos2細胞では $46.7 \pm 2.9\%$ 、U2OS細胞では $32.0 \pm 1.8\%$ 、 $200 \mu\text{g/ml}$ でそれぞれ $72.8 \pm 4.6\%$ 、 $47.1 \pm 4.4\%$ の細胞数の減少を認めた。以上より、バルプロ酸の骨肉腫細胞に対する単剤での抗腫瘍効果が示された。

### 2. 骨肉腫細胞のヒストンアセチル化亢進と細胞周期調節遺伝子発現の変化

バルプロ酸の骨肉腫細胞に対する抗腫瘍効果の機序について検討した。造血器腫瘍をはじめとする種々の腫瘍において、バルプロ酸はHDAC阻害によりアポトーシスを誘導することが示されている。骨肉腫細胞においても、同様の機序が存在するかをウェスタンブロット法で検討した。Saos2細胞をバルプロ酸存在下で24時間培養したところ、バルプロ酸濃度依存性にヒストンH3のアセチル化の亢進が認められた(図2-A)。バルプロ酸 $200 \mu\text{g/ml}$ 存在下で、培養開始から4時間後までにヒストンアセチル化の亢進が始まり、

12時間後にさらに増強したが、24時間後ではそれ以上の増強は認めなかった(図2-B)。この結果より、骨肉腫細胞においても他の腫瘍細胞と同様に、バルプロ酸によるヒストンアセチル化の亢進が誘導されることが明らかとなった。さらに、バルプロ酸濃度依存性にcyclin Aの発現低下および $p21^{WAF1/Cip1}$ の発現上昇が認められた(図3)。他のがん種と同様に骨肉腫細胞においても、バルプロ酸により、細胞周期を停止させる方向での $p21^{WAF1/Cip1}$ 、cyclin Aの発現変化が誘導されることが示された。

