

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 6 月 13 日現在

機関番号：14501

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2012～2015

課題番号：24659565

研究課題名(和文)炭酸ガス経皮吸収を用いた骨軟部悪性腫瘍に対する放射線治療の増強効果

研究課題名(英文) Enhancement of the antitumor effect of radiation therapy combined with transcutaneous application of CO₂ in human sarcoma

研究代表者

秋末 敏宏 (Akisue, Toshihiro)

神戸大学・保健学研究科・教授

研究者番号：90379363

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,900,000円

研究成果の概要(和文)：骨軟部腫瘍動物移植モデルにおける炭酸ガス経皮投与と放射線照射による抗腫瘍効果の検討で、2週間の治療終了時、動物腫瘍移植モデル(Nara-H細胞株)の腫瘍体積は、炭酸ガス経皮投与および放射線治療併用群において、コントロール群の28%、放射線治療単独群の47%、炭酸ガス経皮単独投与群の42%と有意に腫瘍の縮小効果を認めた。4群とも体重減少などの治療による副作用は認めなかった。治療終了時に採取した腫瘍細胞において、炭酸ガス経皮投与および放射線治療併用群において、コントロール群、放射線治療単独群、炭酸ガス経皮投与単独群と比較して有意にアポトーシス活性と活性酸素種(ROS)の産生ともに、増加していた。

研究成果の概要(英文)：The purpose of the current study was to evaluate the effects of transcutaneous CO₂ therapy on the antitumor efficacy of X-ray irradiation using MFH. In the in vivo study using an animal model in which MFH cells (Nara-H) were transplanted, tumor volume in the combination group (transcutaneous CO₂+X-ray) was reduced to 28%, 42% and 47% of that in the control, CO₂ alone, and X-ray alone groups respectively. Apoptotic activity and ROS production in the combination group were strongly increased with decreasing HIF-1 expression relative to the control, CO₂ and X-ray groups. The transcutaneous CO₂ system enhanced the antitumor action of X-ray irradiation and could be a novel therapeutic tool for overcoming radioresistance in human malignancies.

研究分野：整形外科学

キーワード：骨軟部腫瘍 放射線治療 炭酸ガス

1. 研究開始当初の背景

骨軟部悪性腫瘍は骨軟部に発生する悪性腫瘍であり、10 万～20 万人に 1 人程度と罹病率の極めて低い疾患である。治療法として手術的加療を中心に、化学療法および放射線治療を合わせた集学的治療が行なわれるが、腫瘍組織型が多様で発生部位も多彩であることから確立された治療法は一部の組織像を示す腫瘍以外に存在していない。骨軟部悪性腫瘍に対する補助療法である放射線治療の奏効率は低く、化学療法による治療効果も非常に乏しいものであり、切除不能の進行症例や再発、遠隔転移症例においては予後不良となることが頻繁にみられる。手術侵襲の縮小化や再発、転移を予防する観点から有効かつ副作用の少ない補助療法の確立は必要不可欠である。放射線治療の有効性を妨げる因子として腫瘍内の低酸素環境が重要であることが古くから知られている¹。また低酸素環境下においては悪性腫瘍細胞の悪性度が増強することも知られている^{2,3}。低酸素環境からの改善によって放射線治療の感受性が増強することも報告されており⁴、これまで様々な低酸素細胞放射線増感剤が開発、研究されてきたが、著しい効果は得られず、薬剤による副作用も多く報告されている。酒井らは炭酸ガス経皮投与が投与局所において副作用なく Bohr 効果による酸素分圧上昇を起こすことを明らかとし、報告した⁵。我々はこの手法に着目し、炭酸ガス経皮投与が腫瘍局所における低酸素環境を改善することで放射線治療感受性を増強させると確信し、骨軟部悪性腫瘍に対する革新的な治療法になり得ると考え本研究を立案した。

2. 研究の目的

(1) 骨軟部悪性腫瘍の放射線治療抵抗性に低酸素環境が寄与していると考えられているが、低酸素環境および通常の酸素環境、低酸素環境から通常酸素環境への変化により骨軟部腫瘍細胞の増殖・転移能がどのような影響を受けるか、さらに放射線照射の効果に対する酸素環境の影響を評価することである。

(2) 炭酸ガス経皮投与による放射線治療感受性および治療効果の増強について、元来放射線治療が有効とされていない骨軟部悪性腫瘍の動物腫瘍移植モデルを対象として評価すること、またそのメカニズムを解明することである。

