

平成 30 年 6 月 28 日現在

機関番号：81603

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2015～2017

課題番号：15K15442

研究課題名(和文) 癌幹細胞をとりまく腫瘍低酸素環境ダイナミクスからの新たな放射線増感法への展開

研究課題名(英文) The development of newly radiosensitization based on dynamics on tumor hypoxic condition

研究代表者

高井 良尋 (Takai, Yoshihiro)

一般財団法人脳神経疾患研究所・南東北BNCT研究センター・センター長

研究者番号：50107653

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,800,000円

研究成果の概要(和文)：低酸素環境は腫瘍の放射線治療に対する応答性をさまざまに変化させる。本研究では腫瘍低酸素の制御が治療の増感に寄与するかどうかを検討した。T98GおよびA172膠芽腫細胞は1%低酸素下で生存し、2週間連続培養でスフェロイドを形成し続けた。スフェロイドを低酸素毒tirapazamine (TPZ) 40 μ Mで処理すると、癌幹細胞マーカー遺伝子発現に有意変化は認められなかったものの、L-アミノ酸トランスポーター1 (LAT1) の発現が有意に増強した。LAT1はホウ素中性子捕捉療法(BNCT)の薬剤BPA取り込みに関与しており、TPZによる低酸素の制御によりBNCTを増感する可能性が示唆された。

研究成果の概要(英文)：The hypoxic environment has changed responsiveness of tumors to radiotherapy in various ways. In this study, we examined whether control of tumor hypoxia contributes to sensitization of treatment. T98G and A172 glioblastoma cells survived under 1% hypoxia and continued to form spheroids in continuous culture for 2 weeks. Treatment of spheroids with hypoxic toxin tirapazamine (TPZ) at 40 μ M significantly increased expression of L-amino acid transporter 1 (LAT1), although no significant change was observed in cancer stem cell marker gene expression. LAT1 is involved in the uptake of drug BPA in boron neutron capture therapy (BNCT), suggesting the possibility of sensitizing BNCT by controlling hypoxia by TPZ.

研究分野：放射線腫瘍学

キーワード：癌幹細胞 低酸素 放射線増感 ホウ素中性子捕捉療法 L-アミノ酸トランスポーター1 Tirapazamine

1. 研究開始当初の背景

体幹部定位放射線治療 (SBRT) では、腫瘍の組織型の如何に拘わらず最大径 3 cm 以内であれば、概ね 90%という高い局所制御率が得られ、同等の BED での通常分割照射の局所制御率を遙かに凌ぐ。この理由として腫瘍組織において大線量による血管障害に起因した受動的な細胞死が関与していると説明される (Kirkpatrick JP et al. Semin. Radiat. Oncol., 2008)。さらに低酸素状態になると放射線抵抗性が3倍程高まるため通常分割照射での 2 Gy 程度の 1 回線量ではほとんど細胞致死効果が得られないのに対し、SBRT での 10 Gy 程度の 1 回線量ではある一定の割合で細胞死を誘導する (Otuka et al. IJROBP, 2011)。この低酸素での線量依存的な放射線応答を端的に説明する概念は今までのところ確立されていなかった。低酸素環境はまだ未知の作用機序によって腫瘍の放射線治療に対する応答性をさまざまに変化させている可能性がある。

近年、種々の固形癌において無制限に自己複製を繰り返しながら癌構成細胞を供給する癌幹細胞様細胞 (Cancer stem-like cell; CSC) の存在が同定されており、CSC が放射線治療抵抗性に大きく影響することが明らかとなってきた。CSC 能の獲得と維持には低酸素を介した Hypoxia-inducible factor (HIF)-1 の高発現が関与しており、腫瘍低酸素領域が CSC のニッチと考えられている (Heddleston JM et al. Br. J. Cancer, 2010)。したがって低酸素領域を制御することによって CSC ニッチを減少させることにより、結果的に放射線抵抗性を示す CSC のような抵抗因子を制御しようという仮説が成り立つ。

2. 研究の目的

本研究では、この仮説が正しいかどうかを確かめ、現在の放射線治療の有効性をさらに向上させる標的として妥当かどうかを評価することを目的とした。

3. 研究の方法

・細胞培養・スフェロイド作成： T98G および A172 膠芽腫細胞を 10%FBP および penicillin/streptomycin を添加した DMEM 培地で 37 °C、5%CO₂ で培養した。スフェロイド培養ディッシュ (住友ベークライト、Japan) を用いた。

