

## 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 3 月 31 日現在

機関番号： 14101  
 研究種目： 若手研究（B）  
 研究期間： 2011～2012  
 課題番号： 23791634  
 研究課題名（和文） 細胞外環境制御による高悪性腫瘍治療法および腫瘍治療薬腫瘍取り込み  
 増強法の開発  
 研究課題名（英文） Development of a method of enhancing antitumor drug delivery by  
 extracellular environment control  
 研究代表者  
 松原 孝夫（MATSUBARA TAKAO）  
 三重大学・医学部附属病院・助教  
 研究者番号： 30422827

研究成果の概要（和文）：骨肉腫はじめ、各種癌細胞株を低酸素、酸性、低栄養および高静水圧の複合的環境下に暴露した結果、腫瘍細胞は、細胞外環境に依存して細胞の増殖を制御し、浸潤転移を促進させ、生存するために各種サイトカインを放出しているが、それら環境は光感受性物質であるアクリジンオレンジの集積も増幅し、殺細胞効果を増強することが明らかとなった。

研究成果の概要（英文）：The results of this study showed that osteosarcoma, lung cancer and gastric cancer cells which exposed to the complex tumor micro-environment (i.e. high hydrostatic pressure, hypoxic, acidic and low nutrition) controlled their own cell growth and invasiveness and metastasis ability to survive in such severe tumor micro-environmental condition. On the other hand, the release of various cytokines for survive can be integrated to amplify acridine orange which is a photosensitizer for malignant tumors, and the control of micro-tumor environment enhance the cytotoxic effects by photodynamic therapy.

## 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	3,300,000	990,000	4,290,000

研究分野：がん治療

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・軟部腫瘍学

1. 研究開始当初の背景  
 癌・肉腫などの悪性腫瘍は、その高い分裂能力と転移・浸潤能にて、ホストである人の健常組織へ侵食・転移し生命を脅かす。しかしその高い分裂能と転移能には、多くのエネルギーを必要とするため、固形腫瘍組織内では、相対的に、低酸素、低栄養、酸性、高静水圧といった細胞増殖には適さない環境となっている。しかし腫瘍細胞は、巧みにその厳しい環境を利用・順応し、生存するために、さまざまなサイトカイン、蛋白質などを発現する能力を有している。我々は、細胞外環境を複合的に変化させるシ

ステムを考案し、低酸素、低栄養、酸性、高静水圧の細胞外環境刺激が複合的に作用することで、個々の環境が与える影響以上に、相乗的に腫瘍細胞へ働きかけ、腫瘍細胞が生存・転移・浸潤するための因子を解析し、それらの環境下で抗腫瘍効果が増幅される薬剤の開発研究を考案した。

## 2. 研究の目的

今回の研究では、我々の開発したin vitro—in vivo腫瘍外環境再現システムを用い、in vitroでin vivoでの腫瘍外環境を再現するとともに、その細胞外環境を意図的に変化させ、腫瘍細胞転移が抑制される環境や、各種薬剤の集積が増大するような細胞外環境を検討し、in vivoにおける集積のメカニズムを解明することで、光線力学的療法や抗癌剤の効果増幅を図る。

## 3. 研究の方法

in vitro—in vivo再現システムを用い、低酸素、酸性、低栄養、高静水圧の4つの腫瘍細胞外環境を複合的に再現する。

具体的には、骨肉腫細胞株、肺癌細胞株、胃癌細胞株に対し、in vitroで腫瘍細胞外環境を複合的に変化させ、その細胞外環境変化により、薬剤の腫瘍細胞内への取り込みにより有利な環境因子を検討する。また、我々の予測では、薬剤耐性に相関する腫瘍内酸性度の増加は、酸性度と低酸素の複合環境下で増強すると考えられるため、in vivo studyとして、in vitroで明らかとなった腫瘍細胞外環境を、腫瘍を移植したマウスモデルにて再現する。

