

令和 2 年 5 月 5 日現在

機関番号：11101

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2017～2019

課題番号：17K16413

研究課題名(和文) インターロイキン6遮断薬を使用した癌細胞の放射線感受性の調節

研究課題名(英文) Control of radiosensitivity of cancer cells using interleukin-6 blockers

研究代表者

嵯峨 涼 (Saga, Ryo)

弘前大学・保健学研究科・助教

研究者番号：50794145

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,700,000円

研究成果の概要(和文)：放射線治療は癌に対して有効な治療法であるが、癌細胞が放射線抵抗性を獲得し、治療後に残存することによって、予後不良となる。そこで、抗炎症作用を有する4-メチルウンベリフェロン(4-MU)を併用し、癌細胞の放射線抵抗性に関わる分子機構を抑制することを目的として、本研究を行った。その結果、放射線照射単独に比較して4-MUを併用すると、癌細胞の放射線に対する生存率が有意に減少し、放射線抵抗性に関わるインターロイキン6のシグナル伝達経路が不活性化されることが示唆された。したがって、放射線治療における放射線増感剤として4-MUの臨床応用が期待される。

研究成果の学術的意義や社会的意義

放射線治療中に癌細胞が放射線抵抗性を獲得し、残存することが再発を引き起こす原因になっている。4-メチルウンベリフェロン(4-MU)はヒアルロン酸合成阻害剤であり、抗腫瘍効果ならびに転移阻害効果を有することが報告されているが、放射線と併用時の影響は不明である。本研究により、4-MUの放射線増感効果とその機序が明らかになったことは、残存放射線抵抗性細胞への直接的治療ならびに癌転移防止剤の確立による臨床応用化において、学術的のみならず放射線治療の予後改善に大きく寄与すると考えられる。

研究成果の概要(英文)：Radiotherapy is generally effective against cancer, however cancer cells acquired radioresistant during radiotherapy cause poor prognosis. Then, to suppress the molecular mechanism related to radioresistant of cancer cells, combined with 4-methylumbelliferone (4-MU) which has anti-inflammation effect. The irradiated cell surviving fraction was significantly decreased by 4-MU administration, and it was suggested that signaling pathway of interleukin-6 was inactivated. Therefore, 4-MU is hoped to apply in a clinical setting as radiosensitizer drug on radiotherapy.

研究分野：放射線科学関連

キーワード：放射線抵抗性 4-メチルウンベリフェロン 炎症性サイトカイン 放射線治療

## 様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

### 1. 研究開始当初の背景

昨今の癌治療における放射線治療は、正確な線量計算技術や正常組織への線量を抑えた照射法の開発によって非侵襲かつ良好な局所制御が得られ、重要性が拡大している。一方で、放射線治療後に再発した癌には化学療法が選択されるが、再発例での奏効率は低くなる。癌の再発は、癌細胞が放射線治療中に放射線抵抗性を獲得することにより引き起こされると考えられており、この放射線抵抗性細胞は癌幹細胞の様な特性を有する。近年、癌幹細胞の特性に関わる CD44 や CD133 のような表面抗原およびインターロイキン炎症性サイトカインなどの分子機構は明らかになりつつある。4-メチルウンベリフェロン (4-MU) はヒアルロン酸合成阻害剤として知られており、抗炎症作用や浸潤阻害作用を有する。したがって、4-MU によりこれらの分子機構を抑制することができれば、放射線治療の予後を改善できると考えられる。

### 2. 研究の目的

本研究の目的は、癌細胞の放射線抵抗性に関わる分子機構を抑制し、放射線応答を解析することである。そのために、抗炎症作用を有する 4-MU を放射線照射と併用し、癌細胞の放射線感受性への影響を解析する。

### 3. 研究の方法

#### (1) 培養細胞

ヒト線維肉腫細胞 HT1080 は ATCC より購入した。細胞は 10% ウシ胎児血清含有 RPMI1640 培地で 37%、5% CO<sub>2</sub> 環境で培養した。