・低酸素環境の構築： 低酸素条件はモジュラー式培養チャンバー内に 95%N₂ および 5%CO₂ 混合ガスを一定時間通気し作成された。チャンバー内の酸素濃度は JKO-02 Ver. III モニター (JIKCO, Tokyo, Japan) で確かめられ、密閉し 37 °C で培養された。

・トリパンブルー色素排除試験： 細胞を回収後に 0.5%トリパンブルー (Nacalai Tesque, Kyoto, Japan) を含有する PBS で染色し、5

分以内に細胞算定板を用いて染色されない細胞を生細胞として算定した。

・細胞周期解析： 回収した細胞を RNase を含んだ propidium iodide 溶液 (PI/RNase, Cosmo Bio, Tokyo, Japan) で染色し、Cytomics FC500 フローサイトメーター (Beckman Coulter, Tokyo, Japan) を用いて解析した。

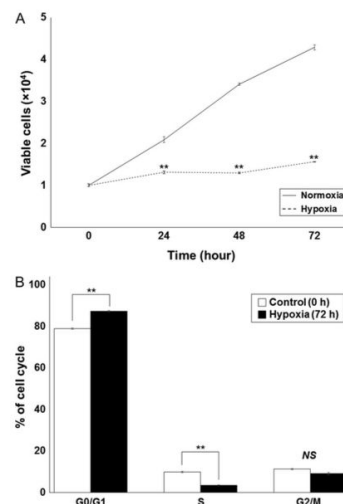
・細胞内ホウ素濃度の定量： BPA (Stella Pharma, Osaka, Japan) で 2 時間培養した後回収した細胞ペレットを HClO₄ 1 に対して H₂O₂ 2 を加えた溶液で 70 °C、6 時間処理 (灰化) し、誘導結合プラズマ発光スペクトロメーター ICP-AES で 249.772 nm の波長スペクトルの強度より求めた。

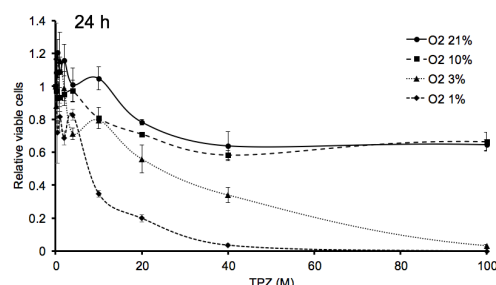
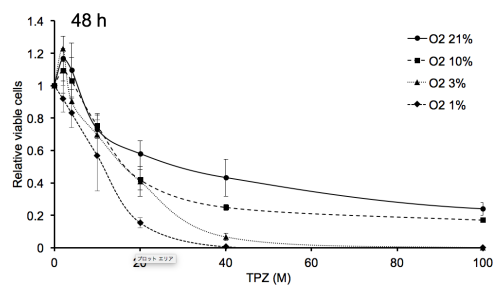
・RNA 抽出： Agencourt RNAdvance cell v2 および SPRI paramagnetic bead technology をメーカーの使用書に沿って処理することにより、最終的に細胞からの Total RNA を抽出した。

・mRNA 発現の定量： 得られた total RNA より逆転写反応によって得られた cDNA に、サイバークリーン試薬およびプライマーを混ぜ、CFX connect を用いて 95 °C 30 秒、98 °C 10 秒、60 °C 30 秒の増幅サイクルを用いて増幅、リアルタイムに蛍光強度を測定した。検量線より、遺伝子の相対的な発現量を解析した。

