

平成 30 年 6 月 25 日現在

機関番号：18001

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2015～2017

課題番号：15K10339

研究課題名(和文) 高気圧酸素療法による放射線感受性増感メカニズムの解明

研究課題名(英文) Elucidation of radiation sensitization mechanism by hyperbaric oxygen therapy.

研究代表者

長嶺 英樹 (Hideki, Nagamine)

琉球大学・医学部・助教

研究者番号：30573331

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,700,000円

研究成果の概要(和文)：臨床試験ではGBMにおける高気圧酸素療法を併用した放射線治療が有効であるが、その分子機序は解明されておらず、本研究では異種移植動物モデルを作製し腫瘍内における遺伝子発現が放射線単独照射群と高気圧酸素療法併用群で相反して上昇した遺伝子について放射線感受性への影響を検討した。腫瘍細胞株U87-MG細胞のTet-on発現誘導株を構築し、スフェロイド形成後に遺伝子発現誘導を行っても、低酸素マーカーであるピモニダゾール陽性となった。高気圧酸素療法併用群と放射線単独照射群において相反して上昇した遺伝子が低酸素の脱却に関わるのではなく放射線感受性の亢進に寄与していることが示唆された。

研究成果の概要(英文)：Hyperbaric oxygen treatment combined with radiation therapy improve radiation sensitivity on glioblastoma in our clinical data. In this study, we developed a xenograft animal model and investigated the influence of gene expression in the tumor contrarily in the radiation alone group and the hyperbaric oxygen therapy group on radiation sensitivity. Tet-on expression-inducing strain of tumor cell line U87-MG cells was constructed and induction of gene X expression after spheroid formation was also positive for pimonidazole, a hypoxic marker. It was suggested that gene X contributes to enhancement of radiosensitivity rather than involvement in hypoxia.

研究分野：脳神経外科

キーワード：グリオブラストーマ 高気圧酸素療法 放射線照射 低酸素

1. 研究開始当初の背景

ヒト悪性腫瘍の代表であるグリオブラストーマ (GBM) は発症からの生存期間中央値は約1年程度であり、5年生存率7.8%と極めて予後不良の腫瘍である。標準治療は開頭手術による摘出後、放射線治療と化学療法を行う。琉球大学医学部附属病院ではHBOを組み合わせた脳腫瘍への放射線治療を行う臨床試験で、2000年から2006年までのグレード4患者の術後生存日数を平均17ヶ月に延ばすことに成功している。(Ogawa et al. *Int J Radiat Oncol Biol Phys.* 2012, 1;82(2):732-8)

このように臨床試験においてGBMに対しHBOを併用した放射線治療が効果的であることが示されているが、HBOによる治療効果の分子メカニズムは未だに不明である。我々はその分子メカニズムを解明するため、ヒト由来GBM細胞をマウスに異種移植し腫瘍化させたマウス実験モデルを作製し、HBOを併用した放射線照射群が放射線単独照射群より腫瘍増殖が優位に遅延することを明らかにしている。しかしながら、HBOによる放射線感受性への影響の分子メカニズムは未だ不明である。

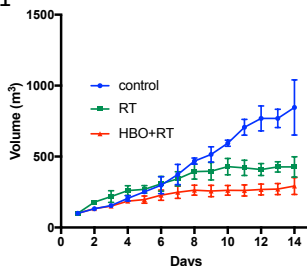
2. 研究の目的

本研究は臨床試験で得られた結果を実験動物における異種移植モデルで再現し、網羅的遺伝子発現解析による解析を用いてHBOによる放射線感受性の増感作用の機序を解明することを目的とした。

3. 研究の方法

GBM細胞株U87-MGをマウスに異種移植したモデルを作製し放射線単独照射群、HBO併用照射群および非照射群の3群に分け1日2Gyで10日間処置し腫瘍増殖率を計測する。HBO群は2.5気圧100%酸素で40分間飼育した直後に放射線照射を行う。HBO併用群が非照射群および放射線単独群と比較して優位に変化した照射5日目の腫瘍からRNAを抽出し網羅的遺伝子解析を行う(図1)。