3. 研究の方法

(1) 骨軟部悪性腫瘍細胞株に対する至適放射線照射量の決定：使用する骨軟部悪性腫瘍細胞株 (Nara-H, TNMY-1, Nara-F, GBS-1) に対して細胞培養系で放射線照射を行い、至適放射線照射量の決定を行った。X 線照射装置である日立メディコ製 X 線発生装置 (型式 MBR-1505R2) を用いた。

(2) 骨軟部悪性腫瘍細胞株に対する放射線照射効果への酸素環境の影響評価：(1) に使用した細胞株のうち、Nara-H を用いて、低

酸素環境 (1%酸素 5%二酸化炭素, 94%窒素, 48 時間培養)、通常酸素環境 (20%酸素 5%二酸化炭素, 75%窒素, 48 時間培養)、再酸素化環境 (1%酸素 5%二酸化炭素, 94%窒素, 24 時間培養後, 20%酸素 5%二酸化炭素, 75%窒素, 24 時間培養) の 3 条件を設定し、24 時間培養後に 3.2Gy の放射線照射を行った後、さらに 24 時間培養した。培養細胞のアポトーシス活性、活性酸素種 (ROS) をフローサイトメトリー (FACS) にて解析した。

(3) 骨軟部腫瘍動物移植モデルにおける炭酸ガス経皮投与と放射線照射による抗腫瘍効果の検討：骨軟部悪性腫瘍細胞株 (Nara-H) をヌードマウスの背部皮下に接種し、腫瘍モデルマウスを作成した。腫瘍モデルマウスをランダムにコントロール群、放射線治療群、炭酸ガス経皮投与群、炭酸ガス経皮投与および放射線治療併用群の 4 群、各 6 匹に分け実験を行った。腫瘍移植後 3 日後より治療を開始した。治療期間は 2 週間を予定とし、治療は放射線治療、炭酸ガス経皮投与ともに週 2 回、計 4 回を以下の方法で行った。

放射線 1 回照射量 1 回 0.8 Gy (合計 3.2Gy) 照射した。炭酸ガス経皮投与は 1 回 10 分、週 2 回行った。炭酸ガス経皮投与および放射線治療併用群では炭酸ガス経皮投与を行い、直後に放射線照射を行った。腫瘍に対する治療効果の評価は経時的な腫瘍サイズを測定、2 週間の治療終了後に腫瘍モデルマウスを屠殺し、腫瘍組織細胞のアポトーシス活性、活性酸素種 (ROS) をフローサイトメトリー (FACS) にて解析、さらにアポトーシス関連蛋白 (カスパーゼ 3, PARP, p38 など) をウエスタンブロッティングにて解析した。

4. 研究成果

(1) 骨軟部悪性腫瘍細胞株に対する至適放射線照射量：

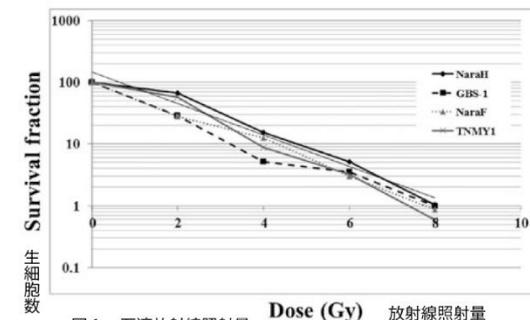


図 1. 至適放射線照射量

4 種の骨軟部悪性腫瘍細胞株 (Nara-H, TNMY-1, Nara-F and GBS-1) のうち、Nara-H が最も放射線抵抗性があり、50%増殖抑制は 3.2Gy であった。

(2) 骨軟部悪性腫瘍細胞株に対する放射線照射効果への酸素環境の影響評価：

低酸素環境下にて活性化される蛋白である HIF1 の蛋白発現をウエスタンブロットにて評価したところ、低酸素環境で最も発現が強く、再酸素化環境、通常酸素環境の順に発

現が低下していた。さらに 図2 に示す通り、低酸素環境下では骨軟部悪性腫瘍細胞株 (Nara-H) に対して、放射線照射によりアポトーシスが活性化されなかった。一方、通常酸素環境および再酸素化環境においては放射線照射によるアポトーシスが活性化された。同時に活性酸素種 (ROS) が通常酸素環境および再酸素化環境においては放射線照射により有意に増加した。しかし低酸素環境下では活性酸素種 (ROS) は、放射線の照射有無にかかわらず変化がなかった。