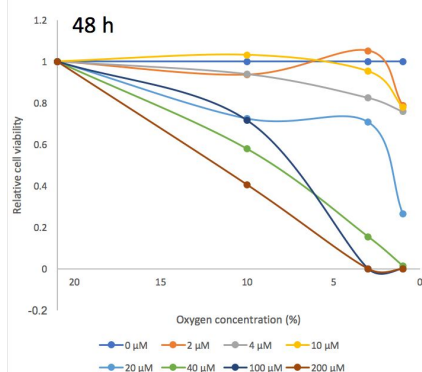
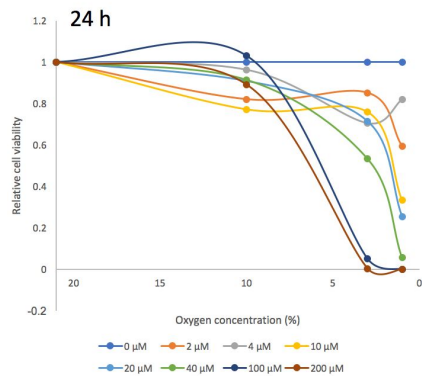
4. 研究成果

はじめに T98G および A172 膠芽腫細胞系において低酸素条件のベースの細胞毒性について調べた。1%酸素の条件で、72 時間まで細胞を培養しその後細胞生残および細胞周期を評価した。低酸素条件では有意に T98G 細胞の増殖は阻止されたが、生残細胞は 72 時間において変化しなかった。A172 細胞でも同様の傾向が認められた。長時間の低酸素培養では多くの細胞が G0/G1 期で停止し、S 期の細胞に減弱を認めた。



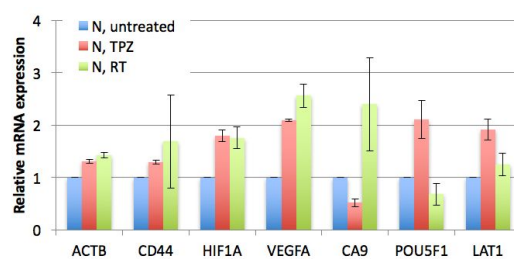


TPZ の低酸素選択的毒性、および毒性発現に対する酸素濃度の影響を評価した。ディッシュに播種・定着した細胞において、TPZ を投与後すぐにチャンバーで低酸素を導入した。24 時間後の培養において、21%および 10% 酸素条件と比較して、1%および 3%において、細胞生残率が有意に低下した。48 時間ではさらにその生残率が低下した。この結果より酸素濃度と TPZ 濃度、細胞生残率の関係を更に解析し、酸素濃度 3% で十分な選択的低酸素毒性を示す濃度は 40 μ M 以上であることを明らかにした。

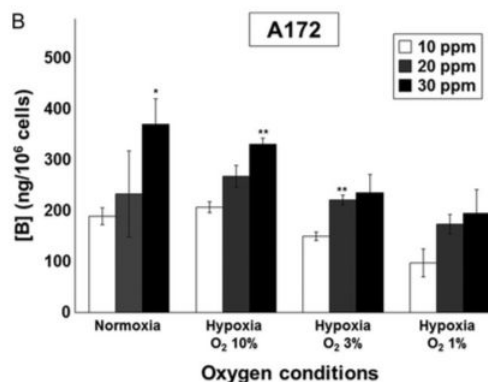
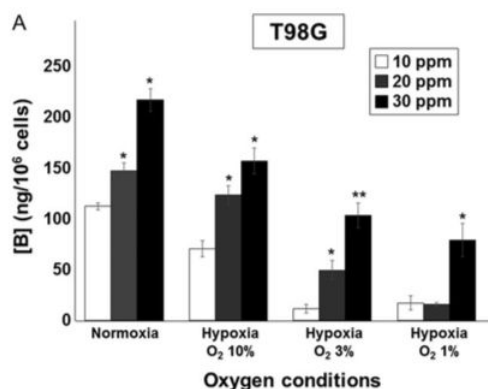


T98G 細胞を、2 週間継続して培養することにより作成したスフェロイドより回収した生細胞では CD133 癌幹細胞マーカーの遺伝子 PROM1 の発現は検出感度以下であった。周囲の酸素領域の細胞が放射線より感受性が

高い故、スフェロイドに対しての X 線 10Gy 照射は CAIX および VEGFA の発現を上昇させたが、明らかな HIF1A の発現は認めなかった。一方幹細胞マーカーの上昇は認めなかった。スフェロイドに対して TPZ で処理すると、低酸素マーカーである CAIX に有意な発現低下が認められた。癌幹細胞マーカー・未分化マーカーのうち検出可能であった CD44 および POU5F1 はいずれも TPZ 処理により軽度の増加を認めた。ホウ素中性子捕捉療法に用いられる薬剤 L-boronophenylalanine (BPA) 取り込みに関する輸送ポンプである、L-アミノ酸トランスポーター-1 (LAT1) は TPZ 処理で増強した。このことから、低酸素が LAT1 の発現を抑制しており、低酸素を制御することによってホウ素中性子捕捉療法の効果が増感される可能性を見出した。