図1



得られた変動遺伝子から放射線単独群とHBO併用群を比較してHBOでのみ発現が亢進する遺伝子に着目して①スフェロイド培養法を用いた細胞レベルと②マウス移植モデルを用いた腫瘍レベルの両方向から検

討する。マウスモデルを用いた腫瘍形成は癌微小環境を再現する良いモデルであるが、分子メカニズムを詳細に解明するにはそのヘテロジェニックな環境により、細胞内シグナル伝達の解明のための生化学的解析には不利である。そのため細胞塊状に培養するスフェロイド培養はスフェロイドの中心部位が低酸素となる腫瘍環境により近い状態でありながら各スフェロイド間では均一な環境を作製することが可能となる手法を用いる。Tet-on発現システムを用いて変動した遺伝子の誘導発現細胞を構築しスフェロイド培養により中心部位の低酸素状態、放射線感受性への影響を検討する。まずTet-on3Gタンパク質発現細胞株を得るためU87-MG細胞株にpEF1-Tet3GをトランスフェクションしG418による薬剤選択で細胞株を樹立する。TREプロモーターの下流に目的遺伝子を挿入したプラスミドを作製し、樹立したTet3G細胞株にトランスフェクションし薬剤選択によりTet-on発現誘導細胞株を樹立する。樹立したTet-on発現誘導細胞株をマウスに異種移植し腫瘍形成および放射線感受性への影響を検討する。

4. 研究成果

網羅的遺伝子発現解析の結果、非照射群と放射線単独群、非照射群とHBO併用群を比較し変動した全遺伝子のうち共通して発現が上昇あるいは減少した遺伝子がそれぞれ37遺伝子および27遺伝子あることが明らかとなった(図2)。

図2

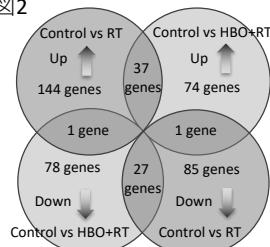
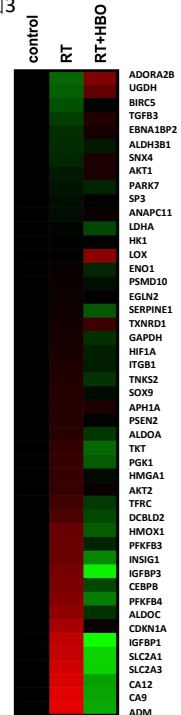


図3



放射線単独群において低酸素応答転写因子HIF-1の下流遺伝子が数多く上昇したがHBO併用群においてそれらの遺伝子は非照射群と同等またはそれ以上に低下していることが明らかとなり高気圧酸素療法により腫瘍の酸素化が起こっていることを示した(図3)。また、放射線単独群で減少し、HBO併用群で上昇するという変動が相反した遺伝子が1遺伝子存在した。この相反した遺伝子についてTet-on誘導発現細胞株を構築した。樹立した細胞株をスフェロイド培養した後、テトラサイクリンで相反した遺伝子を発現させ通常酸素および高気圧酸

素条件で培養後、低酸素マーカーであるピモニダゾール染色を行った。結果、まず発現誘導を行っていないコントロール細胞においても高気圧酸素条件で培養することによりスフェロイド内部が酸素化されることが示された。HBO 併用群でのみ発現上昇した遺伝子をスフェロイド形成後に発現誘導後、通常酸素条件での培養ではスフェロイド内部はピモニダゾール陽性となり遺伝子誘導だけでは低酸素細胞からの脱却はできないことが示唆された。

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 5 件)

