Kobe University Repository : Kernel

PDF issue: 2025-07-11

Reoxygenation using a novel CO[2] therapy decreases the metastatic potential of osteosarcoma cells

Harada, Risa

(Degree)
博士（医学）
(Date of Degree)
2014-03-25
(Resource Type)
doctoral thesis
(Report Number)
甲第6000号
(URL)
https://hdl.handle.net/20.500.14094/D1006000

※ 当コンテンツは神戸大学の学術成果です。無断複製・不正使用等を禁じます。著作権法で認められている範囲内で、適切にご利用ください。

（課程博士関係）

学 位 論 文 の 内 容 要 旨

Reoxygenation using a novel CO_2 therapy decreases the metastatic potential of osteosarcoma cells

炭酸ガス経皮吸収による低酸素環境の改善は骨肉腫細胞の転移能を抑制する

神戸大学大学院医学研究科医科学専攻
整形外科学
（指導教員：黒坂昌弘教授）

原田　理沙

要旨

はじめに

骨肉腫は若年者に好発する最も頻度の高い原発性骨悪性腫瘍である．手術および化学療法の進歩により，近年の 5 年生存率は 70%を越えている．しかし，肺転移を有する患者における 5 年生存率は 30%程度と芳しくなく，肺転移の制御については現在でも新たな治療法の探求が必要である．腫瘍細胞の浸潤，転移には，matrix metalloproteinase (MMP)-2 および 9 の関与が古くから知られており，多くの悪性腫瘍にみられる低酸素環境では腫瘍細胞内の MMP-2 および 9 が活性化されること，低酸素環境においては MMP を介した腫瘍細胞の浸潤，転移能の亢進がみられ，腫瘍の悪性化に寄与することが多く報告されている．
炭酸ガス治療として，ヨーロッパでは古くより炭酸泉が，心，皮膚疾患に有用な治療法として使用されており，治療局所の血流および微小循環の増加，血管新生，ボーア効果による局所酸素濃度の増加によって，その効果を生じると言われている．我々は以前に，ラットに炭酸ガスを経皮吸収させることにより，筋組織内の Peroxisome proliferator-activated receptor gamma coactivator-1 alpha (PGC-1α□の発現が増強し，ミトコンドリア量が増加することを示し，炭酸ガス経皮吸収が投与局所で PGC-1α の発現を介したミトコンドリア生合成を賦活化することを明らかにした．また，代表的な高悪性度の骨軟部肉腫である悪性線維性組織球腫(MFH)由来細胞株に対して，炭酸ガス経皮吸収がミトコンドリア系アポトーシスを誘導し，抗腫瘍効果を示すことを報告し，さらに同細胞において Hypoxia inducible factor-1 alpha (HIF-1α)を低下させ，化学療法や放射線感受性を増強させることを明らかにした．
以上，これまでの我々の研究結果から，炭酸ガス経皮吸収が MFH と同様に骨肉腫においても抗腫瘍効果を示すのではないか，さらに，低酸素環境を改善することで HIF-1α の発現を低下させ，肺転移能を低下させるのではないかという仮説を立て，本研究を行った．本研究では，炭酸ガス経皮吸収による低酸素環境の改善が骨肉腫の皮下移植腫瘍および肺転移能に与える影響について，ヌードマウス皮下移植モデルを用いて検討した．

対象と方法

マウス高肺転移性骨肉腫株における低酸素環境の変化に伴う HIF-1α，MMP-2・9 の発現変化の検討　in vitro

マウス高肺転移性骨肉腫細胞株 LM8 を，①酸素濃度 20%の通常環境下で 48 時間培養，②酸素濃度 1%の低酸素環境で 24 時間培養後，酸素濃度 20%の通常環境下で 24 時間培養，③酸素濃度 1%の低酸素環境のみで 48 時間培養，の 3 つの環境下で培養し，HIF-1α，MMP-2・9 の発現について，Real time PCR，FACS を用いて遺伝子レベル，蛋白レベルで定量的に検討した．