### 3. バルプロ酸と化学療法薬の併用効果

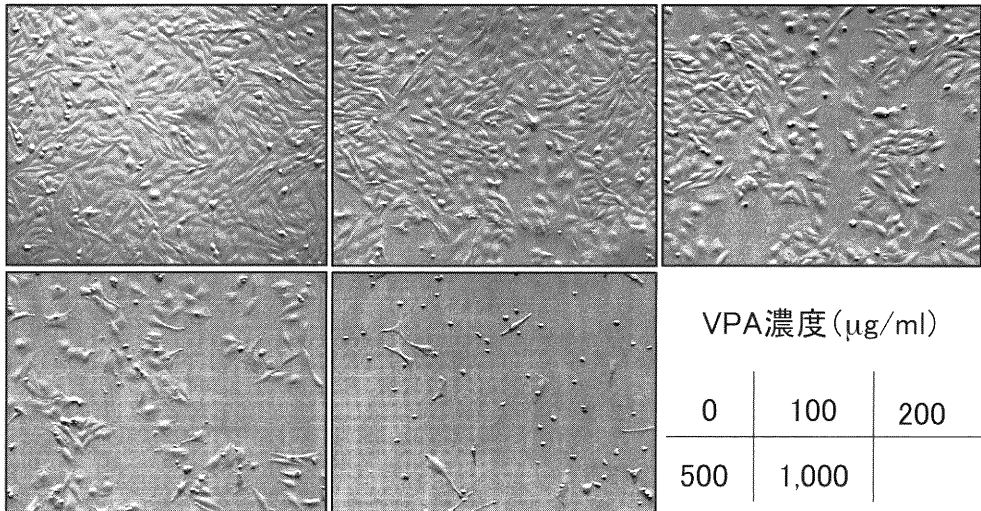
#### (1) バルプロ酸と既存の化学療法薬の使用順序による併用効果の変化

まず、バルプロ酸と既存の化学療法薬の併用にあたり、抗腫瘍効果の増強のために最も効果的な使用順序について検討を行った。後述の4通り(サンプルa, b, c, d)の順序で薬剤を培養液に加えながら、96ウェルプレート上で1ウェルあたり $1 \times 10^4$ 個のSaos2細胞を計144時間(6日間)培養した(図4-A)。いずれの細胞も培養開始48時間後から96時間後までの48時間は臨床的に達成可能なアドリアマイシン $250\text{nM}$ <sup>18)</sup>存在下で培養した。サンプルaではバルプロ酸は使用しなかった(対照)。サンプルbではアドリアマイシン使用終了後から48時間バルプロ酸 $100 \mu\text{g/ml}$ 存在下での培養を行った(以下「後投与」)。サンプルcでは、アドリアマイシンと同時に48時間バルプロ酸を培養液に加えた(以下「同時投与」)。サンプルdでは、アドリアマイシン使用前に48時間バルプロ酸存在下で培養した(以下「前投与」)。144時間の培養終了後の生細胞残存率は、対照と比較して後投与、同時投与、前投与の順に低くなり、同時投与と前投与においては対照との間に有意差を認めた。また、前投与は後投与と比較して有意に残存腫瘍細胞が少なかった。

#### (2) アドリアマイシンとの併用による抗腫瘍効果の増強

上記の結果(図4-A)より、バルプロ酸をアドリアマイシン使用前及び同時に使用することが

A



B

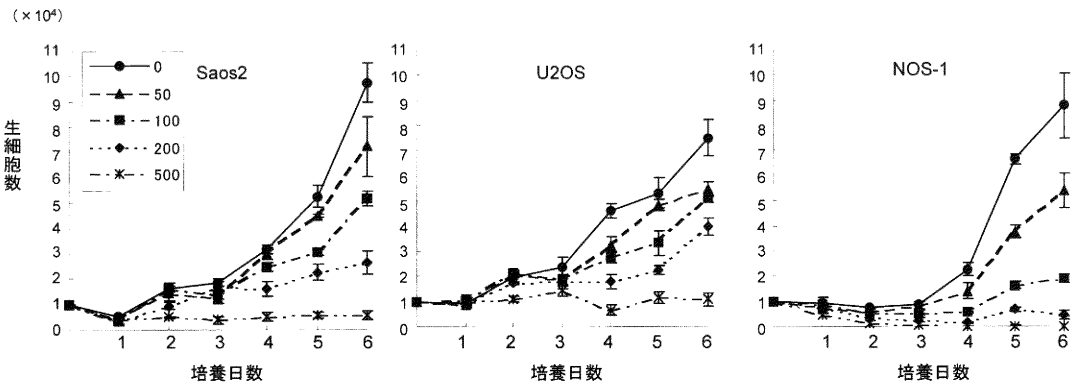


図1 バルプロ酸による骨肉腫細胞の増殖に与える影響

A. バルプロ酸作用後の骨肉腫細胞の形態学的変化 (×40)

骨肉腫細胞 (Saos2 細胞) を、それぞれ図示した濃度のバルプロ酸の存在下で培養し4日目に倒立型光学顕微鏡 IX70-S8F2 (Olympus, Tokyo, Japan) で観察した。Saos2 細胞はバルプロ酸濃度依存性に減少した。

B. 骨肉腫細胞の増殖抑制

3種類の骨肉腫細胞を、それぞれ図示した各濃度のバルプロ酸 (VPA) の存在下で培養を開始した。生細胞数はトリパンプルー色素排除試験によって算定した。いずれの細胞においても、バルプロ酸による濃度依存性の増殖抑制効果を認めた。

