

## 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 25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： 23791635  
 研究課題名（和文） 酸性環境下での発現細胞膜蛋白の解析と磁性体温熱療法による腫瘍標的治療の開発  
 研究課題名（英文） Analysis of tumor protein in acidic condtion and Development of magnetic hyperthermia for tumor acidic target  
 研究代表者  
 浅沼 邦洋（ASANUMA KUNIHIRO）  
 三重大学・大学院医学系研究科・助教  
 研究者番号： 20378285

## 研究成果の概要（和文）：

CAIX（Carbonic Anhydrase）は、酸性環境下における腫瘍細胞に、mRNA、タンパクともに発現が認められたため、腫瘍周囲における酸性環境下でのナノ磁性体やドラッグデリバリーとしての標的分子の候補となった。CAIX 阻害剤による in vivo での抗腫瘍効果も認めたため、CAIX の機能に関係する epitope をもつ抗体が、相乗効果を期待できるのではないかと考えられた。また、骨肉腫細胞 5 種、軟部肉腫細胞 5 種に対する化合物ライブラリーの 320 種の細胞増殖抑制効果の検討を行った。この結果、骨肉腫細胞株 5 種すべてに効果のある 9 薬剤、および、軟部肉腫細胞株すべてに効果のある 4 薬剤を厳選した。これらの薬剤を CAIX を標的としたリポソームに封入し、ドラッグデリバリーとしても利用する予定である。

## 研究成果の概要（英文）：

mRNA expression and protein production of CAIX（Carbonic Anhydrase）was expressed in tumor cells in acidic condtion. CAIX is thought to be one of the target factor for nanomagnetite and drug deliverly in acidic condition around tumor tissues. Additionally, CAIX inhibitors prevented tumor growth in vivo. These leads to the possibility that antibody angainst functional site of CAIX epitope has synergy effect for nanomagnetite and drug delivery. Furthermore, inhibitory effect of cell proliferation was analized using 320 drugs of compound library. 9 drugs for osteosarcomas and 4 drugs for soft tissue sarcomas were selected. Thses slected drugs may be useful for drug delivery by CAIX targeted liposome.

## 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	3,500,000	1,050,000	4,550,000

## 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

悪性腫瘍に対する温熱療法は古くから行われており、悪性腫瘍細胞は 42.5 度以上の加温で死滅できるといわれている。温度を上げれば腫瘍細胞に対する殺傷効果は増強されるが、その反面、正常組織も損傷されやすくなる。そこで、腫瘍を選択的に加温する方法が近年工夫されてきており、その代表的なも

のが、Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub> などの磁性体金属を用いて体外からの磁場照射による発熱効果の利用である。当教室ではすでに転移性骨腫瘍患者に対し、Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub> 含有人工骨やチタン性髄内釘を手術的に転移部局所に挿入し、体外磁場照射による温熱療法を臨床で行っており、良好な成績を報告している（Matsumine, Clin Exp Metastasis 2007）。最近、直径 10-100nm の

Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub> 粒子を含んだ溶液を用いて、腫瘍局所への注入にて磁性体を集積させる方法が注目されつつある。この局所注入は、針により腫瘍細胞を正常組織に散布させたり、巨大腫瘍の場合には腫瘍全体への投与が困難であったりするため、磁性体のデリバリ方法には、腫瘍の栄養血管を介した投与が理想的である。そのためには、腫瘍特異的な抗原やタンパク質の特定が必須である。共同研究者である小林猛らは、Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub> 粒子（ナノ磁性体）をリポソームで包埋した **ML (magnetoliposome)** に、抗体を結合した **AML (Antibody-conjugated magnetoliposome)** を開発し、齧歯類をもちいた in vivo 研究での抗腫瘍効果、さらには Heat Shock Protein を介した免疫系の賦活効果など、多くの業績を残している (Ito, Kobayashi et al. Cancer Immunol Immunother 2006)。この ML は、さまざまな抗体やタンパク質を結合できるため、大きな発展性を有している。しかし、癌ワクチン分野などにおいて腫瘍特異的な抗原の研究は進んでいるが、臨床的に有用な標的因子ははまだ確立されていない。そこで、注目すべき腫瘍の特異的な現象の一つに、腫瘍組織の酸性化がある。腫瘍組織は、正常組織と比較して酸性であるといわれており (Wike-Hooley et al. Radiother Oncol 1984)、当教室においても骨軟部腫瘍を中心とした腫瘍の組織酸性度を測定し、腫瘍組織での酸性化を報告している (Matsubara, Anticancer Res 2006)。腫瘍による酸性化は、腫瘍細胞による糖摂取の著しい増加と嫌気性解糖による乳酸からの H<sup>+</sup> の産生である。悪性細胞の糖摂取の増加は PET-CT での <sup>18</sup>F-FDG (フルオロデオキシグルコース) の集積として実証されており、さらには腫瘍細胞の急速かつ無秩序な増殖による低酸素状態が、糖の嫌気性解糖を亢進させ、H<sup>+</sup> の産生を助長させていると考えられている。このように、悪性腫瘍の酸性化はほぼ一般的な現象であるにもかかわらず、酸性化に注目した有効的な治療法もいまだ開発されていないのが現状である。今回、腫瘍の特異的な現象としての組織酸性度に注目し、酸性下で発現する細胞膜蛋白を標的として、磁性体を血管内投与により腫瘍集積させることで、温熱療法の確立を目的として本研究を計画した。

