

令和元年6月10日現在

機関番号：14101

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2016～2018

課題番号：16K10855

研究課題名(和文)腫瘍微小環境調整因子併用による抗腫瘍治療薬効果改善法の開発

研究課題名(英文) Development of tumor micro environment regulators improving conventional anti-tumor therapy

研究代表者

松原 孝夫 (MATSUBARA, TAKAO)

三重大学・医学系研究科・リサーチアソシエイト

研究者番号：30422827

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,600,000円

研究成果の概要(和文)：腫瘍特異的微小環境を制御する因子のモノクローナル抗体ないし阻害剤を併用して、腫瘍特異的微小環境を意図的に変化させ、従来の抗がん剤治療効果が、もっとも期待できる環境を再現し、より高い抗腫瘍効果をもたらす治療法を確立する実験計画を考案した結果、放射線耐性株の樹立は困難であり、放射線治療に対する効率的な治療法の確率は困難であったが、放射線治療耐性と同様の耐性を有するとされる低酸素環境下で、Carbonic anhydrase9は、転移および腫瘍浸潤抑制効果を示し、従来の抗がん剤、放射線治療や、光線力学的療法と併用することで、腫瘍微小環境をコントロールし、高い抗腫瘍効果を発揮すると予想された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

従来の悪性腫瘍に対する治療法は、その腫瘍環境により、同じ腫瘍タイプでも、有効であったり、無効であったりと、個々に抗腫瘍効果に差が出ていたが、この腫瘍環境を調整する因子を追加することで、より高い治療効果が期待でき、しかも高価な薬剤でないため、社会的経済効果も十分に期待できるところに、学術的・社会的意義があると考えられる。

研究成果の概要(英文)：The aim of this study is monoclonal antibodies or inhibitors of tumor microenvironment can control anti-tumor effect of conventional anti-tumor therapy. From previous our studies, to control tumor microenvironment is expected to be necessary for reducing cancer resistance for tumor therapy, We deliberately changed and designed an experimental design to establish a therapeutic method in which the effects of conventional anticancer drugs, radio sensitizers and radiotherapy reproduce the most promising environment and lead to higher antitumor effects. Although establishment of a radiation resistant in vitro condition has been difficult, we find out inhibitor of Carbonic anhydrase 9, which could control hypoxic condition, and it showed the effect of suppressing metastasis and tumor invasion, itself. Moreover, the new agent combined with conventional anticancer agents, radiation therapy or photodynamic therapy exerted a high antitumor effect.

研究分野：医学 腫瘍学

キーワード：医学 腫瘍学 腫瘍微小環境 Carbonic Anhydrase 9 アクリジンオレンジ 放射線治療 光線力学的療法 骨肉腫

1. 研究開始当初の背景

がん・肉腫などの悪性腫瘍は、その高い分裂能力と転移・浸潤能により、ホストである人の健常組織へ侵食・転移し生命を脅かす。また、悪性腫瘍は、その高い増殖能の結果から、低酸素・酸性・低栄養・高静水圧といった、正常細胞にとっては生存が困難な微小環境にさらされているが、腫瘍細胞は、その固形腫瘍に特異的な微小環境下でも、容易に生存することができ、さらにその環境を利用して、抗がん剤耐性や放射線抵抗能を獲得していることも知られている(右図1)。

我々は、*in vitro*で、それら腫瘍微小環境を忠実かつ同時に再現し、スクリーニングを行うことを可能にしてきた。(Matsubara et. al. Frontier 2013)

今回の研究では、その腫瘍特異的微小環境下で、抗がん剤、放射線感受性物質をスクリーニングするとともに、各環境を制御する因子のモノクローナル抗体ないし阻害剤を併用して、腫瘍特異的微小環境を意図的に変化させ、従来の抗がん剤治療薬、放射線感受性物質および放射線治療の効果が、もっとも期待できる環境を再現し、より高い抗腫瘍効果をもたらす治療法を確立する実験計画を考案した(右図2)。