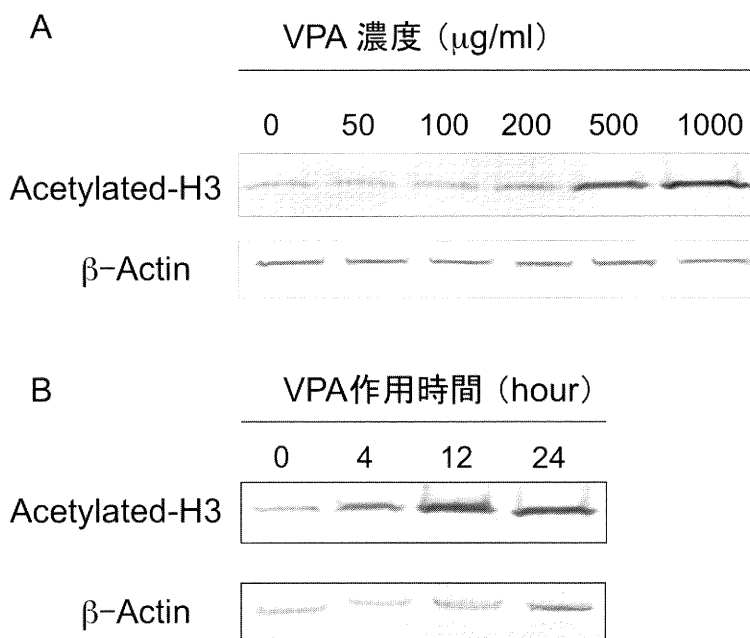


図2 バルプロ酸による骨肉腫細胞のヒストンアセチル化

A. バルプロ酸濃度による変化

Saos2 細胞をバルプロ酸の存在下で 24 時間培養し、ウェスタンブロット法を用いてアセチル化ヒストン H3 を検出した。バルプロ酸濃度依存性にヒストンアセチル化の亢進を認めた。

B. 培養時間による変化

Saos2 細胞を 200 µg/ml のバルプロ酸存在下で培養した。培養 12 時間まで時間依存性にヒストンのアセチル化の亢進を認めた。

抗腫瘍効果の増強の点で有用であると考えた。Saos2 細胞にバルプロ酸単剤 (100 µg/ml) を 48 時間先行して作用させ、その後 96 時間各濃度のアドリアマイシンとバルプロ酸 (100 µg/ml) 両者の存在下で培養するスケジュールを併用効果を検討した (前投与 48 時間, かつ同時投与 96 時間)。対照として、バルプロ酸なしでアドリアマイシンのみ同じ条件で作用させた Saos2 細胞を用いた。計 144 時間の培養終了時に残存細胞数を MTS assay で算定し、薬剤使用なしで 144 時間培養した場合の生細胞数で除した値を生細胞残存率

とした。その結果、検討した全ての濃度 (15.6 ~ 2000nM) において 100 µg/ml のバルプロ酸がアドリアマイシンの抗腫瘍効果を相乗的に増強した (図 4-B)。

(3) シスプラチンとの併用による抗腫瘍効果の増強

次に、骨肉腫治療において、もう一つの主要な治療薬であるシスプラチンについて、バルプロ酸との併用効果を検討した。Saos2 細胞を用い、上記 (2) と同様の方法で検討したところ、0.63 ~ 2.5 µg/ml のシスプラチンとの併用において 100

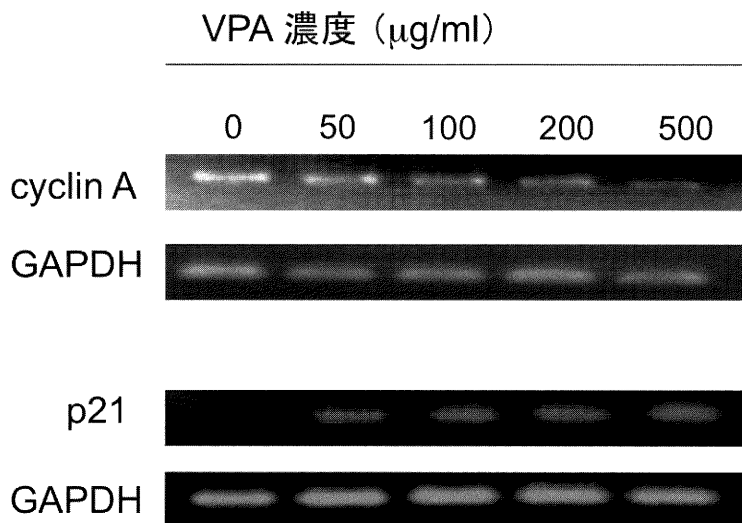


図3 バルプロ酸に伴う細胞周期調節遺伝子の発現変化

Saos2細胞を、図中に示した各濃度のバルプロ酸の存在下で培養し、RT-PCRによりp21とcyclin AのmRNA発現を検出した。バルプロ酸によるcyclin Aの発現低下とp21の発現上昇を認めた。