高肺転移性骨肉腫モデルマウスの作成と炭酸ガス経皮吸収

LM8 細胞株(1.0×106 細胞)をヌードマウスの背部皮下に移植してモデルマウスを作成し，炭酸ガス投与群，コントロール群の 2 群に分けた．移植 3 日目後より炭酸ガス経皮吸収(100%CO2 を使用．コントロール群には空気を投与)を開始した．治療は 1 回 10 分間，週 2 回行い，腫瘍サイズと体重を定期的に計測した．移植後 3 週でマウスから腫瘍と肺を採取した．

腫瘍内の低酸素環境の評価

腫瘍内の低酸素環境について Hypoxyprobe-1 Kit と炭酸脱水酵素(carbonic anhydrase; CA-IX)の免疫染色を用いて評価した．

肺転移についての検討

各治療群の肺組織標本に H-E 染色を行い，肺転移面積について NIH image J を用いて解析，評価した．

皮下移植腫瘍における MMP-2・9 の mRNA 発現についての検討

各治療群の皮下移植腫瘍組織における MMP-2・9 の mRNA 発現について Real time PCR 法を用いて定量的な解析を行った．

皮下移植腫瘍における HIF-1α，MMP-2・9 の蛋白発現についての検討

各治療群の皮下移植腫瘍組織における HIF-1α，MMP-2・9 の蛋白発現について FACS と免疫染色を用いて評価した．

皮下移植腫瘍におけるアポトーシス活性についての検討

各治療群の皮下移植腫瘍組織におけるアポトーシスの評価を行うため，DNA-断片化について APO-DIRECT Kit を用いた蛍光免疫染色と FACS を，アポトーシス関連蛋白である活性型 Caspase-3・9，PARP の発現について Western blot 法で評価した．

統計学的解析

2 群間の比較には t 検定を用い，多群間の比較には ANOVA, post hoc 検定を用いた．$p<0.05$ を統計学的に有意とした．

結果

In vitro での低酸素環境の改善は，LM-8 骨肉腫細胞における HIF-1α および MMP-2・9 の発現を有意に抑制した

通常酸素環境で培養した細胞と比較して，低酸素環境のみで培養した細胞では，HIF-1α および MMP-2・9 の有意な発現増強をみとめた．低酸素環境から通常の酸素環境に戻して培養した細胞では通常酸素環境で培養した細胞と同程度の発現であった．この結果から LM8 細胞において低酸素環境では腫瘍の浸潤，転移に重要である HIF-1α および MMP-2・9 の発現が増強し，酸素環境を改善することでその発現が抑制されることが明らかとなった．

炭酸ガス経皮吸収は骨肉腫細胞のアポトーシスを誘導し，腫瘍増大を有意に抑制した

モデルマウスを用いて炭酸ガス経皮吸収が骨肉腫皮下移植腫瘍の増殖能に与える影響について検討したところ，炭酸ガス投与群では腫瘍増大を有意に抑制した．マウス体重には両群間で有意差はなかった．摘出腫瘍の検討では，炭酸ガス投与群では腫瘍内の DNA 断片化が蛍光免疫染色，FACS ともに著明であり，また活性型 Caspase-3・9 および PARP の発現増強をみとめた．以上から炭酸ガス経皮吸収が骨肉腫皮下移植腫瘍内でアポトーシスを亢進させ，腫瘍増大を抑制したと考えられた．

炭酸ガス経皮吸収は骨肉腫細胞の低酸素環境を改善し，腫瘍内の HIF-1α，MMP-2・9 の発現を抑制し，肺転移を抑制した

さらに炭酸ガス経皮吸収による骨肉腫皮下移植腫瘍の低酸素環境への影響と肺転移に対する影響について検討した．皮下移植腫瘍における Hypoxyprobe-1 と CA IX の免疫染色を行ったところ，コントロール群と比較して炭酸ガス投与群ではその発現が弱く，炭酸ガス経皮吸収によって皮下移植腫瘍内の低酸素環境が改善されていることを示した．また炭酸ガス投与群では HIF-1α および MMP-2・9 の発現が Real time PCR，FACS，免疫染色のいずれにおいても抑制されており，また HIF-1α と MMP-2・9 それぞれの共陽性細胞数も有意に減少していた．肺組織の検討では炭酸ガス投与群において肺転移面積が有意に小さかった．肺重量もコントロール群よりも有意に軽く，正常肺と同程度であった．以上から炭酸ガス経皮吸収は骨肉腫皮下移植モデルにおいて HIF-1α と MMP-2・9 の発現を抑制し，肺転移を抑制したことが明らかとなった．