#### (2) 試薬

4-MU (Nacalai Tesque) は dimethylsulfoxide (DMSO) に溶解させ、濃度は 500 μM を使用した。対照は DMSO 単独投与群とした。

#### (3) 細胞への X 線照射

X 線照射は X 線発生装置 (MBR-1520R-3, Hitachi Medical) を使用し、管電圧 150 kVp、管電流 20 mA、線量率 1.0 Gy/min で照射した。

#### (4) 細胞死解析

0-6 Gy X 線照射または 4-MU 投与下の細胞のクローン原性をコロニー形成アッセイで評価した。適切な細胞数を播種し、8-10 日間培養後、コロニーをメタノール (Wako) で固定、ギムザ染色液 (Wako) で染色し、50 細胞以上からなるコロニーを計数した。また、2 Gy X 線照射または 4-MU 投与から 1-24 時間後のアポトーシスは蛍光標識された Annexin V (BioLegend) および propidium iodide (PI) (BioLegend) を用いて、フローサイトメトリー (FACS Aria) によりデータを収集および解析した。

#### (5) 網羅的な mRNA 発現解析

4-MU 投与または 2 Gy X 線照射から 24 時間後の HT1080 細胞から RNA を抽出し、Cyanine (Cy) 3 標識された cRNA を合成した。cRNA をマイクロアレイスライドにハイブリダイズし、Cy3 蛍光データを DNA マクロアレイスキャナーにより読み取った。蛍光データは GeneSpring (Agilent Technologies) により統計解析を行い mRNA 発現の機能解析は Ingenuity Pathway Analysis (IPA; Qiagen Silicon Valley) により行った。mRNA 発現の再現性の確認は、RT-qPCR により行った。

#### (6) 培地中の炎症性サイトカイン濃度測定

4-MU 投与または X 線照射から 24 時間後の HT1080 細胞の培養上清を回収し、炎症性サイトカインであるインターロイキン (IL) -1 $\alpha$ 、-1 $\beta$ 、-6 について ELISA キット (R&D Systems) によって濃度を測定した。それぞれのサイトカイン濃度は 100 万細胞あたりに換算した。

#### (7) 炎症性サイトカインの受容体発現測定

IL-1 および -1 $\beta$  の受容体である CD121a と IL-6 の受容体である CD126 および CD130 の蛍光標識された抗体を使用し、フローサイトメトリーにより平均蛍光強度を測定し、解析を行った。

### 4. 研究成果

#### (1) 4-MU 存在下における X 線照射の細胞傷害性の検証

まず、包括的な細胞死を測定することが可能であるコロニー形成アッセイにより、4-MU 存在下における X 線照射の細胞致死効果を検証した。その結果、4-MU を投与されると、いずれの線量においても有意に生存率が減少した。さらに、アポトーシス細胞割合は X 線照射から 6 時間後でピークとなり、4-MU を併用するとわずかに増加した。このことから、4-MU 存在下における X 線照射の細胞傷害性の有意な増強は、増殖死の増加によるものであることが示唆された。

#### (2) 4-MU による放射線増感効果機序の解析

続いて、4-MU の放射線増感効果機序を探索するために、マイクロアレイによって網羅的に mRNA

発現を解析した。IPAにより、種々のシグナル伝達経路の活性化傾向を検証すると、炎症に関わるシグナル伝達経路が2 Gy X線照射で活性化されるのに対し、4-MUが存在すると傾向が逆転し、不活性化されることが示唆された。次に個々のmRNAに着目すると、IL-1 $\beta$ 、IL-1 $\alpha$  およびIL-6のような炎症性サイトカインが4-MUにより不活性化されていることが明らかになった。そこで、同定された3種類のmRNA発現をRT-qPCRにより測定したところ、IPAの解析結果と同様に4-MU存在下で、対照群および2 Gy X線照射単独群よりも有意に発現量が減少した。また、培養上清中に産生されたサイトカインの濃度もmRNA発現結果と同様の傾向を示した。炎症性サイトカインのIL-1 $\alpha$  およびIL-6の過剰な発現と放射線抵抗性の関連が報告されていることから4-MUによるこれらの発現抑制により、放射線の細胞致死効果が増強されることが示唆された。