1. Shinya T, Nagamine H, Sugawara K, Ishiuchi S. : The usefulness of indocyanine green during surgery for hypervascular posterior fossa tumors, *Surgical Neurology International*, 2018, 9:90. 査読あり
2. Nishimura M, Kobayashi S, Kinjo Y, Hokama Y, Sugawara K, Tsuchida Y, Tominaga D, Ishiuchi S. : Factors Leading to Improved Gait Function in Patients with Subacute or Chronic Central Nervous System Impairments Who Receive Functional Training with the Robot Suit Hybrid Assistive Limb, *Neurologia medico-chirurgica (Tokyo)*, 2018, 58(1):39-48. 査読あり
3. Nakata S, Horiguchi K, Ishiuchi S, Yoshimoto Y, Yamada S, Nobusawa S, Ikota H, Hirato J, Yokoo H. : A case of high-grade astrocytoma with BRAF and ATRX mutations following a long-standing course over two decades, *Neuropathology*, 2017, 37(4):351-357. 査読あり
4. Shiroma A, Nishimura M, Nagamine H, Miyagi T, Hokama Y, Watanabe T, Murayama S, Tsutsui M, Tominaga D, Ishiuchi S. : Cerebellar

Contribution to Pattern Separation of Human Hippocampal Memory Circuits, *Cerebellum*, 2016, 15(6):645-662. 査読あり

5. Nagaishi M, Nobusawa S, Matsumura N, Kono F, Ishiuchi S, Abe T, Ebato M, Wang Y, Hyodo A, Yokoo H, Nakazato Y. : SLC44A1-PRKCA fusion in papillary and rosette-forming glioneuronal tumors, *Journal of Clinical Neuroscience*, 2016, 23:73-75. 査読あり

[学会発表] (計 7 件)

1. 片桐千秋 長嶺英樹 圓谷智之 石内勝吾 松下正之. 放射線により生じる細胞の低酸素応答は高気圧酸素療法により抑制される. Poster, 第 94 回日本生理学会大会, 2017 年
2. 片桐千秋 長嶺英樹 松下正之 石内勝吾 Hyperbaric oxygenation treatment suppress radiotherapy induced cellular hypoxia. The 7th international society of radiation and neurobiology conference, oral presentation, 2017
3. 片桐千秋 長嶺英樹 松下正之 石内勝吾 Effect of hyperbaric oxygenation treatment radiotherapy induced cellular hypoxic response in Glioblastoma. 第 39 回日本分子生物学会年会, poster, 2016 年
4. 石内勝吾. グリオーマの最新知見 グリオーマ浸潤性増殖と治療抵抗性機能性ネットワーク形成. 第 36 回日本脳神経外科コンgres総会, 一般演題, 2016 年
5. 片桐千秋. 高気圧酸素療法による脳腫瘍の放射線増感機序の解明. 第 7 回バイオメディカルインタフェース研究会, 一般演題, 2016 年
6. Chiaki Katagiri, Hideki Nagamine, Shogo Ishiuchi. Radiotherapy induced cellular hypoxic response in glioblastoma is suppressed by hyperbaric oxygenation treatment. The 6th international society of radiation and neurobiology conference, 一般演題, 2016 年

7. 片桐千秋 長嶺英樹 松下正之 石内勝吾
Hyperbaric oxygenation treatment
effects on radioresponse in malignant
glioblastoma. 第 58 回日本神経化学会
大会, 2015 年

[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

6. 研究組織

(1) 研究代表者

長嶺 英樹 (NAGAMINE, HIDEKI)
琉球大学・大学院医学研究科・助教
研究者番号: 30573331

(2) 研究分担者

石内 勝吾 (ISHIUCHI, SHOGO)
琉球大学・大学院医学研究科・教授
研究者番号: 10312878

菅原 健一 (SUGAWARA, KENICHI)
琉球大学・大学院医学研究科・講師
研究者番号: 50375573

片桐 千秋 (KATAGIRI, CHIAKI)
琉球大学・大学院医学研究科・助教
研究者番号: 00443664

渡辺 孝 (WATANABE, TAKASHI)
宮崎大学・医学部・講師
研究者番号: 90573337