

## 科学研究費助成事業（学術研究助成基金助成金）研究成果報告書

平成 25 年 4 月 12 日現在

機関番号：34202

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2011 ～ 2012

課題番号：23659730

研究課題名（和文） 光線力学療法で誘導される微粒子を用いた骨肉腫に対するがん免疫療法の挑戦的研究

研究課題名（英文） Challenging study of immunotherapy for osteosarcoma using microparticles induced by photodynamic therapy

研究代表者

楠崎克之 (KUSUZAKI KATSUYUKI)

平安女学院大学・文化創造センター・客員教授

研究者番号：30177993

研究成果の概要（和文）：光線力学的治療法は悪性骨軟部腫瘍の縮小手術として良好な治療成績が得られています。実験では肺転移も抑制することが分かり、免疫賦活効果が予想されました。この治療では骨肉腫細胞から大量の微粒子が放出されることからこれが免疫担当の食細胞を介して腫瘍免疫を賦活化している可能性が考えられました。この微粒子はナノサイズで免疫を賦活する可能性のある微粒子を含んでいましたが、食細胞に入らず腫瘍の縮小効果や肺転移の抑制効果は認めませんでした。

研究成果の概要（英文）：In this study, we undertook to investigate inhibition effect of tumor growth and pulmonary metastasis on mouse osteosarcoma by immunotherapy with microparticles induced by photodynamic therapy with acridine orange. Results showed that these microparticles including exosomes did not inhibit tumor growth and pulmonary metastasis, because they did not activate immunoactivity via macrophages.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
交付決定額	2,800,000	840,000	3,640,000

研究分野：医歯薬系

科研費の分科・細目：外科系臨床医学・整形外科学

キーワード：骨肉腫、アクリジンオレンジ、光線力学的治療法、微粒子、エキソゾーム、免疫療法、マクロファージ

## 科学研究費助成事業（学術研究助成基金助成金）研究成果報告書

## 1. 研究開始当初の背景

(1) 我々はごく最近、アクリジンオレンジ (acridine orange: AO) を用いた光線力学的療法 (photodynamic therapy: PDT) で骨肉腫細胞がアポトーシスに陥る際に大量の微粒子が細胞から放出されることを発見した。この微粒子にはエクソゾームが含まれ、がん特異抗原を含有している可能性が高い。

(2) アクリジンオレンジを用いた光線力学的療法をマウス骨肉腫移植モデルに行うと原発巣の縮小だけでなく肺転移も抑制され、原発巣の壊死細胞を介したがん免疫の賦活化が生じている可能性が推定された。

(3) 本研究ではこの微粒子をマクロファージないし樹状細胞に取り込ませて高い効率でがん免疫を誘導して、骨肉腫細胞を破壊することができるかどうかについて *in vitro* および *in vivo* の実験系で探索する。

## 2. 研究の目的

本研究では AO-PDT で発生させた微粒子が骨肉腫のがん免疫療法として有効かどうかについて検討する。

(1) そのためにまず、微粒子が培養マウス骨肉腫細胞に AO-PDT を行い、微粒子を大量に発生させ、これを *in vitro* でマクロファージに取り込ませて、抗原提示が起こるかどうかを確認する。

(2) 次にリンパ球の活性化を行った後に骨肉腫細胞に接触させ細胞破壊が生じるか

どうかを検討する。

(3) また、微粒子を、骨肉腫を移植したマウスの皮下に注入して樹状細胞を介したがん免疫の活性化が誘導されるかどうかを腫瘍の増大と肺転移数で検討する。

## 3. 研究の方法

(1) *In vitro* における骨肉腫細胞に対するがん免疫の誘導実験

① Dunn 骨肉腫から樹立されたマウス高転移骨肉腫細胞株、LM8 を DMEM 培地で培養し、pre-confluent の状態で  $1\mu\text{g/ml}$  の濃度の AO 培養液に交換して 10 分間 AO に暴露した後 AO を洗浄し 10,000 ルクス of キセノン光を 10 分間照射した。2 時間後に大量の微粒子が放出されるのでこれを、ExoQuick 溶液を用いて採取する。この微粒子の性質、構成成分を電子顕微鏡、Western blot 法、各種生体蛍光染色法で解析した。