μg/mlのバルプロ酸がシスプラチンの抗腫瘍効果を相乗的に増強した。U2OS細胞についても同様の結果が得られた(図5)。

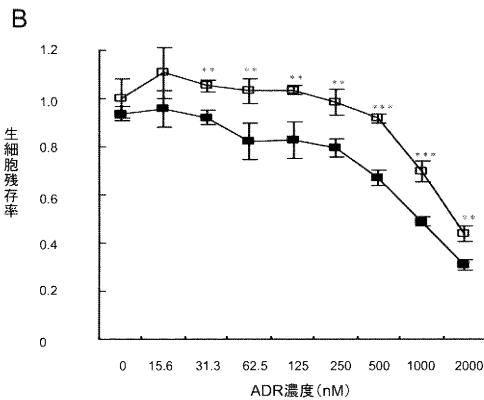
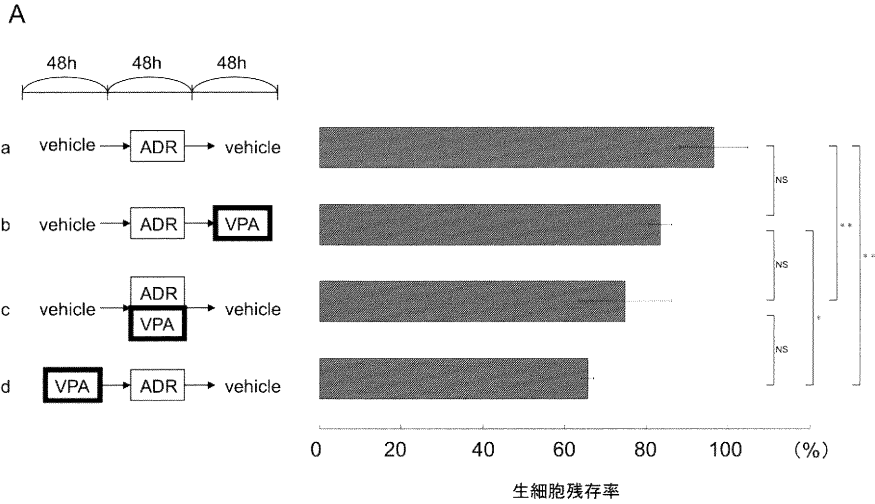
## 考 察

本研究により、骨肉腫細胞に対してバルプロ酸がHDAC阻害剤として働き、抗腫瘍効果を発揮することがはじめて示された。バルプロ酸はSaos2細胞、U2OS細胞、NOS-1細胞のいずれの骨肉腫細胞においても濃度依存性に増殖抑制効果を発揮した。また、バルプロ酸によりヒストンアセチル化、細胞周期調節に関与するp21<sup>WAF1/Cip1</sup>の発現上昇とcyclin Aの発現低下が認められ、骨肉腫における抗腫瘍効果の発現機序の少なくとも一部はHDAC阻害によるものであることが推察された。

バルプロ酸の抗腫瘍効果の機序は単一ではなく、腫瘍細胞の細胞周期におけるG1/S期・

G2/M期のcheck pointの活性化によるアポトーシスの誘導、分化の誘導、侵入・移動の阻害による転移の抑制、血管新生の抑制、抗腫瘍免疫の活性化、腫瘍関連炎症の抑制、腫瘍細胞のクロマチン構造変化による遺伝子転写の抑制など様々な変化を来とし、腫瘍細胞の活動の広く多岐に渡る過程に介入していることが示されている<sup>15)</sup>。また、最近HDAC阻害薬は、ヒストンだけでなく、直接、転写因子等のアセチル化をも亢進させそれらの機能に影響を与えていることも報告された<sup>16)</sup>。このように、バルプロ酸の抗腫瘍効果は多岐に渡る複雑な機序に基づいており、未だ疑問点も残されているが、HDAC阻害活性がその抗腫瘍効果の機序の中心的役割を担っていると考えられている。

また本研究では、バルプロ酸によるアドリアマイシンおよびシスプラチンの抗腫瘍効果の相乗的増強が示された。一方、骨肉腫のもう一つの主要な治療薬であるメソトレキセートでは、検討した



ADR濃度 (nM)	0	15.6	31.3	62.5	125	250	500	1000	2000
VVPA	0.94	0.94	0.94	0.94	0.94	0.94	0.94	0.94	0.94
VADR	1.00	1.11	1.05	1.03	1.04	0.98	0.92	0.70	0.44
VVPA * VADR	0.94	1.04	0.99	0.96	1.00	0.92	0.86	0.65	0.41
VVPA + ADR	0.94	0.96	0.92	0.82	0.83	0.79	0.67	0.49	0.31
効果判定	NA	SY	SY	SY	SY	SY	SY	SY	SY