薬剤の一つとして光感受性物質であるアクリジンオレンジ (AO) と、細胞外環境調整因子 (CAIX、VEGF、HIF、PDGF など) をターゲットとしたインヒビターを作成し、in vitroで抗腫瘍効果を確認するとともに、In vitroで得られたデータをもとに、それら細胞外環境因子を事前に施し、その後、AOとインヒビターによる治療を行うことで、in vivoにおける殺細胞効果の違いを検討する。これら細胞外環境因子の違いで、殺細胞効果に変化が認められれば、現在臨床応用しているAO光線力学的療法や分子標的治療薬を行う前にそれら細胞外環境因子を意図的に変化させることで、より効果的な殺細胞効果が得られると予想され、臨床結果に直結するものと考えられる。

## 4. 研究成果

I: 細胞外環境因子の細胞株に及ぼす影響  
骨肉腫細胞株 (SaOS2, MG63, LM8, U2OS)、胃癌細胞株 (AGN)、肺癌細胞株 (H1299) を、低酸素、酸性、低栄養、高静水圧の複合環境下で培養し、各培養環境下での増殖、環境関連遺伝子発現の違いを、Cell count、FacsScan、QT-RT-PCR法を用いて解析を行った。

Figure 1A

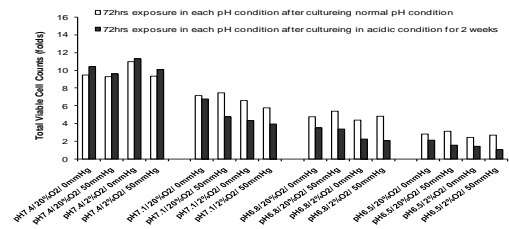
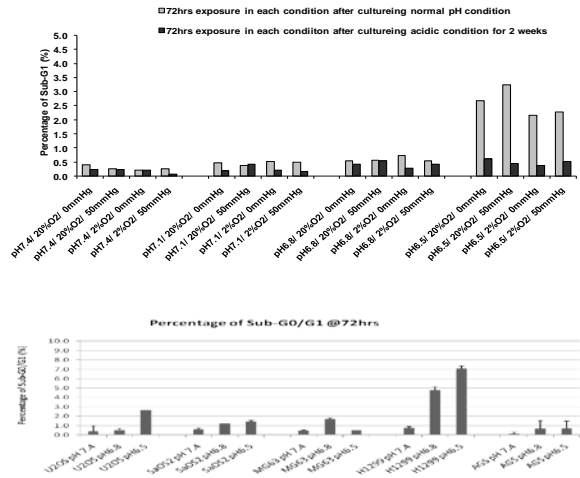


Figure 1A は骨肉腫細胞株 U2OS の各複合環境下での細胞増殖、Figure 1B は同じく、各種細胞外環境下での Facs Scan のおける Sub-G0/G1 phase を示す。

Figure 1B



腫瘍細胞外環境を酸性にするに伴い腫瘍細胞の増殖は低下する傾向にあったが、アポトーシスを含む解析では、pH を低下させても、細胞死は誘導されず、2 週間酸性環境下で培養を続けた細胞株においては、Sub-G0/G1 phase は低下しており、アポトーシスを含む腫瘍死に対し耐性を示している可能性が示唆された。

Figure 1C

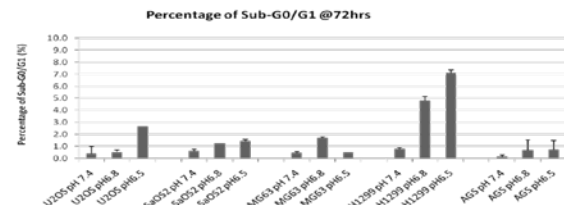


Figure 1C は 5 種の細胞における各 pH の Sub-G0/G1 phase を示す。肺癌細胞株は、酸に対する耐性が弱い傾向が見られたが、骨肉腫細胞株および胃癌細胞株では酸に対する耐性が認められた。

