

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 6 月 10 日現在

機関番号：16101

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2014～2015

課題番号：26861196

研究課題名(和文) V型ATPaseにより形成される酸性環境を標的とした肉腫新規治療の開発

研究課題名(英文) New sarcoma therapy targeted to acidic microenvironment created by Vacuolar H⁺-ATPase (V-ATPase)

研究代表者

西庄 俊彦 (NISHISHO, Toshihiko)

徳島大学・大学院医歯薬学研究部・講師

研究者番号：40444723

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)：酸性環境が肉腫細胞に及ぼす影響について検討した。脂肪肉腫細胞株(SW872)をpH6.4およびpH7.4で調節したメEDIUMでそれぞれ培養した結果、酸性環境下でSW872は浸潤能、増殖能ともに増加した。次に酸性環境を形成する重要な因子としてプロトンポンプであるV型ATPase (V-ATPase)に注目した。脂肪腫(良性)と脱分化型脂肪肉腫(悪性)でV-ATPaseのmRNAの発現を比較したところ、脱分化型脂肪肉腫においてアイソフォーム $\alpha 3$, E2, F, G2, Hの発現が高いことが明らかとなった。

研究成果の概要(英文)：To examine whether acidic microenvironment promote sarcoma activity, SW872 liposarcoma cells were cultured in pH7.4 or pH 6.4 medium. SW872 cells treated with acidic medium (pH 6.4) showed increased invasion and proliferation activity. Next, We investigated expression of the vacuolar-type H-ATPase (V-ATPase) which has been shown to cause extracellular acidification by pumping protons. The isoform of $\alpha 3$, E2, F, G2, H were increased in liposarcoma (malignant tumor) compared by lipoma (benign tumor).

研究分野：骨・軟部腫瘍

キーワード：酸性環境 肉腫 V型ATPase

1. 研究開始当初の背景

近年の肉腫に対する治療は、適切な切除縁の確保による広範切除、処理骨やマイクロサージャリーによる再建方法の発達など革新的な進歩を遂げており、原発腫瘍の除去に対する成功率は著しく向上した。しかし、多臓器への遠隔転移に対するコントロールはいまだ不良で、原発腫瘍の除去が完全になされても、悪性化した細胞の臓器への転移により患者は死亡する。従って切除不能肉腫や転移症例に対しては新たな治療法の開発が最重要課題であるといえる。

さて、古くより悪性腫瘍組織においては pH が低下し、酸性環境が形成されることが知られている。(Engin K et al. Int J Hyperthermia 1995)。この酸性環境は悪性腫瘍にとって重要な微小環境と推察されている。

我々は酸性環境を形成する重要な因子として V 型 ATPase に注目した。V 型 ATPase は約 13 種類のサブユニットから構成されるプロトンポンプで、生体膜に存在し、プロトン輸送を介して細胞内外の酸性環境の形成に関与する。V 型 ATPase の生物学的機能は未だ十分に理解されていないが、悪性腫瘍組織の細胞外 pH は酸性であること、酸性環境が腫瘍の増殖、浸潤、転移に関与することなどが示されており、がんの進展との関連が示唆されているものの、詳細はほとんど不明である。

肉腫においては腫瘍内 pH が良性腫瘍と比べて低く、酸性環境が形成されていることが報告されている (Matsubara T et al. Anticancer res 2006)。一方なぜ酸性環境が形成されているのか、酸性環境がどのような影響を与えているのかについては明らかとなっていない。また V 型 ATPase アイソフォームと肉腫との関連性に着目した研究は無く、このメカニズムの解明により新たな治療方法の開発につながる可能性がある。

2. 研究の目的

肉腫における酸性環境の役割を解明し、新たな治療を開発すること。

3. 研究の方法

(1) 酸性環境が肉腫に与える影響を検討する目的で、ヒト脱分化型脂肪肉腫細胞株 SW872 を用いて酸性環境下と中性環境下で培養を行い、MMT assay, wound healing assay, invasion assay により増殖能、運動能、浸潤能をみた。

(2) 肉腫における V 型 ATPase の役割について検討した。徳島大学倫理委員会の承認を得た上で、同意が得られた症例の切開生検時または広範切除時に保存しておいた組織を用いて、実際の検体における V 型