図4 バルプロ酸とアドリマイシンの併用による骨肉腫細胞に対する抗腫瘍効果の向上

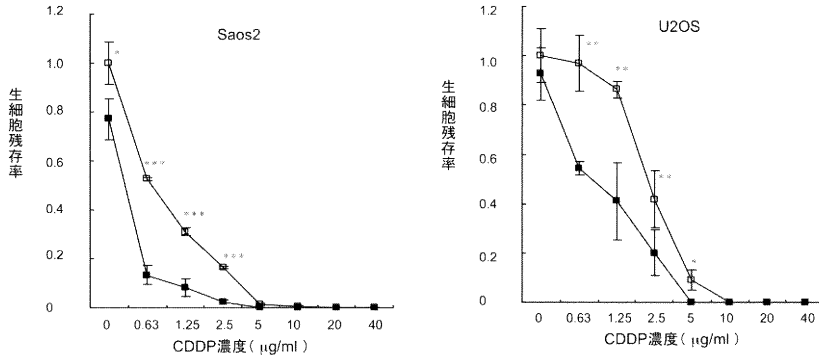
A. 薬剤作用順序の検討

Saos2細胞を、本文中に示した4通りの方法で培養した。終了時点の生細胞残存率を図示した。バルプロ酸を、アドリマイシンと同時(サンプルc)、及びアドリマイシン使用前(サンプルd)に使用した場合に、抗腫瘍効果の増強がより大きかった。

B. バルプロ酸とアドリマイシンの併用効果

Saos2細胞を、本文中に示した2通りの方法で培養し、終了時点の残存生細胞率を図示し比較した。すべての濃度においてアドリマイシンの抗腫瘍効果は100 μg/mlのバルプロ酸により相乗的に増強された。有意差検定および相乗効果判定について以下の略語で表中に示した。\*\*, p < 0.01; \*\*\*, p < 0.001; SY, synergistic (相乗効果); NA, not assessable





CDDP濃度 (μg/ml)	0	0.63	1.25	2.5	5.0	10	20	40
YVPA	0.77	0.77	0.77	0.77	0.77	0.77	0.77	0.77
Y_CDDP	1.00	0.53	0.31	0.16	0.02	0.01	0.00	0.00
YVPA *Y_CDDP	0.77	0.41	0.24	0.13	0.01	0.00	0.00	0.00
YVPA+CDDP	0.77	0.14	0.08	0.02	0.00	0.00	0.00	0.00
効果判定	NA	SY	SY	SY	NA	NA	NA	NA

CDDP濃度 (μg/ml)	0	0.63	1.25	2.5	5.0	10	20	40
YVPA	0.92	0.92	0.92	0.92	0.92	0.92	0.92	0.92
Y_CDDP	1.00	0.97	0.86	0.42	0.09	0.00	0.00	0.00
YVPA *Y_CDDP	0.92	0.89	0.80	0.39	0.08	0.00	0.00	0.00
YVPA+CDDP	0.92	0.55	0.41	0.20	0.00	0.00	0.00	0.00
効果判定	NA	SY	SY	SY	SY	NA	NA	NA

図5 シスプラチンとバルプロ酸との併用効果

図4-Bと同様の方法で Saos2 細胞をシスプラチン単剤あるいはバルプロ酸併用下で培養し、終了時点の残存生細胞率を図示した. 0.63 ~ 2.5 μg/ml の濃度でシスプラチンの抗腫瘍効果がバルプロ酸により相乗的に増強された. U2OS 細胞についても同様の結果が得られた. 有意差検定について以下の略語で表中に示した.