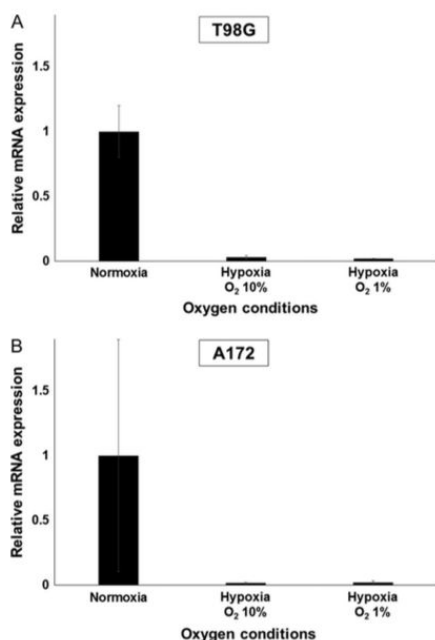


ホウ素捕捉療法への抵抗性が低酸素によって誘導されていることを確認するため、T98G および A172 細胞での BPA の細胞内摂取への酸素影響を調べた。T98G および A172 細胞を酸素 21%, 10%, 3%, 1% 下で 72 時間培養し 10, 20, 30 ppm の BPA に 2 時間曝露し、その後 ICP-AES を用いて細胞内 BPA 取り込みを解析した。BPA 摂取量はすべての酸素条件



においてBPAの濃度に依存して上昇した。一方、酸素条件の減少につれて徐々に減弱した。T98G細胞ではBPA 30 ppmで10%, 3%, 1%低酸素で21%酸素と比較して有意なBPAの減少が認められた。A172においても同様の傾向が認められた。したがってBPAの摂取量は酸素濃度の変化の直線的な関係で変動することが示された。

酸素濃度とBPA摂取量の関係がLAT1およびLAT2のmRNA発現量の変化に寄与しているかについて検討した。Figに示すように、相対的なLAT1 mRNAの発現は10%と1%の両方の条件で有意に減少した。しかし、LAT2 mRNA発現については酸素条件に拘わらず、いずれにおいても検出限界以下であった。



結論として、低酸素ニッチがホウ素中性子捕捉療法で用いられるBPAの摂取能を抑制させており、TPZを代表とする低酸素毒によってこの低酸素ニッチを制御することによって治療増感が得られる可能性が示された。

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1件)

Wada Y., Hirose K., Takai Y., et al. Impact of oxygen status on ¹⁰B-p-BPA uptake into human glioblastoma cells, referring to significance in boron neutron capture therapy. Journal of Radiation Research 2018. 59:122-128.

[学会発表](計3件)

和田優貴、廣瀬勝己、高井良尋他. BNCT

において組織低酸素環境がヒト膠芽腫細胞の¹⁰B-p-boronophenylalanine 摂取能に与える影響. 第136回日本医学放射線学会北日本地方会. 2017年

廣瀬勝己. BNCTの抗がん効果を支配する基本要素を考究する -低酸素細胞-. Expert Meeting on BNCT Research (湯川記念財団森一久寄金研究会). 2018年

廣瀬勝己. ホウ素中性子捕捉療法を支えるPET分子イメージングの役割と今後の展開について. 第13回日本分子イメージング学会総会・学術集会. 2018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 該当なし

6. 研究組織

(1) 研究代表者

高井 良尋 (TAKAI Yoshihiro)

一般財団法人脳神経疾患研究所・南東北

BNCT研究センター・センター長

研究者番号: 50107653

(2) 研究分担者

廣瀬 勝己 (HIROSE Katsumi)

一般財団法人脳神経疾患研究所・南東北

BNCT研究センター・診療所長

研究者番号: 60623767

佐藤 まり子 (SATO Mariko)

弘前大学・医学部附属病院・助教

研究者番号: 30645263

(3) 連携研究者

該当なし

(4) 研究協力者

該当なし