考察

骨肉腫患者の予後にとって，肺転移の有無は非常に重要であり，その抑制は予後改善に大きな影響を与える．骨肉腫を含めた多くの悪性腫瘍において，腫瘍内は低酸素環境にあることが報告されており，腫瘍内低酸素環境によって活性化する HIF-1αが腫瘍の転移や悪性化に寄与することが知られている．また，MMP 群，特に MMP-2 および MMP-9 は腫瘍細胞の浸潤や転移を促進することが知られている．過去の報告では，子宮がんや乳がんなどの悪性腫瘍で，HIF-1αの発現を低下させると MMP-2 および 9 の発現が低下する，あるいは HIF-1αの発現を低下させた細胞株をマウスに移植すると，移植腫瘍の成長が有意に抑制される，など，低酸素環境を改善することで抗腫瘍効果が得られるということは明らかにされているが，腫瘍内低酸素環境そのものを改善する方法についての報告はなかった．

本研究の結果から炭酸ガス経皮吸収は骨肉腫腫瘍内の低酸素環境を改善し，HIF-1α，MMP-2・9 の発現を抑制することで，肺転移を抑制することが示された．また，過去に我々が MFH において報告したように，骨肉腫についてもアポトーシスを誘導し抗腫瘍効果を示すことが明らかとなった．さらなる検討が必要と考えられるが，我々の炭酸ガス経皮吸収は骨肉腫に対して有効な治療法の一つとなる可能性があることが示唆された．

神戸大学大学院医学(系)研究科（博士課程）

論文審査の結果の要旨

受付番号	甲　第２３９１号	氏　名	原田　理沙
論文題目 Title of Dissertation	Reoxygenation using a novel CO_2 therapy decreases the metastatic potential of osteosarcoma cells 炭酸ガス経皮吸収による低酸素環境の改善は骨肉腫細胞の転移能を抑制する		
審査委員 Examiner	主　査　横崎　宏 Chief Examiner 副　査　錦織　千佳子 Vice-examiner 副　査　青井　貴之 Vice-examiner		

（要旨は１，０００字～２，０００字程度）

骨肉腫は若年者に好発する最も頻度の高い原発性骨悪性腫瘍である。手術および化学療法の進歩により、近年の5年生存率は70%を越えている。しかし、肺転移を有する患者における5年生存率は30%程度と芳しくなく、肺転移の制御については現在でも新たな治療法の探求が必要である。腫瘍細胞の浸潤、転移には、matrix metalloproteinase (MMP)-2および-9の関与が古くから知られており、多くの悪性腫瘍にみられる低酸素環境では腫瘍細胞内のMMP-2および-9が活性化されること、低酸素環境においてはMMPを介した腫瘍細胞の浸潤、転移能の亢進がみられ、腫瘍の悪性化に寄与することが多く報告されている。炭酸ガス治療として、ヨーロッパでは古くより炭酸泉が、心、皮膚疾患に有用な治療法として使用されており、治療局所の血流および微小循環の増加、血管新生、ボーア効果による局所酸素濃度の増加によって、その効果を生じると言われている。申請者の所属する研究室では以前にラットに炭酸ガスを経皮吸収させることにより、筋組織内のPeroxisome proliferator-activated receptor gamma coactivator-1 alpha (PGC-1α)の発現が増強し、ミトコンドリア量が増加することを示し、炭酸ガス経皮吸収が投与局所でPGC-1αの発現を介したミトコンドリア生合成を賦活化することを明らかにした。また、代表的な高悪性度の骨軟部肉腫である悪性線維性組織球腫(MFH)由来細胞株に対して、炭酸ガス経皮吸収がミトコンドリア系アポトーシスを誘導し、抗腫瘍効果を示すことを報告し、さらに同細胞においてHypoxia inducible factor-1 alpha (HIF-1α)を低下させ、化学療法や放射線感受性を増強させることを明らかにした。これらの研究結果をもとに本研究では、炭酸ガス経皮吸収が骨肉腫においてもMFHと同様に抗腫瘍効果を示すのではないか、さらに、低酸素環境を改善することでHIF-1αの発現を低下させ、肺転移能を低下させるのではないかという仮説を立て、炭酸ガス経皮吸収による低酸素環境の改善が骨肉腫の皮下移植腫瘍および肺転移能に与える影響について、マウス高肺転移性骨肉腫細胞株LM8を用いて試験管内およびヌードマウス皮下移植モデルを用いて検討した。