2. 研究の目的

今回の研究では、腫瘍特異的微小環境下で、抗がん剤、放射線感受性物質をスクリーニングするとともに、各環境を制御する因子のモノクローナル抗体ないし阻害剤を併用して、腫瘍特異的微小環境を意図的に変化させ、従来の抗がん剤治療薬、放射線感受性物質および放射線治療の効果が、もっとも期待できる環境を一時的に再現し、より高い抗腫瘍効果をもたらす治療法を確立する。

3. 研究の方法

(1) 人骨肉腫細胞株に対し、*in vitro*で腫瘍細胞外環境(酸性・低酸素・高静水圧・栄養)を複合的に再現させ、各種抗がん剤、分子標的治療薬および光線療法治療薬であるアクリジンオレンジ(AO)の腫瘍細胞内への取り込み変化と、抗腫瘍効果検証する。具体的には、主な腫瘍微小環境である低酸素、酸性、高静水圧、低栄養環境を、我々の開発した*in vitro-in vivo*微小環境コントロールシステムで、*in vitro*下に意図的に変化させ、骨肉腫細胞株の培養を行い、その培養環境が各種薬剤の取り込みにどう影響するかを確認する。

(2) 先に、各種微小環境下での遺伝子発現を検討し得られた遺伝子発現(図3)をもとに、同定した腫瘍環境調整タンパク(CA9)阻害剤について、AOと併用することで抗腫瘍効果を検討する。

(3) 新規薬剤の創薬新薬 環境因子調整タンパク阻害剤とAOを結合させ新規薬剤を創薬し、その抗腫瘍効果を検討する。

(4) 放射線耐性株を作成し、その耐性株を移植、創薬した新規薬剤の抗腫瘍効果、転移抑制効果を検討する。

4. 研究成果

(1) *in vitro*における腫瘍微小環境変化と各種抗がん剤、分子標的治療薬の取り込み検討

主な腫瘍微小環境である低酸素、酸性、高静水圧、低栄養環境を、我々の開発した*in vitro-in vivo*微小環境コントロールシステムで、*in vitro*下に意図的に変化させ、骨肉腫細胞株の培養を行い、その培養環境が各種薬剤の取り込みにどう影響するかを確認した。

MG63, U2OS, SaOS2, 143B, HOS, Hu09 各種骨肉腫細胞株を培養したが、低酸素、高静水圧、酸性および低栄養の複合環境下では、いずれの細胞株の培養も、細胞周期が停止し、壊死までは至

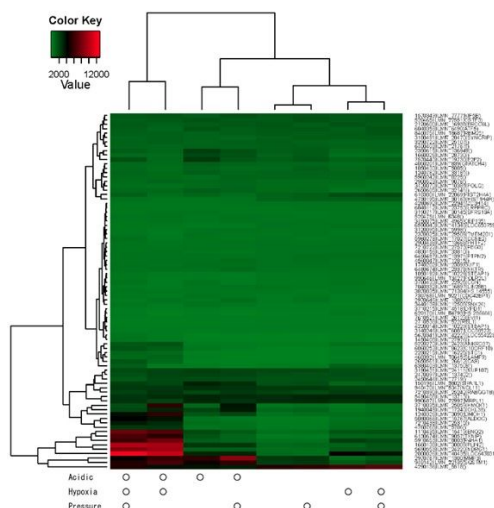
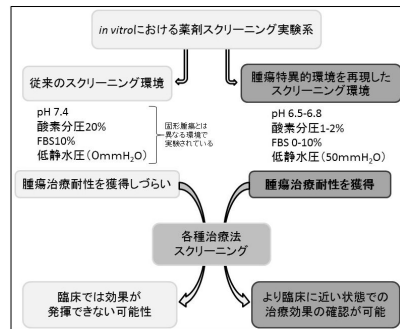
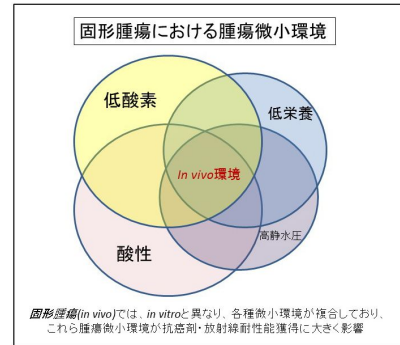