## 2. 研究の目的

本研究は、悪性腫瘍に対する磁場温熱療法を行うにあたり、磁性体粒子の血管内投与による腫瘍への選択的集積、および磁場照射による抗腫瘍効果を目的とする。悪性腫瘍での組織の酸性化に注目し、酸性環境での細胞膜発現蛋白を腫瘍のみならず正常細胞を含めて解析し、その蛋白を標的分子とした抗体を磁性体粒子に結合させ、血管内投与により腫瘍

に蓄積させることで磁場温熱療法の抗腫瘍効果を目指す。

## 3. 研究の方法

ヒト骨肉腫細胞 (U2OS, MG63) を用いて、酸性環境下における mRNA 発現の検討を行った。その中からターゲットを絞り、タンパク発現を免疫組織学的に検討した。次に、そのターゲットに対する inhibitor を用いて抗腫瘍効果の検討を行い、ターゲットに対する抗体の epitope を考慮するうえで、そのタンパクの機能抑制をする必要性の有無を検討した。また、そのターゲットが機能した場合に、リポソームに封入する薬剤の検討も合わせて行った。化合物ライブラリー (がん支援・化学療法基盤支援活動班の化合物ライブラリー) を用いて、320 種の薬剤の骨肉腫細胞 5 種、軟部肉腫細胞 5 種に対する細胞増殖抑制効果を、MTS assay によってスクリーニングした。

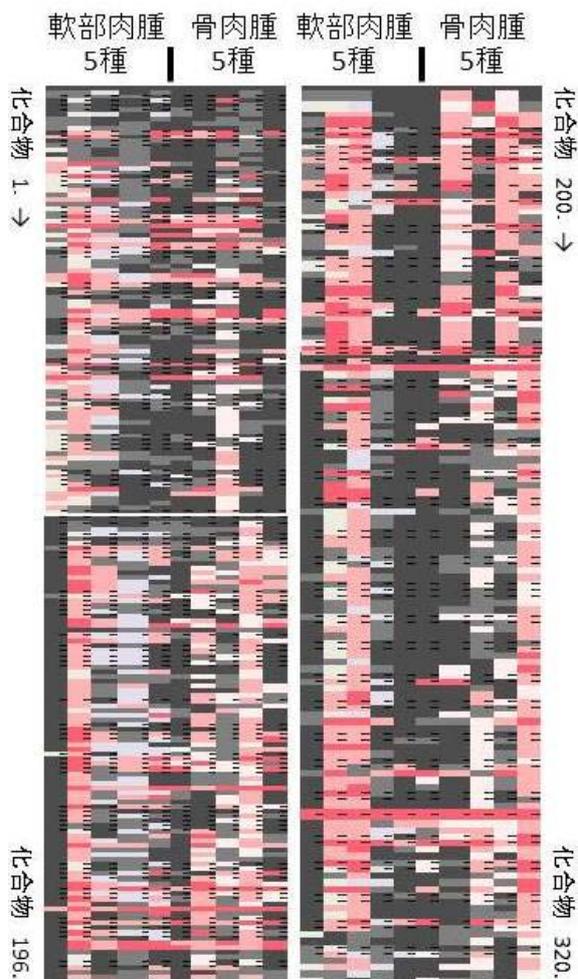
## 4. 研究成果

酸性環境下にて、ヒト骨肉腫細胞 (U2OS, MG63) で発現遺伝子を検討したところ、CAIX、PDGFR、VEGF の遺伝子の発現が増加していた。特に CAIX (Carbonic Anhydrase) は、酸性環境下にて発現誘導される HIF-1 $\alpha$  によって制御されている。しかし今回、酸性環境下にて CAIX mRNA の上昇が PCR にて確認できた。また、蛍光免疫染色にても高率にタンパク発現が認められた。また、CAIX は様々な腫瘍種でも発現が報告されているため、CAIX を腫瘍内における酸性環境下での標的として絞り、以後の研究を進めた。