得られた研究成果は以下のごとくである。

（1）通常酸素環境で培養した骨肉腫細胞と比較して、低酸素環境のみで培養した細胞では、HIF-1αおよびMMP-2・9の有意な発現増強をみとめた。低酸素環境から通常の酸素環境に戻して培養した細胞では通常酸素環境で培養した細胞と同程度の発現であった。この結果からLM8細胞において低酸素環境では腫瘍の浸潤、転移に重要であるHIF-1αおよびMMP-2・9の発現が増強し、酸素環境を改善することでその発現が抑制されることが明らかとなった。

（2）モデルマウスを用いて炭酸ガス経皮吸収が骨肉腫皮下移植腫瘍の増殖能に与える影響について検討したところ、炭酸ガス投与群では腫瘍増大を有意に抑制した。マウス体重には両群間で有意差はなかった。摘出腫瘍の検討では、炭酸ガス投与群では腫瘍内のDNA断片化が蛍光免疫染色、FACSともに著明であり、また活性型Caspase-3・9およびPARPの発現増強をみとめた。以上から炭酸ガス経皮吸収が骨肉腫皮下移植腫瘍内でアポトーシスを亢進させ、腫瘍増大を抑制したと考えられた。

（3）さらに炭酸ガス経皮吸収による骨肉腫皮下移植腫瘍の低酸素環境への影響と肺転移に対する影響について、皮下移植腫瘍における Hypoxyprobe-1 と CA IX の免疫染色を行ったところ、コントロール群と比較して炭酸ガス投与群ではその発現が弱く、炭酸ガス経皮吸収によって皮下移植腫瘍内の低酸素環境が改善されていることを示した。また炭酸ガス投与群では HIF-1α および MMP-2・9 の発現が Real time PCR、FACS、免疫染色のいずれにおいても抑制されており、また HIF-1α と MMP-2・9 それぞれの共陽性細胞数も有意に減少していた。肺組織の検討では炭酸ガス投与群において肺転移面積が有意に小さかった。肺重量もコントロール群よりも有意に軽く、正常肺と同程度であった。以上から炭酸ガス経皮吸収は骨肉腫皮下移植モデルにおいて HIF-1α と MMP-2・9 の発現を抑制し、肺転移を抑制したことが明らかとなった。

骨肉腫患者の予後にとって、肺転移の有無は非常に重要であり、その抑制は予後改善に大きな影響を与える。骨肉腫を含めた多くの悪性腫瘍において、腫瘍内は低酸素環境にあることが報告されており、腫瘍内低酸素環境によって活性化する HIF-1α が腫瘍の転移や悪性化に寄与することが知られている。また、MMP 群、特に MMP-2 および MMP-9 は腫瘍細胞の浸潤や転移を促進することが知られている。過去の報告では、子宮がんや乳がんなどの悪性腫瘍で、HIF-1α の発現を低下させると MMP-2 および 9 の発現が低下する、あるいは HIF-1α の発現を低下させた細胞株をマウスに移植すると、移植腫瘍の成長が有意に抑制される、など、低酸素環境を改善することで抗腫瘍効果が得られるということは明らかにされているが、腫瘍内低酸素環境そのものを改善する方法についての報告はなかった。本研究の結果から炭酸ガス経皮吸収は骨肉腫腫瘍内の低酸素環境を改善し、HIF-1α、MMP-2・9s の発現を抑制することで、肺転移を抑制すること、さらに、骨肉腫についてもアポトーシスを誘導し抗腫瘍効果を示すことが明らかとなった。

本研究は腫瘍内低酸素環境の改善が骨肉腫の浸潤・転移の抑制、アポトーシスを介した腫瘍増大抑制をもたらすことを研究したものであるが、従来殆ど行われていなかった、炭酸ガス経皮吸収の腫瘍内低酸素環境に対する作用について重要な知見を得たものとして価値ある集積と認める。よって、本研究者は、博士（医学）の学位を得る資格があると認める。