図3 各腫瘍微小環境下での遺伝子発現 (RT-PCR) Heat map 酸性、低酸素、高静水圧複合環境で最も遺伝子発現を認める

らないものの、増殖しなかった。そこで、低栄養環境を除き、低酸素、酸性、および高静水圧で培養を行った。MG63 については、酸性に強いものの、増殖曲線は低下し、HOS、Hu09 については、酸性、低酸素下でも増殖促進を示した(右図4)。

(2) 腫瘍調整因子 CA9 (Carbonic Anhydrase IX) 阻害剤を用いた抗腫瘍効果の検討

in vitro 再現腫瘍特異的微小環境下における腫瘍調整因子併用抗腫瘍効果の検討について、先に細胞増殖が確認された、SaOS2、143B、HOS、Hu09 について、腫瘍調節因子として有効な CA9 の inhibitor を用いて、腫瘍増殖曲線および CA9 の発現を確認した。CA9 は、いずれの細胞株でも低酸素にて Western blot 法で、高発現していることを確認(図5)。MG63 においては低酸素下でも増強発現した。20%通常酸素下で、各細胞株を培養し、CA9 阻害剤を各濃度で投与したが、低酸素下でも増殖が見られた HOS、Hu09 については、通常酸素下でも CA9 阻害剤単体での抗腫瘍効果を認めた。1%低酸素下では、いずれの細胞株も、CA9 阻害剤で、増殖抑制を認めた(右下図6)が、細胞全体の増殖曲線が、通常酸素化よりも低下するため、抑制率としては、通常酸素下よりやや抑制されない結果となった。

(3) CA9 阻害剤とアクリジンオレンジ (AO) を併用した抗腫瘍効果の検討

同定した CA9 について、AO と併用することでの抗腫瘍効果を検討した。主な腫瘍微小環境である低酸素、酸性、高静水圧、低栄養環境を、我々の開発した in vitro-in vivo 微小環境コントロールシステムで、in vitro 下に意図的に変化させ、骨肉腫細胞株の培養を行い、その培養環境が各種薬剤の取り込みにどう影響するかを確認した結果、腫瘍調節因子として有効な CA9 阻害剤を上回る抗腫瘍効果を及ぼす inhibitor はなく、CA9 阻害剤と AO を併用することでの抗腫瘍効果を検討した。CA9 は、いずれの細胞株でも低酸素にて Western blot 法で、高発現していることを確認できるが、CA9 は、膜表面タンパクで、細胞内への移行が困難であり、CA9 と AO を併用して使用した実験と、CA9 阻害剤に創薬で AO を結合した新薬 (CA9AO) を発注し、それを用いて、抗腫瘍効果を検討する実験を計画した。MG63 において CA9 阻害剤を各濃度で、各酸素濃度で投与、培養後 AO を投与。放射線の代わりにまず光線を照射して、CA9 阻害剤非投与群と比較した。

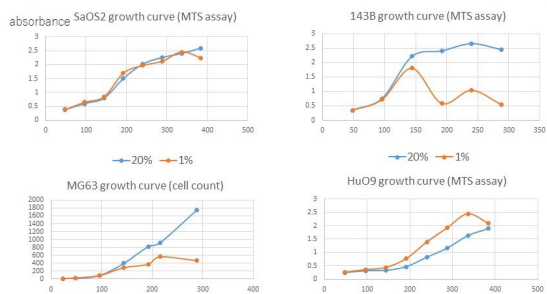
CA9 投与後、AO を投与した群では、低酸素環境下において、非投与群と比べ、AO 殺細胞効果は軽度上昇していたが、通常酸素下では、CA9 阻害剤の相乗効果は、認められなかった。MG63 以外の細胞株では CA9 阻害剤自体に、軽度の腫瘍増殖抑制効果が見られるため、MG63 で、CA9 阻害剤に AO をラベルした新薬 (CA9AO) を用いて、まずは、細胞内集積を蛍光で確認した。しかし、酸素下および低酸素下でも、AO の蛍光集積は、AO 単体に比べ非常に少なく、CA9 阻害剤は、CA9 に特異的ではあるが、その構造のために、細胞膜表面ないし、細胞内に集積することが困難であると予想された。AO より分子量が大きくなるため、細胞内への集積が阻害された可能性もあった。