\*, p < 0.05; \*\*, p < 0.01; \*\*\*, p < 0.001

いずれの濃度においてもバルプロ酸による相乗的増強は認められなかった(データ示さず). 線維肉腫、乳癌などの他の固形腫瘍細胞を用いた検討では、バルプロ酸によりアドリアマイシン、シスプラチンの抗腫瘍効果が増強することがすでに報告されている<sup>19)</sup>. バルプロ酸により、クロマチンの構造維持関連タンパク、DNAメチルトランスフェラーゼ、ヘテロクロマチンタンパクの down regulation が起こることが報告されており、クロマチンの decondensation が生じる結果、トポイソメラーゼ II 阻害剤等の相乗効果が出現するのではないかと考えられているが<sup>20)21)</sup>, 本研究の結果から、骨肉腫についてもバルプロ酸により同様の変化が起こっていることが推測される. 本研究では、バルプロ酸を48時間先行して使用すること

が化学療法薬の効果増強に重要である、すなわちバルプロ酸「前投与」による腫瘍細胞の化学療法薬に対する感受性の上昇が示された. 化学療法薬の効果発現に有利な遺伝子発現制御が生じるのに一定の時間を要するためとも考えられる.

本研究で、バルプロ酸は単剤で骨肉腫細胞に対して抗腫瘍効果を示し、かつ、骨肉腫の治療における最重要の抗がん剤であるアドリアマイシンおよびシスプラチンとの併用における有用性が示され、これらの薬剤による新たな併用療法の可能性が見出された. 他のHDAC阻害剤と比べてバルプロ酸の利点は、これまで数十年間におよぶ小児科領域を含む実臨床における安全性がすでに証明されていることであり、実際に、疾患によっては小児期からの超長期の連続使用の安全性が示され

ている。本研究において、バルプロ酸によるアドリアマイシンあるいはシスプラチンとの相乗効果発現は、臨床上達成可能でかつ安全性が認められている有効血中濃度（50～150 $\mu$ g/ml）の範囲内において観察されていることが極めて重要であると考えられ、骨肉腫の新規治療法における役割が期待される。欧米ではすでに、バルプロ酸を用いた種々の悪性腫瘍（造血器腫瘍や脳腫瘍、乳がん、子宮頸がん、卵巣がんなど）を対象にした臨床試験が進行している。したがって、骨肉腫に対しても、既存の薬剤と組み合わせた臨床応用は十分可能と考えられる。早期の臨床応用のためにも、今後さらに詳細な基礎的および臨床的検討が必要である。

## 結 語

骨肉腫細胞株における検討で、臨床的に達成可能でかつ安全な濃度のバルプロ酸が、HDAC阻害作用により抗腫瘍効果を示した。さらに、バルプロ酸は骨肉腫治療における主要な化学療法薬であるアドリアマイシンとシスプラチンの抗腫瘍効果を相乗的に増強した。本研究により、バルプロ酸と既存の化学療法薬との併用療法が、ハイリスク骨肉腫患者の新たな治療戦略となりうる可能性が示された。

## 謝 辞

本研究を遂行するにあたりご指導を賜りました新潟大学医歯学総合研究科の内山聖教授、今井千速助教に感謝いたします。

## 文 献

- 1) Longhi A, Errani C, De Paolis M, Mercuri M and Bacci G: Primary bone osteosarcoma in the pediatric age: state of the art. *Cancer Treatment Reviews* 32: 423 - 436, 2006.
- 2) Ferrari S, Smeland S, Mercuri M, Bertoni F, Longhi A, Ruggieri P, Alvegard TA, Picci P, Capanna R, Bernini G, Müller C, Tienghi A, Wiebe T, Comandone A, Böbling T, Del Oveer AB, Brosjö O, Bacci G and Saeter G: Italian and Scandinavian Sarcoma Groups: Neoadjuvant chemotherapy with high - dose ifosfamide, high - dose methotrexate, cisplatin and doxorubicin for patients with localized osteosarcoma of the extremity: a joint study by the Italian and Scandinavian Sarcoma Groups. *Journal of Clinical Oncology* 23: 8845 - 8852, 2005.
- 3) Henry TR: The history of valproate in clinical neuroscience. *Psychopharmacol Bull* 37: 5 - 16, 2003.
- 4) Fischkoff SA and Walter E Jr: Induction of neurophilic differentiation of human promyelocytic leukemic cells by branched - chain carboxylic acid anticonvulsant drugs. *J Biol Response Mod* 3: 132 - 137, 1984.
- 5) Regan CM: Therapeutic levels of sodium valproate inhibit mitotic indices in cells of neural origin. *Brain Res* 347: 394 - 398, 1985.
- 6) Cinatl J Jr, Cinatl J, Driever PH, Kotchetkov R, Pouckova P, Kornhuber B and Schwabe D: Sodium valproate inhibits in vivo growth of human neuroblastoma cells. *Anticancer Drugs* 8: 958 - 963, 1997.
- 7) Knupfer MM, Hernaiz - Driever P, Poppemborg H, Wolff JE and Cinatl J Jr: Valproic acid inhibits proliferation and changes expression of CD44 and CD56 of malignant glioma cells in vitro. *Anticancer Res* 18: 3585 - 3589, 1998.
- 8) Hernaiz Driever PH, Knupfer MM, Cinatl J and Wolff JE: Valproic acid for the treatment of pediatric malignant glioma. *Clin Pediatr* 211: 323 - 328, 1999.
- 9) Blaheta RA, Michalis M, Driever PH and Cinatl J Jr: Evolving anticancer drug valproic acid: insights into the mechanism and clinical studies. *Med Res Rev* 25: 383 - 397, 2005.
- 10) Boffa LC, Vidali G, Mann RS and Allfrey VG: Suppression of histone deacetylation in vivo and in vitro by sodium butylate. *J Biol Chem* 253: 3364 - 3366, 1978.
- 11) Phiel CJ, Zhang F, Huang EY, Guenther MG, Lazar MA and Klein PS: Histone deacetylase is a direct target of valproic acid, a potent anticonvul-