### (3)炎症性サイトカイン受容体の解析

4-MUにより、炎症性サイトカインのシグナル伝達経路が不活性化されていることから、IL-1 $\alpha$ 、IL-1 $\beta$  およびIL-6の受容体発現をフローサイトメトリーにより解析した。IL-1 $\alpha$  およびIL-1 $\beta$ の受容体であるCD121aの発現は4-MU投与により減少する傾向があったが、IL-6の捕捉受容体であるCD126およびシグナル伝達受容体であるCD130の発現は有意に減少した。このことから、主にIL-6のシグナル伝達経路が不活性化されることによって放射線感受性が向上したと考えられる。

### (4)結論

本 *in vitro* 研究より、2 Gy X線照射および4-MUとの併用によるHT1080細胞の放射線増感効果が確認できた。これらの結果から、根治を目指す放射線治療における新たな治療戦略として、4-MUの併用が有効であることが示唆された。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計2件（うち査読付論文 2件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 2件）

1. 著者名 Saga Ryo, Hasegawa Kazuki, Murata Kosho, Chiba Mitsuru, Nakamura Toshiya, Okumura Kazuhiko, Tsuruga Eichi, Hosokawa Yoichiro	4. 巻 17(3)
2. 論文標題 Regulation of radiosensitivity by 4-methylumbelliferone via the suppression of interleukin-1 in fibrosarcoma cells	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Oncology Letters	6. 最初と最後の頁 3555-3561
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3892/ol.2019.9990	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている(また、その予定である)	国際共著 -

1. 著者名 Hasegawa Kazuki, Saga Ryo, Takahashi Rei, Fukui Roman, Chiba Mitsuru, Okumura Kazuhiko, Tsuruga Eichi, Hosokawa Yoichiro	4. 巻 19
2. 論文標題 4-methylumbelliferone inhibits clonogenic potency by suppressing high molecular weight-hyaluronan in fibrosarcoma cells	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Oncology Letters	6. 最初と最後の頁 2801-2808
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3892/ol.2020.11370	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている(また、その予定である)	国際共著 -

〔学会発表〕 計5件（うち招待講演 0件/うち国際学会 3件）

1. 発表者名 嵯峨 涼、長谷川 和輝、高橋 玲、細川 洋一郎
2. 発表標題 4-メチルウンベリフェロン投与によるヒト線維肉腫細胞の放射線感受性調節
3. 学会等名 第56回日本放射線腫瘍学会生物部会学術大会/第47回放射線による制癌シンポジウム
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 Ryo Saga, Kazuki Hasegawa, Rei Takahashi, Yoichiro Hosokawa
2. 発表標題 Regulation of radiosensitivity by 4-methylumbelliferone via suppression of interleukin-1 in fibrosarcoma cells
3. 学会等名 5th Educational Symposium on Radiation and Health by Young Scientists (国際学会)
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 嵯峨涼
2. 発表標題 炎症抑制剤による癌細胞の放射線感受性の調節
3. 学会等名 第60回放射線影響学会
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 Ryo Saga
2. 発表標題 Radiosensitivity regulation in fibrosarcoma cells by anti-inflammatory agents
3. 学会等名 4th Educational Symposium on Radiation and Health by Young Scientists (国際学会)
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 Kosho Murata
2. 発表標題 Relationship between hyaluronan production and metastatic potential after fractionated irradiation of human prostate cancer cell lines
3. 学会等名 4th Educational Symposium on Radiation and Health by Young Scientists (国際学会)
4. 発表年 2017年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
---------	---------------------------	-----------------------	----