(4) 細胞環境における AO 集積度と放射線力学的療法効果の検討

前年度で作成した新薬 (CA9AO) は、その細胞分子量から、細胞内への集積が認められなかったと考えられたことから、再度、骨肉腫細胞株を、各複合環境下(低酸素、酸性)で培養。AO の集積度を確認した。AO 単体では全細胞株で、低酸素および酸性複合環境で、約 1.5-2 倍の集積増加を Facs-sacn で確認したことから、新薬については、分子量および化学構造の変化に伴う細胞内集積低下と考えられた。

酸性・低酸素下で AO の集積は増加したが in vitro の放射線耐性試験では、AO 集積により、低

The growth curve analysis of osteosarcoma cells in hypoxia



Western blotting (hypoxia: 1%O₂, normoxia 20%O₂)

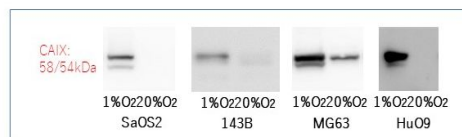
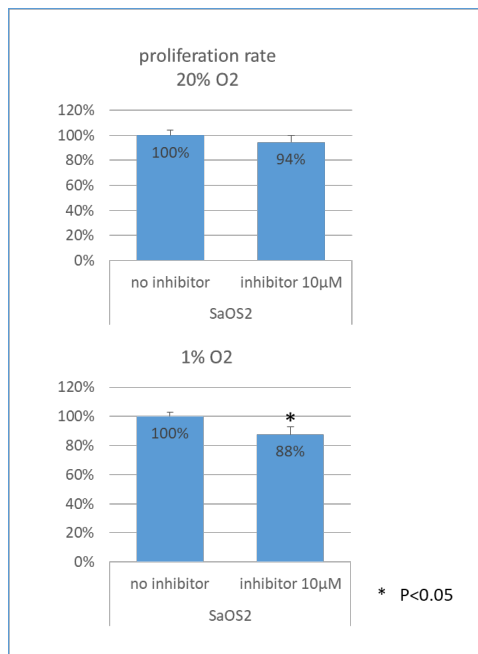


図5 骨に屈細胞株における低酸素下CA9発現

CA IXはすべての細胞株において低酸素状態で発現が亢進 MG63のみ通常酸素下でもCA IXの発現を認めた。



酸素酸性環境下でも、高い放射線感受性を示したため、非放射線耐性株においては、いかなる環境変化でも効率に AO-RDT が有効であった。

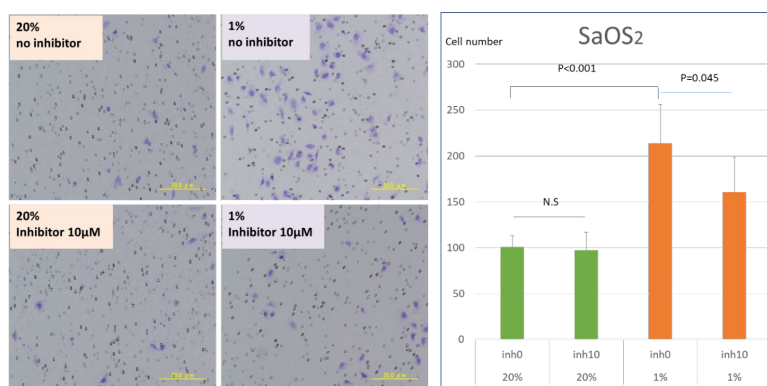
よって、放射線耐性株樹立が必要なため、定期的に小線量の放射線照射を継続して継代培養を行ったが、各細胞株において、放射線耐性株の樹立は、過去の実験同様困難であったため、放射線耐性獲得を有するといわれる低酸素下で継続培養を行い、継代後の細胞培養株で、実験を継続することとした。

低酸素継代株は、放射線耐性は認められないものの、低酸素環境下での継代培養により、骨肉腫細胞株の一部は抗がん剤耐性を示した。骨肉腫株以外でも恒常的放射線耐性株の樹立は、困難であったため、放射線耐性を獲得すると考えられる低酸素環境下における抗がん剤耐性培養細胞株を、放射線耐性株の代用として実験を継続した。低酸素・酸性環境を同時に調整する因子として、HIF-1、CA9、HES-1 をこれまでの研究で同定しているが、これら発現については、低酸素環境培養株では、高率に発現していることをすでに確認済みのため、最も低酸素の調整因子としてかわる CA9 を第一因子として実験を継続した。