- sant, mood stabilizer, and teratogen. *J Biol Chem* 276: 36734 - 36741, 2001.
- 12) Gottlicher M, Minucci S, Zhu P, Kramer O, Schimpf A and Giavara S: Valproic acid defines a novel class of HDAC inhibitors inducing differentiation of transformed cells. *EMBO J* 20: 6969 - 6978, 2001.
- 13) Gurvich N, Tsygankova OM, Meinkoth JL and Klein PS: Histone deacetylase is a target of valproic acid - mediated cellular differentiation. *Cancer Res* 64: 1079 - 1086, 2004.
- 14) Deubzer H, Busche B, Michaelis M, Cinatl J, Schulze S, Nau H and Witt O: Novel valproic acid derivatives with potent differentiation - inducing activity in myeloid leukemia cells. *Leuk Res* 30: 1167 - 1175, 2006.
- 15) Michaelis M, Wilhelm D and Cinatl J Jr: Valproic acid as anti-cancer drug. *Current Pharmaceutical Design* 13: 3378 - 3393, 2007.
- 16) Bolden JE, Peart MJ and Johnstone RW: Anticancer activities of histone deacetylase inhibitors. *Nat Rev Drug Discov* 5: 769 - 784, 2006.
- 17) Yang H, Hoshino K, Sanchez - Gonzalez B, Kantarjian H and GarciaManero G: Antileukemia activity of the combination of 5 - aza - 2' - deoxy - cytidine with valproic acid. *Leuk Res* 29: 739 - 748, 2005.
- 18) Mross K, Maessen P, van der Vijgh WJ, Gall H, Boven E and Pinedo HM: Pharmacokinetics and metabolism of epidoxorubicin and doxorubicin in humans. *J Clin Oncol* 6: 517 - 526, 1988.
- 19) Chavez - Blanco A, Perez - Plasencia C, Perez - Cardenas E, Carrasco - Legleu C, Rangel - Lopez E, Segura - Pacheco B, Taja - Chayeb L, Trejo - Becerril C, Gonzalez - Fierro A, Candelaria M, Cabrera G and Duenas - Gonzalez A: Antineoplastic effects of the DNA methylation inhibitor hydralazine and the histone deacetylase inhibitor valproic acid in cancer cell lines. *Cancer Cell Int* 6: 2, 2006.
- 20) Marchion DC, Bicaku E, Daud AI, Sullivan DM and Munster PN: Valproic acid alters chromatin structure by regulation of chromatin modulation proteins. *Cancer Res* 65: 3815 - 3822, 2005a.
- 21) Marchion DC, Bicaku E, Daud AI, Sullivan DM and Munster PN: In vivo synergy between topoisomerase II and histone deacetylase inhibitors: predictive correlates. *Mol Cancer Ther* 4: 1993 - 2000, 2005b.

(平成21年6月26日受付)