II:細胞外環境因子のアクリジンオレンジ集積度への影響各環境培養後のアクリジンオレンジの細胞集積度を、共焦点顕微鏡、pH

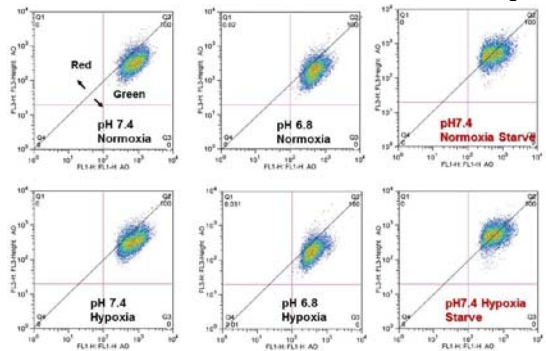


Figure2

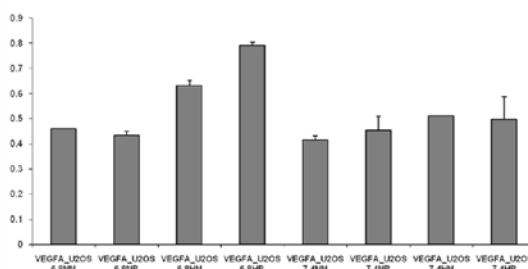
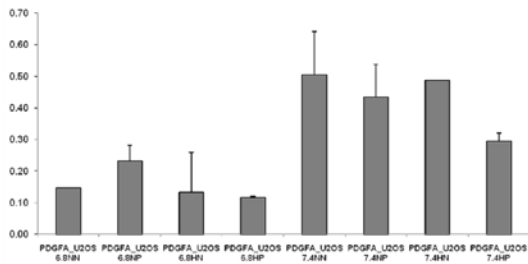
Figure2 では、酸性度、栄養、酸素濃度をコントロールした環境下での細胞内集積 AO 集積度を FacsScan にて解析した結果であるが、AO 集積は、細胞内の Acidic vesicle の酸性度やライソソームに依存するため、低栄養環境、低酸素環境、酸性環境で、コントロールの pH7.4、20%酸素環境下に比べ、約 1.5 倍の AO 集積増加が認められた。AO 集積増加により、AO による光線力学的殺細胞効果の増幅も認められた。

III.細胞外環境因子による腫瘍細胞遺伝子発現の検討

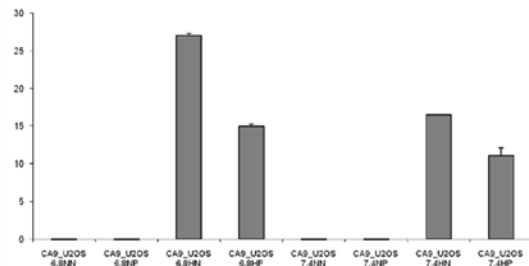
各種細胞間での遺伝子発現につき、環境調整因子である CAIX、VEGFをはじめ、各種因子に対し QT-PCR にて発現の差異を確認した。

上段は左から

pH6.8\_20%O2\_0mmHg  
pH6.8\_2%O2\_50mmHg  
pH6.8\_20%O2\_0mmHg

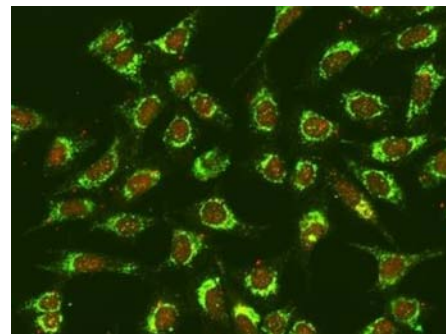
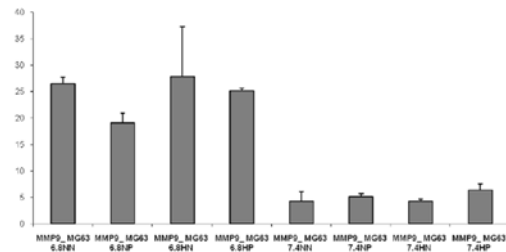


pH6.8\_20%O2\_50mmHg、  
pH7.4\_20%O2\_0mmHg  
pH7.4\_2%O2\_50mmHg  
pH7.4\_20%O2\_0mmHg、