(5) CA9 阻害剤による腫瘍浸潤能・転移能の検討

CA9 阻害剤における腫瘍細胞浸潤能を調べるため、*in vitro* で scratch migration assay を行った。Migration assay では、低酸素耐性株で高浸潤能を示し、CA9 阻害剤併用で、浸潤能の抑制効果を認めた (右図 7)。

そこで、低酸素耐性株に対して、CA9 阻害剤を先に投与し、AO による放射線治療効果を検討することとした。耐性株を、ヌードマウスの背部に移植し、腫瘍が 8mm となったところで、CA9 阻害剤を局所投与。直後に 10mg/kg の AO を尾静脈投与し、2 時間後、それぞれヌードマウスの皮膚を通して、蛍光イメージングシステムを用いて、AO の集積を確認した。



耐性株における AO 集積は、CA9 阻害剤投与群・非投与群ともに集積の増加が確認された。腫瘍病変に対し、5Gy の放射線照射を行っても、単回照射では、非耐性株と比べても、有意な腫瘍縮小効果は見られなかった。しかし、肺転移について、経時的に確認を行うと、CA9 阻害剤投与群では、肺転移数の抑制効果が認められ、局所腫瘍縮小効果は差異がないものの、肺転移抑制効果については、CA9 阻害剤によると思われる効果が期待できた。CA9 阻害剤同様、HES-1、HIF-1 については、低酸素異性株で高発現を認めるものの、阻害剤による発現の抑制が困難で、十分な腫瘍縮小効果は得られなかった。

5. 主な発表論文等

[雑誌論文](計 12 件)

1: Kakimoto T, Matsumine A, Kageyama S, Asanuma K, Matsubara T, Nakamura T, Iino T, Ikeda H, Shiku H, Sudo A. Immunohistochemical expression and clinicopathological assessment of the cancer testis antigens NY-ESO-1 and MAGE-A4 in high-grade soft-tissue sarcoma. *Oncol Lett.* 2019 Apr;17(4):3937-3943. doi: 10.3892/ol.2019.10044. Epub 2019 Feb 14. PubMed PMID: 30881511; PubMed Central PMCID: PMC6403520. 査読有

2: Okuno K, Matsubara T, Nakamura T, Iino T, Kakimoto T, Asanuma K, Matsumine A, Sudo A. Carbonic anhydrase IX enhances tumor cell proliferation and tumor progression in osteosarcoma. *Onco Targets Ther.* 2018 Oct 12;11:6879-6886. doi: 10.2147/OTT.S177605. eCollection 2018. PubMed PMID: 30349321; PubMed Central PMCID: PMC6190629. 査読有

3: Nakamura T, Kusuzaki K, Matsubara T, Murata H, Hagi T, Asanuma K, Sudo A. Long-term clinical outcome in patients with high-grade soft tissue sarcoma who were treated with surgical adjuvant therapy using acridine orange after intra-lesional or marginal resection. *Photodiagnosis Photodyn Ther.* 2018 Sep;23:165-170. doi: 10.1016/j.pdpdt.2018.06.001. Epub 2018 Jun 7. PubMed PMID: 29885811. 査読有

4: Hagi T, Nakamura T, Sugino Y, Matsubara T, Asanuma K, Sudo A. Is FDG-PET/CT Useful for Diagnosing Pulmonary Metastasis in Patients with Soft Tissue Sarcoma? *Anticancer Res.* 2018 Jun;38(6):3635-3639. doi: 10.21873/anticancer.12638. PubMed PMID: 29848720. 査読有

5: Hagi T, Nakamura T, Iino T, Matsubara T, Asanuma K, Matsumine A, Sudo A. The diagnostic and prognostic value of interleukin-6 in patients with soft tissue sarcomas. *Sci Rep.* 2017 Aug 29;7(1):9640. doi: 10.1038/s41598-017-08781-6. PubMed PMID: 28851899; PubMed Central PMCID: PMC5575335. 査読有