② 採取した微粒子をマウスマクロファージと接触させてその細胞内への取り込みを、共焦点レーザー顕微鏡を用いて観察した。

③ この微粒子を暴露したマクロファージをマウス T リンパ球と混合培養してリンパ球を感作する。次いでこのリンパ球と LM8 骨肉腫細胞を混合培養して T リンパ球の細胞障害を解析した。

(2) *In vivo* における骨肉腫細胞に対するがん免疫の誘導実験

培養した LM8 細胞を単離して  $10^4$  個を C<sub>3</sub>H black マウスの背部皮下に移植した。約 2 週後に直径 1cm 程度の腫瘤を形成した後に、前述した *in vitro* で得られた微粒子を腫瘍周囲の皮下に注射した。その後腫瘍の増大を経時的に観察するとともに肺転移抑制効果についても同時に解析した。

#### 4. 研究成果

##### (1) *In vitro* における骨肉腫細胞に対するがん免疫の誘導実験

①A0 暴露と光照射により LM8 細胞は 30 分以内に apoptosis に陥るが、この時細胞膜に bleb が形成されるとともにこれが細胞から遊離する像が見られた。その内部にはナノサイズの微粒子が大量に存在しブラウン運動様に微動を繰り返していた (salutatory movement)。また同様の微粒子が破れた bleb や細胞内から培地内に大量に放出されていた。これを、ExoQuick を用いて遠沈したところ大量の微粒子だけを単離できた、大きさは 10~100 ミクロンで、電子顕微鏡で形態的に exosome に一致する所見であることが確認できた。また exosome の特異的蛋白である LAMP も検出できた。遊離した exosome は A0 で染色されるだけでなく、ミトコンドリアの生体色素である JC-1、核 DNA の生体染色色素であるヘキスト 33342、およびゴルジ装置の生体染色色素 C5 Ceramide、小胞 (ER) 生体染色色素 ER-Tracker でも染色されることが分かった。

以上の結果から exosome の細胞内の由来は従来考えられている multivesicular body (MVB) だけでなく ER、ゴルジ、ミトコンドリア、ライソゾームなどの様々な細胞内小器官の可能性があると分かった。

②マウスマクロファージへの exosome の暴露では A0 で蛍光標識して細胞内への取り

込みを検討したが、この系では明らかな細胞内への取り込みは確認できなかった。

③この exosome を暴露したマクロファージをマウス T リンパ球と混合培養してリンパ球を感作して、このリンパ球と LM8 骨肉腫細胞を混合培養したが、リンパ球による有意な細胞障害効果は認めなかった。

##### (2) *In vivo* における骨肉腫細胞に対するがん免疫の誘導実験

マウス骨肉腫モデルを用いた exosome の免疫賦活を介した継時的な腫瘍の増殖抑制効果はコントロール群と比較しても有意な差は認めなかった。組織学的にも腫瘍壊死やリンパ球マクロファージの浸潤や集積は認めなかった。また治療開始後 4 週目で摘出したマウスの肺転移巣を調べたが有意な転移抑制効果は認めなかった。

以上の結果からは当初予想した骨肉腫由来の exosome がマクロファージに貪食されて免疫を賦活することによる抗腫瘍効果は認めなかったと結論した。

#### 5. 主な発表論文等

[雑誌論文] (計 6 件)

- (1) Aoi W, Hosogi S, Niisato N, Yokoyama N, Hayata H, Miyazaki H, Kusuzaki K, Fukuda T, Fukui M, Nakamura N, Marunaka Y. Improvement of insulin resistance, blood pressure and interstitial pH in early developmental stage of insulin resistance in OLETF rats by intake of propolis extracts. 査読有 BBRC 432: 650-653, 2013
- (2) Hosogi S, Miyazaki H, Nakajima KI, Ashihara E, Niisato N, Kusuzaki K,