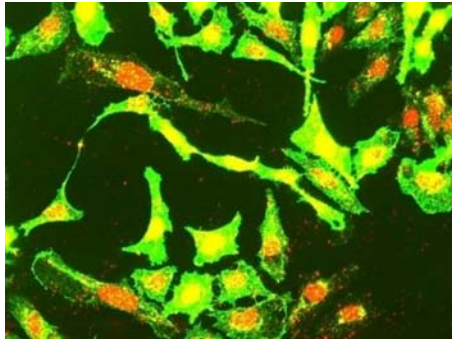


pH7.4\_20%O2\_50mmHg の環境を示す。PDGF (1 番目グラフ) に関しては、酸性環境より、中性環境でより高発現が見られたが、VEGF (2 番目グラフ) CAIX (下記グラフ)、については、低酸素環境だけでなく、酸性環境下で相乗効果的に発現が認められ、腫瘍細胞環境に特徴的である低酸素、酸性環境での発現が確認された。

一方、細胞浸潤にかかわる MMP-9 の発現(下段)は、酸性および Hypoxia 環境共に高発現が見られ、酸性および低酸素環境下では、浸潤能の増加が認められた。



pH6.8 Normoxia (上)、pH6.8 Hypoxia (下)における CAIX の発現 (Green)

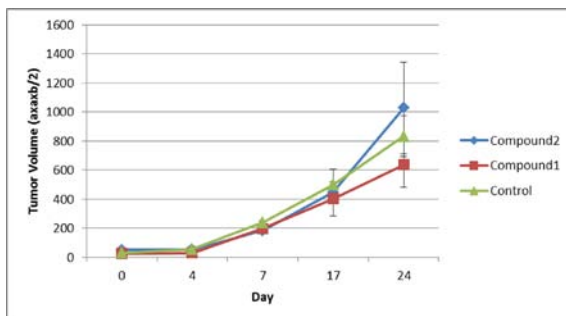


CAIX の発現は、先の QT-PCR で確認した結果と同様、蛍光免疫染色にて、酸性、低酸素環境下で効率に発現が認められ、細胞の環境適応のための蛋白発現は、通常培養環境下 (pH7.4 Normoxia) の環境に比べ、同一細胞であっても、各種蛋白が高率に発現していることが確認された。

#### IV. 細胞外環境因子調整による抗腫瘍効果の検討

酸性環境下で発現の見られた細胞外環境関連遺伝子について、そのタンパクのインヒビターを作成し、インヒビターによる抗腫瘍効果を検討した。まず、CAIX に対するインヒビターを 3 種作成。細胞発現を確認し、肺転移モデルにて抗腫瘍効果と、肺転移抑制効果を検討した。

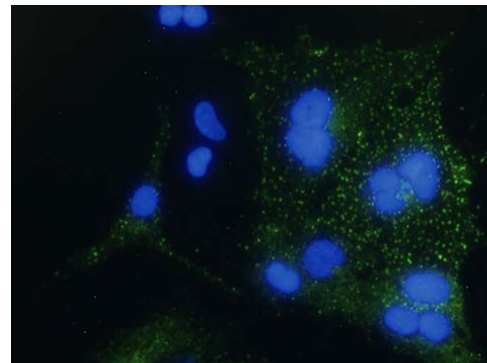
マウス骨肉腫細胞株を、C3L マウス皮下に移植後、5000uM0.2 ccを腫瘍系が 6 mm になったところで局注。細胞増殖と、肺転移数を確認した。



上図は、肺移植後の腫瘍体積を変化を示す。結果は、細胞増殖抑制は、腫瘍サイズが小さい影響もあり、有意な抗腫瘍効果は得られなかったが、肺転移数については、CAIX インヒビター (Compound1 および 2) で、肺転移抑制効果が見られ、CAIX 発現による転移抑制効果 (下図) が期待された。