6: Nakamura T, Matsumine A, Matsubara T, Asanuma K, Yada Y, Hagi T, Sudo A. Infiltrative tumor growth patterns on magnetic resonance imaging associated with systemic inflammation and oncological outcome in patients with high-grade soft-tissue sarcoma. *PLoS One.* 2017 Jul 20;12(7):e0181787. doi: 10.1371/journal.pone.0181787. eCollection 2017. PubMed PMID: 28727824; PubMed Central PMCID: PMC5519204. 査読有

7: Kusuzaki K, Matsubara T, Murata H, Logozzi M, Iessi E, Di Raimo R, Carta F, Supuran CT, Fais S. Natural extracellular nanovesicles and photodynamic molecules: is there a future for drug delivery? *J Enzyme Inhib Med Chem.* 2017 Dec;32(1):908-916. doi: 10.1080/14756366.2017.1335310. Review. PubMed PMID: 28708430; PubMed Central PMCID: PMC6010042. 査読有

8: Nakamura T, Matsumine A, Matsubara T, Asanuma K, Sudo A. Neoplastic fever in patients with bone and soft tissue sarcoma. *Mol Clin Oncol.* 2016 Nov;5(5):631-634. Epub 2016 Sep 21. PubMed PMID: 27900101; PubMed Central PMCID: PMC5103890. 査読有

9: Oi T, Asanuma K, Matsumine A, Matsubara T, Nakamura T, Iino T, Asanuma Y, Goto M, Okuno K, Kakimoto T, Yada Y, Sudo A. STAT3 inhibitor, cucurbitacin I, is a novel therapeutic agent for osteosarcoma. *Int J Oncol.* 2016 Dec;49(6):2275-2284. doi: 10.3892/ijo.2016.3757. Epub 2016 Nov 3. PubMed PMID: 27840900; PubMed Central PMCID: PMC5117998. 査読有

10: Matsumine A, Tsujii M, Nakamura T, Asanuma K, Matsubara T, Kakimoto T, Yada Y, Takada A, Ii N, Nomoto Y, Sudo A. Minimally invasive surgery using intraoperative electron-beam radiotherapy for the treatment of soft tissue sarcoma of the extremities with tendon involvement. *World J Surg Oncol.* 2016 Aug 12;14(1):214. doi: 10.1186/s12957-016-0968-4. PubMed PMID: 27514518; PubMed Central PMCID: PMC4982423. 査読有

11: Teramoto R, Sakata K, Miwa K, Matsubara T, Yasuda T, Inoue M, Okada H, Kanaya H, Kawashiri MA, Yamagishi M, Hayashi K. Impact of Distal Protection with Filter-Type Device on Long-term Outcome after Percutaneous Coronary Intervention for Acute Myocardial Infarction: Clinical Results with Filtrap®. *J Atheroscler Thromb.* 2016 Dec 1;23(12):1313-1323. Epub 2016 Jun 2. PubMed PMID: 27251330; PubMed Central PMCID: PMC5221494. 査読有

12: Asanuma K, Matsumine A, Nakamura T, Matsubara T, Asanuma Y, Oi T, Goto M, Okuno K, Kakimoto T, Yada Y, Sudo A. Impact of plasma fibrinogen levels in benign and malignant soft tissue tumors. *Cancer Biomark.* 2016;16(3):453-8. doi: 10.3233/CBM-160584. PubMed PMID: 27062702. 査読有

〔学会発表〕(計 1 件)

1. 2017.5.10-17 2019 ISOLS Meeting Kanazawa Japan. Multi-institutional Study of a New Limb Salvage Surgery Using Acridine Orange in Patients with Bone and Soft Tissue Sarcomas. Takao Matsubara, Katsuyuki Kusuzaki, Kyoji Okada, Takashi Tsuchiya, Takahiro Goto, Ryu Tsunoda, Hiroyuki Tsuchiya, Tomoki Nakamura

〔図書〕(計 0 件)

〔産業財産権〕

出願状況（計 0 件）

取得状況（計 0 件）

〔その他〕
ホームページ等

科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属されます。