ATPase の発現をみた。さらに脂肪肉腫組織での V 型 ATPase の発現局在をみた。

4. 研究成果

(1) 酸性環境が肉腫に与える影響

酸性環境が肉腫に与える影響をしらべる目的で、ト脱分化型脂肪肉腫細胞株 SW872 を用いて酸性環境下 (pH6.4) と中性環境下 (pH7.4) で培養を行った。

HEPES buffer が入った培養液に塩酸で pH を調節した培養液を用いて 24 時間培養し、浸潤能を invasion assay を用いて検討した。N=2 であったため、有意差は出していないが、pH6.4 の酸性環境下で培養した SW872 で浸潤能が高い傾向にあった (図 1)。続いて WST-1 assay を用いて 24 時間後の増殖能をみた (proliferation assay) が、有意な差はなかった (図 2)。また migration assay (in vitro wound healing assay) をもちいて移動能をみたが、pH の差による明らかな差は見いだせなかった (図 3)。

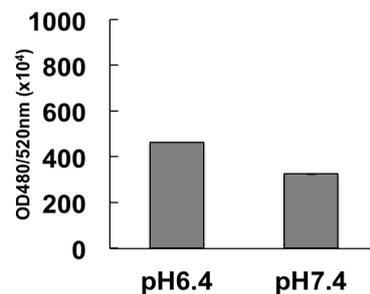


図 1 invasion assay (n=2)

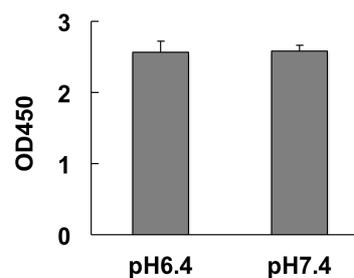


図 2 proliferation assay (n=4)

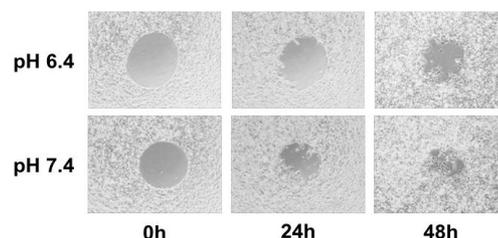


図 3 migration assay

一方、塩酸による調節では塩酸自身による細胞障害の可能性が否定できなかった。このため、MES buffer を用いて pH6.4 に調節した培養液で 24 時間培養し、invasion assay と proliferation assay を行った。その結果、pH6.4 の酸性環境で浸潤能、増殖能ともに増強した（図 4、図 5）。Migration assay は施行できていないが、今後行う予定である。

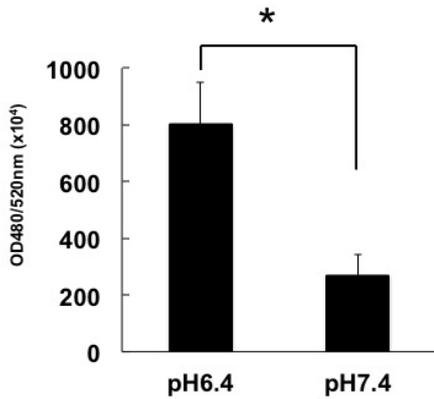


図 4 MES buffer 下の invasion assay (n=6)

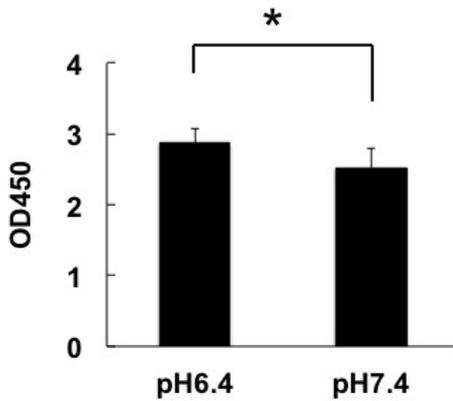


図 5 MES buffer 下の proliferation assay (n=6)