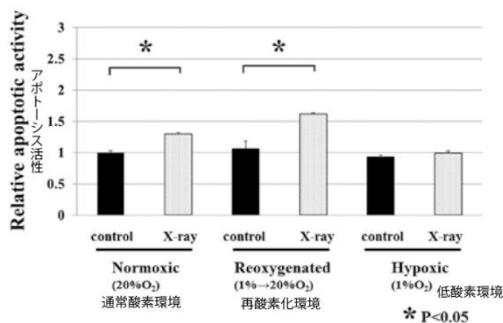


図2. 酸素環境と放射線効果

アポトーシス関連蛋白の発現解析では、カスパーゼ 3 および PARP の活性化が、通常酸素環境および再酸素化環境において、放射線照射により有意な活性化が見られたが、低酸素環境においては放射線照射による活性化を認めなかった。さらに、アポトーシス活性化を制御する分子である p38 や JNK 経路は通常酸素環境および再酸素化環境において、放射線照射により有意な活性化が認められた。

(3) 骨軟部腫瘍動物移植モデルにおける炭酸ガス経皮投与と放射線照射による抗腫瘍効果の検討:

図3 に示す通り、2 週間の治療終了時、動物腫瘍移植モデル(Nara-H 細胞株)の腫瘍体積は、炭酸ガス経皮投与および放射線治療併用群において、コントロール群(放射線治療なし、炭酸ガス経皮投与なし)の 28%、放射線治療単独群の 47%、炭酸ガス経皮単独投与群の 42%と有意に腫瘍の縮小効果を認めた。4 群とも体重減少などの治療による副作用は認めなかった。

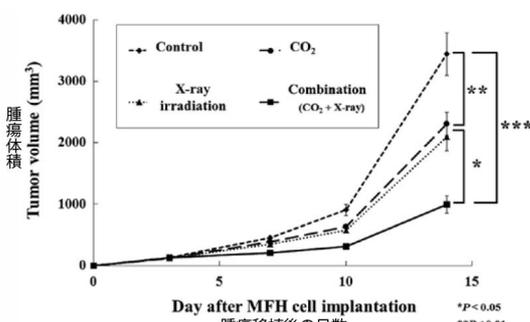


図3. 炭酸ガス経皮投与と放射線照射の抗腫瘍効果

治療終了後に採取した腫瘍組織細胞において、アポトーシス活性と活性酸素種 (ROS) の産生を検討したところ、炭酸ガス経皮投与

および放射線治療併用群において、コントロール群、放射線治療単独群、炭酸ガス経皮投与単独群と比較して有意にアポトーシス活性と活性酸素種 (ROS) の産生ともに、増加していた。炭酸ガス経皮投与単独群においては、活性酸素種 (ROS) の産生が認められなかった。一方、炭酸ガス経皮投与および放射線治療併用群および放射線治療単独群では、活性酸素種 (ROS) の産生増加とアポトーシス活性に有意な相関関係が認められた。

さらに、アポトーシス関連蛋白の発現解析では、カスパーゼ 3 および PARP の活性化が、炭酸ガス経皮投与および放射線治療併用群において、他の 3 群と比較して有意に増加しており。また、アポトーシス活性化を制御する分子である p38 や JNK 経路も炭酸ガス経皮投与および放射線治療併用群において、他の 3 群と比較して有意な活性化が認められた。これは炭酸ガス経皮投与および放射線治療併用群において、低酸素環境下にて活性化される蛋白である HIF1 の蛋白発現が低下していることを確認しており、炭酸ガス経皮投与および放射線治療併用群において低酸素環境から酸素環境が変化したことによる影響であることが示唆された。

<引用文献>

- Thomlinson RH, et al. The histological structure of some human lung cancers and the possible implications for radiotherapy. *Br J Cancer*. 1955;9: 539-549.
- Pennacchietti S, et al. Hypoxia promotes invasive growth by transcriptional activation of the met protooncogene. *Cancer Cell*. 2003;3: 347-361.
- Rofstad EK. Microenvironment-induced cancer metastasis. *Int J Radiat Biol*. 2000;76: 589-605.
- Hartmann KA, et al. Enhancement of radiosensitivity of rat rhabdomyosarcoma R1H with normobaric carbogen and hyperbaric oxygen (HBO) using conventionally fractionated irradiation. *Br J Radiol*. 1998 Apr;71(844): 433-437.
- Sakai Y, et al. A novel system for transcutaneous application of carbon dioxide causing an "artificial bohr effect" in the human body. *PLoS One*. 2011;6(9): e24137.
- Oe K, et al. The effect of transcutaneous application of carbon dioxide (CO₂) on skeletal muscle. *Biochem Biophys Res Commun*. 2011 Apr 1;407(1): 148-152.