- Marunaka Y. An inhibitor of Na/H(+) exchanger, ethyl-isopropyl amiloride (EIPA), diminishes proliferation of MKN28 human gastric cancer cells by decreasing the cytosolic Cl(-) concentration via DIDS-sensitive pathways. 査読有 Cell Physiol Biochem. 30: 1241-1253, 2012
- (3) Matsubara T, Kusuzaki K, Nanamura T, Matsumine A, Sudo A. Can a less radical surgery using photodynamic therapy with acridine orange be equal to a wide-margin resection? 査読有 Clin Orthop Relat Res 471: 792-802 DOI 10.1007/s11999-012-2616-9, 2012.
- (4) Kusuzaki K, Ashihara E, Hosogi S, Matsubara T, Satonaka H, Nanamura T, Matsumine A, Murata H, Sudo A, Uchida A, Murata H, Baldini N, Fais S, Marunaka Y. Translational research of photodynamic therapy with acridine orange which targets cancer acidity. 査読有 Current Pharmaceutical Design 18: 1414- 11420, 2012.
- (5) 楠崎克之 がん細胞の酸性微小環境および酸性細胞内小器官を標的としたがん治療法の開発 査読有 CLINICAL CALCIUM 21: 61-67, 2011
- (6) Satonaka H, Kusuzaki K, Akeda K, Tsujii M, Iino T, Uemura T, Matsubara T, Nakamura T, Asanuma K, Matsumine T, Sudo A. Acridine orange inhibits pulmonary metastasis of mouse osteosarcoma. 査読有 Anticancer Res 31: 4163-4168, 2011.
- [学会発表] (計 20 件)
- (1) Takao Matsubara. Acridine orange therapy as a new less-invasive limb salvage surgery for rhabdomyosarcomas and synovial sarcomas. AAOS (American Association of Orthopaedic Surgeons) 2013 Annual Meeting March 19-24, 2013, Chicago, USA
- (2) Takao Matsubara. A minimally invasive surgery for bone metastases using the combination of photodynamic therapy and hyperthermia treatment. CTOS (Connective Tissue Oncology Society) 17<sup>th</sup> Annual Meeting November 14-17, 2012 Prague, Czech Republic
- (3) 松原孝夫. 化学療法感受性腫瘍に対するアクリジンオレンジ療法の検討. アクリジンオレンジ治療研究会 2012年12月8日 京都
- (4) 松原孝夫. 骨肉腫細胞における細胞外環境因子とアクリジンオレンジ腫瘍内集積濃度の関係. 第27回日本整形外科学会基礎学術集会 2012年10月26-27日 名古屋
- (5) 楠崎克之. アクリジンオレンジによる多剤耐性骨肉腫細胞株の耐性克服機序の解明 第27回日本整形外科学会基礎学術集会 2012年10月26-27日 名古屋
- (6) Hosogi S. Cl-