(2) V 型 ATPas の肉腫における役割

肉腫における V 型 ATPase の役割について検討した。V 型 ATPas は V1 ドメインと V0 ドメインから構成され、あわせて 13 種類のサブユニットから形成されている。脂肪腫(lipoma)と脱分化型脂肪肉腫脂肪肉腫(dedifferentiated liposarcoma: DDLS)におけるアイソフォーム含む全てのサブユニットの発現を検討した（図 6）。その結果、DDLS において a1, a3, A, E2, F, G2, H の発現が高かった。

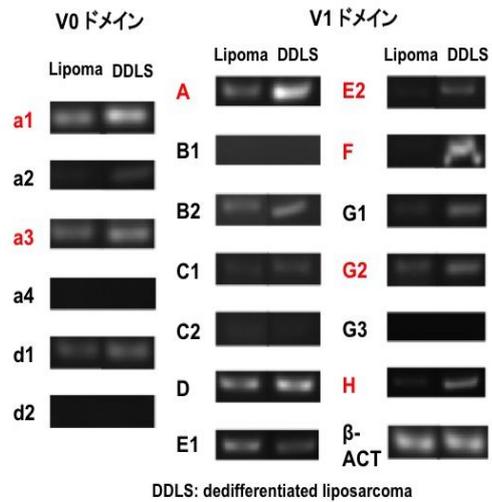


図 6 V 型 ATPase の脂肪腫 (lipoma) と脂肪肉腫 (DDLS) の発現の違い

さらに a3, A, E2, F, G2, H に対して real-time PCR を行ったところ、A3, E, F, G2, H の発現が脂肪肉腫組織において高かった（図 7）。

また、脱分化型脂肪肉腫組織の免疫染色を行ったところ、a3 の発現を認めた（図 8）。

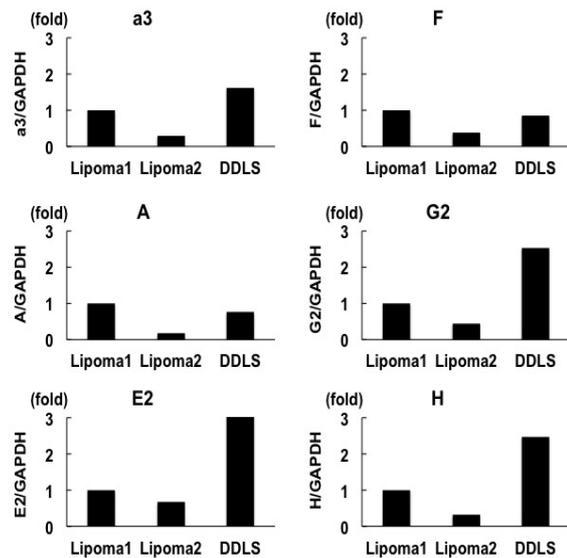


図 7 real-time PCR

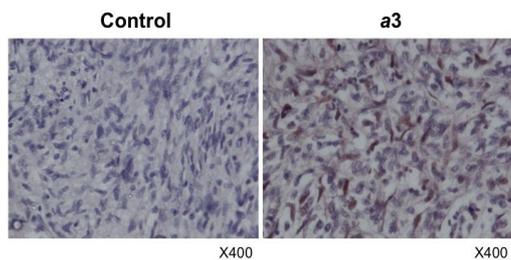


図 8 脱分化型脂肪肉腫組織での a3 の発現

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)

[学会発表](計2件)

宮城亮 西庄俊彦、土岐俊一、西良浩一
肉腫におけるプロトンポンプ V 型
ATPase の役割、第 30 回 日本整形外科
学会基礎学術集会、2015 年 10 月 22-23
日、富山国際会議場(富山県富山市)

宮城亮 西庄俊彦、土岐俊一、西良浩一
肉腫におけるプロトンポンプ V 型
ATPase の役割、第 125 回中部日本整形
外科災害外科学会、2015 年 10 月 2-3 日、
ウインクあいち(愛知県名古屋市)

6. 研究組織

(1)研究代表者

西庄 俊彦 (NISHISHO, Toshihiko)
徳島大学・大学院医歯薬研究部・講師
研究者番号：40444723

(2)研究分担者

(3)連携研究者