①Compound2	②Compound1	③Control(PBS)
4	2	13
1	13	38
14	16	15
13	1	14
8	8	20

③コントロール群に比べ、①Compound2 では、(p=0.02) 優位に細胞増殖抑制効果が認められた。



上図は、SaOS2 における CAIX (Green) の 1%酸素環境下での発現を示す。

CAIX は低酸素化で発現が見られることは、周知の事実であるが、マウス骨肉腫株と比較し、ヒト細胞株でより効率に発現していることから、CAIX のインヒビターに対する研究は、今後、ヒト腫瘍肺転移モデルで行う予定とした。

今回の研究により、腫瘍細胞外環境因子は、細胞増殖、浸潤等に強く関連しており、その因子は相乗効果が認められることや、環境因子により、環境に適応するための各種サイトカインが発現して、生存、浸潤に有利に働いているが、その発現因子をブロックすることで、細胞外環境の変化に順応できず、殺細胞効果が認められること、転移抑制効果が認められることが判明し、今後はこれら環境因子関連タンパクを分子標的治療薬等で制御することで、新たな悪性腫瘍治療法の開発が期待できると考える。

#### 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. Matsubara T, Kusuzaki K, Matsumine A, Nakamura T, Sudo A. Can a less radical surgery using photodynamic therapy with acridine orange be equal

- to a wide-margin resection? Clin Orthop Relat Res. 2013 Mar;471(3):792-802. doi: 10.1007/s11999-012-2616-9. PubMed PMID: 23008027; PubMed Central PMCID: PMC3563805.
2. Kusuzaki K, Hosogi S, Ashihara E, Matsubara T, Satonaka H, Nakamura T, Matsumine A, Sudo A, Uchida A, Murata H, Baldini N, Fais S, Marunaka Y. Translational research of photodynamic therapy with acridine orange which targets cancer acidity. Curr Pharm Des. 2012;18(10):1414-20. PubMed PMID: 22360555.
  3. Satonaka H, Kusuzaki K, Akeda K, Tsujii M, Iino T, Uemura T, Matsubara T, Nakamura T, Asanuma K, Matsumine A, Sudo A. Acridine orange inhibits pulmonary metastasis of mouse osteosarcoma. Anticancer Res. 2011 Dec;31(12):4163-8. PubMed PMID: 22199275.
- [学会発表] (計 16 件)
1. ISOLS (International Symposium on Limb Salvage) 16th Meeting. September 15-18, 2011, Beijing, China 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. Takao Matsubara, Katsuyuki Kusuzaki, Hiroaki Murata, Akihiko Matsumine, Tomoki Nakamura, Kunihiro Asanuma, Atsumasa Uchida, Akihiro Sudo
  2. ISPDC (Symposium of the International Society for Proton Dynamics in Cancer) 2th Annual Meeting November 18-19, 2011 Nice, France. Tumor Micro-environmental Effect of Extracellular pH, pO<sub>2</sub>, and Pressure controlled Invasiveness and Survival on Human Osteosarcoma Cells. Takao Matsubara, Akihiro Sudo, Gene R DiResta, John H Healey.
  3. AAOS (American Academy of Orthopaedic Surgeons) 2012 Annual Meeting February 7-11, 2012, San Francisco, CA. A new therapeutic limb salvage surgery using acridine orange in patients with bone sarcomas. Takao Matsubara, Katsuyuki Kusuzaki, Akihiko Matsumine, Akihiro Sudo
  4. ORS (Orthopaedic Research Society) 2012 Annual Meeting. February 4-7, 2012, San Francisco, CA. The Synergistic Tumor Micro-environmental Effect of Extracellular pH, pO<sub>2</sub>, and Pressure controlled Invasiveness and Survival on Human Osteosarcoma Cells. Takao Matsubara, Akihiro Sudo, Gene R DiResta, John H Healey.
  5. 第 43 回日整会骨・軟部腫瘍学会 2011 年 7 月 14-15 日 京都. 悪性骨軟部腫瘍切除後の骨欠損に対する術中処理自家骨移植法の治療成績. 松原孝夫 松峯昭彦 楠崎克之 中村知樹 浅沼邦洋 渥美覚 内田淳正 須藤啓広
  6. 第 116 回中部整形外科・災害外科学会 2011 年 4 月 7-8 日 高知. 悪性骨軟部腫瘍における腫瘍細胞外 pH と予後の検討. 松原孝夫、楠崎克之、中村知樹、浅沼邦洋、松峯昭彦、須藤啓広
  7. 第2回AO治療研究会 2011年11月5日 京都. 悪性軟部腫瘍におけるアクリジンオレンジ療法至適症例の検討. 松原孝夫, 楠崎克之, 松峯昭彦, 中村知樹、浅沼邦洋, 須藤啓広
  8. APMSTS (Asia Pacific Musculoskeletal Tumor Society) Meeting 2012 September 6-9, 2012, Kuala Lumpur, Malaysia. A New Therapeutic Photodynamic Surgery Using Acridine Orange for Rhabdomyosarcomas and Synovial Sarcomas. Takao Matsubara, Katsuyuki Kusuzaki, Akihiko Matsumine, Kunihiro Asanuma, Tomoki Nakamura, Atsumasa Uchida, Akihiro Sudo
  9. ISPDC (International Society for Proton Dynamics in Cancer) 3<sup>rd</sup> Symposium October 12-13, 2012 Kyoto, Japan. A minimally invasive surgery for bone metastases using photodynamic therapy with acridine orange. Takao Matsubara, Katsuyuki Kusuzaki, Akihiko Matsumine, Kunihiro Asanuma, Tomoki Nakamura, Atsumasa Uchida, Akihiro Sudo
  10. ISPDC (International Society for Proton Dynamics in Cancer) 3<sup>rd</sup> Symposium October 12-13, 2012 Kyoto, Japan. Acridine orange used for photodynamic therapy accumulates in malignant tumor cells by control the tumor microenvironments. Takao Matsubara, Katsuyuki Kusuzaki, Akihiko Matsumine, Kunihiro Asanuma, Tomoki Nakamura, Atsumasa Uchida, Akihiro Sudo