- channel/transporters as new targets for cancer therapies based on disruption of autophagy ability via modification of lysosome acidification. 3<sup>rd</sup> Symposium of the Internal Society for Proton Dynamics in Cancer, 2012 October 12-13, Kyoto Japan
- (7) Avnet S. Acidic pH promotes chemoresistance of human osteosarcoma cells through difference survival adaptation mechanism. 3<sup>rd</sup> Symposium of the Internal Society for Proton Dynamics in Cancer, 2012 October 12-13, Kyoto Japan
- (8) Perut F. Carbonic anhydrase IX inhibitors as effective therapeutic tools for osteosarcoma treatment. 3<sup>rd</sup> Symposium of the Internal Society for Proton Dynamics in Cancer, 2012 October 12-13, Kyoto Japan
- (9) Matsubara T. A minimal invasive surgery for bone metastases using photodynamic therapy with acridine orange. 3<sup>rd</sup> Symposium of the Internal Society for Proton Dynamics in Cancer, 2012 October 12-13, Kyoto Japan
- (10) Perut F. Carbonic anhydrase IX inhibitors as effective therapeutic tools for osteosarcoma treatment. 3<sup>rd</sup> Symposium of the Internal Society for Proton Dynamics in Cancer, 2012 October 12-13, Kyoto Japan
- Symposium of the Internal Society for Proton Dynamics in Cancer, 2012 October 12-13, Kyoto Japan
- (11) 松原孝夫. 転移性骨腫瘍に対するアクリジンオレンジ光線力学的療法および磁性体温熱療法併用治療法の検討. 71 回 日本癌学会学術集会 2012 年 9 月 19-21 日 札幌
- (12) Takao Matsubara. A new therapeutic photodynamic surgery using acridine orange for rhabdomyosarcomas and synovial sarcomas. APMSTS (Asia Pacific Musculoskeletal Tumor Society) Meeting 2012 September 6-9, 2012, Kuala Lumpur, Malaysia
- (13) 松原孝夫. 緩和的治療としての転移性骨腫瘍に対するアクリジンオレンジ療法および磁性体温熱療法併用治療中部日本整形災害外科学会 第 120 回学術集会 2012 年 4 月 6-7 日 大阪
- (14) Matsubara T. A new therapeutic limb salvage surgery using acridine orange in patients with bone sarcomas. AAOS 2012 Annual Meeting, 2012, February 7-11, San Francisco, USA
- (15) Hosogi S. An inhibitor of Na<sup>+</sup>/H<sup>+</sup> exchanger (NHE), ethyl-isopropyl amiloride (EIPA),

diminishes proliferation of MKN 28 human gastric cancer cells by decreasing the intracellular Cl-concentration via DIDS-sensitive pathway. 2<sup>nd</sup> Symposium of the Internal Society for Proton Dynamics in Cancer, 2011 November 18-19, Nice France

- (16) Kusuzaki K. Cancer microenvironment and new target cancer therapy. Special Lecture in Bologna University, 2011, Nov. 22, Bologna, Italy
- (17) Kusuzaki K. Cancer microenvironment and new target cancer therapy. Special Lecture in Florence University, 2011, Nov. 21, Florence, Italy
- (18) Kusuzaki K. Acridine orange therapy on Cancer. Italy/Japan Joint Meeting on Cancer Research (co-president), 2011, Nov. 4, Kyoto, Japan
- (19) 楠崎克之 アクリジンオレンジを用いた分子イメージングの低侵襲外科手術への応用 (パネルディスカッション: 生体イメージング技術の骨・軟部腫瘍への応用) 第44回日本整形外科学会 骨・軟部腫瘍学術集会 2011 7.15; 京都
- (20) Matsubara T. Clinical Outcome of Acridine Orange Therapy Supported by Photodynamic

Surgery and Radiodynamic Therapy for Soft Tissue Sarcomas, Compared with Conventional Limb Salvage Surgery after Wide Resection. 16th ISOLS Meeting, 2011 September 15-18, Beigin China

〔図書〕 (計 2 件)

- (1) 楠崎克之. 骨腫瘍. NEW エッセンシャル整形外科学. 星野雄一、吉川秀樹、齋藤知行 編集、医歯薬出版株式会社、東京: pp198-217, 2012.
- (2) 楠崎克之. 第3節 骨肉腫. 第2章: がん領域の稀少疾患の医療ニーズ. 稀少疾患/難病の診断・治療と製品開発 医療情報教会株式会社、東京: pp656-661, 2012.

〔産業財産権〕

○出願状況 (計 0 件)

○取得状況 (計 0 件)

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

楠崎 克之 (KUSUZAKI KATSUYUKI)

平安女学院大学・文化創造センター・客員教授

研究者番号: 30177993

### (2) 研究分担者

芦原 英司 (ASHIHARA EISHI)

京都府立医科大学・医学 (系) 研究科・講師

研究者番号: 70275197

細木 誠之 (HOSOGI SHIGEKUNI)

京都府立医科大学・医学 (系) 研究科・講師

研究者番号: 30433254