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 4 件)

Takeda D, Hasegawa T, Ueha T, Imai Y, Sakakibara A, Minoda M, Kawamoto T, Minamikawa T, Shibuya Y, Akisue T, Sakai Y, Kurosaka M, Komori T. Transcutaneous carbon dioxide induces mitochondrial apoptosis and suppresses metastasis of oral squamous cell carcinoma in vivo. PLoS One. 査読有. 9:2014,e100530. doi: 10.1371/journal.pone.0100530. eCollection 2014.

Onishi Y, Akisue T, Kawamoto T, Ueha T, Hara H, Toda M, Harada R, Minoda M, Morishita M, Sasaki R, Nishida K, Kuroda R, Kurosaka M. Transcutaneous application of CO2 enhances the antitumor effect of radiation therapy in human malignant fibrous histiocytoma. Int J Oncol. 査読有. 45:2014,732-8. doi:10.3892/ijo.2014.2476.

Ueshima E, Yamaguchi M, Ueha T, Muradi A, Okada T, Idoguchi K, Sofue K, Akisue T, Miwa M, Fujii M, Sugimoto K. Inhibition of growth in a rabbit VX2 thigh tumor model with intraarterial infusion of carbon dioxide-saturated solution. J Vasc Interv Radiol. 査読有. 25:2014, 469-76. doi: 10.1016/j.jvir.2013.11.023.

秋末 敏宏, 大西 康央, 河本 旭哉, 上羽 岳志, 原 仁美, 戸田 光紀, 原田 理沙, 酒井 良忠, 黒坂 昌弘. 炭酸ガス経皮投与治療を用いた骨・軟部肉腫に対する新しい治療法. オルソタイムス. 査読無. 7, 2013:2.

〔学会発表〕(計 5 件)

上羽 岳志, 酒井 良忠, 河本 旭哉, 大西 康央, 原田 理沙, 蓑田 正也, 戸田 光紀, 原 仁美, 黒坂 昌弘, 秋末 敏宏. 悪性腫瘍の炭酸ガス経皮吸収の感受性の差異の検討. 第30回日本整形外科学会基礎学術集会. 2015年10月22日~10月23日, 富山国際会議場(富山県・富山市)

秋末 敏宏. 骨軟部腫瘍の診療と研究 - bedside と bench での我々の挑戦 -. 第34回静岡骨軟部腫瘍研究会(招待講演). 2015年9月26日, 静岡もくせい会館(静岡県・静岡市)

秋末 敏宏. 軟部腫瘍の診断と治療-外来診療から新規治療の研究まで-. 第4回播磨臨床整形外科研究会(招待講演). 2015年08月29日, ホテル日航姫路(兵庫

県・姫路市)

大西 康央, 秋末 敏宏, 河本 旭哉, 原 仁美, 黒坂 昌弘. 炭酸ガスと放射線併用医療法による骨軟部肉腫に対する新しい治療法戦略の確立. 第122回中部日本整形外科災害外科学会. 2014年04月11日~4月12日, 岡山コンベンションセンター(岡山県・岡山市)

Onishi Y, Kawamoto T, Ueha T, Hara H, Toda M, Harada R, Minoda M, Morishita M, Kurosaka M, Akisue T. The effects of reoxygenation using a novel CO2 therapy on radiosensitivity in human malignant fibrous histiocytoma cells. 8th Combined Meeting of the Orthopaedic Research Societies, 2013年10月12日~10月16日, Venice (Italy).

〔産業財産権〕

取得状況(計 1 件)

名称: 二酸化炭素を有効成分とする抗腫瘍剤

発明者: 秋末敏宏、三輪雅彦

権利者: ネオケミア(株), CO2BE ME (株)

種類: 特許

番号: 第 5626299 号

取得年月日: 2015 年 02 月 20 日

国内外の別: 国内

6. 研究組織

(1) 研究代表者

秋末 敏宏 (AKISUE, Toshihiro)

神戸大学・大学院保健学研究科・教授

研究者番号: 9 0 3 7 9 3 6 3

(2) 研究分担者

河本 旭哉 (KAWAMOTO, Teruya)

神戸大学・大学院医学研究科・助教

研究者番号: 3 0 4 2 0 5 5 8

原 仁美 (HARA, Hitomi)

神戸大学・医学部付属病院・助教

研究者番号: 3 0 4 2 0 5 5 8