まず、CAIX の機能抑制は骨肉腫細胞に対しても抗腫瘍効果が期待できるかどうかを検討するため、供与された CAIX に対する阻害剤 3 種の抗腫瘍効果を検討した。マウスに背部皮下に骨肉腫細胞を生着させ、3 種の阻害剤を腫瘍内注入したところ、一部化合物に腫瘍の増大抑制効果を認めた。そのため、CAIX に対する抗体は、CAIX の機能阻害効果も併せ持つ抗体がもっとも望ましく、かつ相乗効果が期待できると考えられた。しかし、集積性と CAIX 阻害効果の両立が得られなければ、集積性の良好な抗体を結合させたりポソームを、ナノ磁性体およびドラッグのデリバリデバイスとして利用をする。

今後、CAIX の腫瘍集積異性を検討するため、市販リポソームに抗 CAIX 抗体を結合させ、マウス皮下に骨肉腫細胞を生着させた後に、リポソームをマウスの尾静脈より注入し、腫瘍への集積を検討する予定である。集積性が良好であった場合、磁性体封入リポソームやドラッグデリバリ用のリポソームに抗体を結合させ、磁性体や薬物の腫瘍への集積を検討する予定である。

また、抗体結合リポソームをドラッグデリバリとして利用する目的で、リポソーム内に封入する薬剤の検討も行った。骨肉腫細胞、軟



部肉腫細胞に対する有効な薬剤を探索するべく、化合物ライブラリー320種の薬剤に対する骨肉腫細胞5種、軟部肉腫細胞5種の細胞増殖抑制効果のスクリーニングを行った。下図のように、50%以上の腫瘍増殖効果を赤、50-20%の増殖抑制効果をピンク、20-10%を白、10%以下を灰色、黒として、クラスタ状に解析した。その結果、20%以上の増殖抑制効果を効果ありとし、骨肉腫細胞株5種すべてに効果のある9薬剤、および、軟部肉腫細胞株すべてに効果のある4薬剤を厳選した。まず、骨肉腫細胞の詳細な解析をおこなった。これらは、現在キードラックになっている ADM、IFO より、高い腫瘍細胞増殖抑制効果を認めた。今後は、これら薬剤の抗腫瘍効果を、in vivo での評価を行い、最終的にはリポソームによるドラッグデリバリーに利用したり、化学療法と温熱療法の併用を目指す予定である。最後に、リポソームによるドラッグデリバリー法は、その表面材質を工夫し、体内の異物補足システムを回避させ、受動的に腫瘍の異常血管から腫瘍に集積させるリポソームも存在する。CAIX 結合リポソームが機能しなかった場合にこのリポソームを利用し、今後の研究を行っていく。

## 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1件)

A novel hyperthermia treatment for bone metastases using magnetic materials. Matsumine A, Takegami K, Asanuma K, Matsubara T, Nakamura T, Uchida A, Sudo A. Int J Clin Oncol. 2011.16(2):101-8

査読あり

〔学会発表〕(計7件)

- ① 11th International Congress of Hyperthermic Oncology. 2012. August 28<sup>th</sup>-September 1<sup>st</sup>. Kyoto. Novel hyperthermia using magnetic materials for metastatic bone tumors. Asanuma K, Matsumine A, Matsubara T, Nakamura T, Takegami K, Uchida A and Sudo A.
- ② 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
- ③ 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
- ④ 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
- ⑤ 第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

- ⑥ 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
- ⑦ 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

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

浅沼 邦洋 (KUNIHIRO ASANUMA)

三重大学・大学院医学系研究科・助教

研究者番号： 20378285

### (2) 研究分担者

( )

研究者番号：

### (3) 連携研究者

小林猛：中部大学応用生物学部 教授

浅沼由美子：国立三重中央病院 医院

林辰弥：三重県立看護大学、教授

岡本貴行：三重大学分子病態学 助教

松原孝夫：三重大学 整形外科 助教

中村知樹：三重大学 整形外科 助教

松峯 昭彦：三重大学 整形外科 准教授

須藤啓広：三重大学 整形外科 教授