11. CTOS (Connective Tissue Oncology Society) 17<sup>th</sup> Annual Meeting November 14-17, 2012 Prague, Czech Republic. A MINIMALLY INVASIVE SURGERY FOR BONE METASTASES USING THE COMBINATION OF PHOTODYNAMIC THERAPY AND HYPERTHERMIA TREATMENT. Takao Matsubara, Katsuyuki Kusuzaki, Akihiko Matsumine, Kunihiro Asanuma, Tomoki Nakamura, Atsumasa Uchida, Akihiro Sudo.
12. AAOS (American Association of Orthopaedic Surgeons) 2013 Annual Meeting March 19-24, 2013, Chicago, IL. Acridine Orange Therapy as a New Less-invasive Limb Salvage Surgery for Rhabdomyosarcomas and Synovial Sarcomas. Takao Matsubara, Katsuyuki Kusuzaki, Akihiko Matsumine, Kunihiro Asanuma, Tomoki Nakamura, Akihiro Sudo
13. 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 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. 松原孝夫、楠崎克之、松峯昭彦、中村知樹、浅沼邦洋、須藤啓広
14. 71回 日本癌学会学術集会 2012年9月19-21日. 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. 松原孝夫 楠崎克之 松峯昭彦 浅沼邦洋 中村知樹 内田淳正 須藤啓広
15. 第27回日本整形外科学会基礎学術集会 2012年10月26-27日. 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. 松原孝夫 楠崎克之 松峯昭彦 浅沼邦洋 中村知樹 内田淳正 須藤啓広
16. A0治療研究会 2012年12月8日 京都. 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. 松原孝夫、楠崎克之、松峯昭彦、中村知樹、浅沼邦洋、須藤啓広

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

松原 孝夫 (MATSUBARA TAKAO)  
三重大学・医学部附属病院・助教  
研究者番号： 30422827

### (2) 研究分担者

( )

研究者番号：

### (3) 連携研究者

( )

研究者番号：