

令和 2 年 7 月 12 日現在

機関番号：81603

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2017～2019

課題番号：17K16494

研究課題名(和文) BNCTに見出される大線量特異的細胞死の解明と新規治療法への展開

研究課題名(英文) Elucidation of high dose-specific cell killing found in boron neutron capture therapy and development to a new treatment strategy.

研究代表者

原田 崇臣 (Harada, Takaomi)

一般財団法人脳神経疾患研究所・南東北がん陽子線治療センター・研究員

研究者番号：70791127

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,100,000円

研究成果の概要(和文)：ボロノフェニルアラニン(BPA)を用いたBNCTにおいて、低酸素細胞ではBPAの取り込み能が酸素濃度に依存して有意に低下することが知られている。本研究では、低酸素腫瘍細胞においてはBPAの取り込みに関与するアミノ酸トランスポーター(LAT1)の発現が低下すること、また、低酸素誘導因子(HIF-1)のノックダウンによって、LAT1の発現が回復することが確認された。低酸素細胞におけるBNCTの治療効果の低下には、HIF-1によるLAT1の遺伝子発現の低下が関与することが示唆された。BNCTにおけるHIF阻害剤の併用は、低酸素細胞に対するBNCTの治療効果を増感させる可能性がある。

研究成果の学術的意義や社会的意義

低酸素細胞に対するBNCTの治療効果の減弱が様々な報告から明らかにされつつあるものの、具体的な改善策は明確ではない。本研究より、低酸素細胞におけるBNCTの治療効果の低下には、HIF-1によるLAT1遺伝子発現の低下が関与することが示唆された。BNCTにおいて、HIF-1のノックダウンとLAT1の遺伝子発現評価に関する報告はなく、本研究から得られた新たな知見である。また、HIF阻害剤とBNCTを併用することで、低酸素細胞に対するBNCTの治療効果を増感させる可能性が示されたことから、低酸素分画を有する腫瘍に対するBNCTの適応拡大の可能性を示唆する大変意義のあるデータが得られたと考える。

研究成果の概要(英文)：In boron neutron capture therapy (BNCT) using p-boronophenylalanine (BPA), it is known that the uptake of boron agents is suppressed in hypoxic conditions. In this study, it is confirmed that gene expression of L-type amino acid transporter 1 (LAT1) which is related to the uptake of BPA was suppressed in tumor cells, and LAT1 expression was restored in HIF-1-knocked down samples. Therefore, it is revealed that HIF-1 suppresses LAT1 expression in hypoxic cells. From the results of the surviving fraction after BNCT combined with HIF inhibitor YC-1, treatment with YC-1 sensitized the antitumor effects of BNCT in hypoxic tumor cells.

研究分野：放射線生物学

キーワード：BNCT 低酸素細胞 アミノ酸トランスポーター 低酸素誘導因子 HIF阻害剤(YC-1)

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

BNCT (boron neutron capture therapy; ホウ素中性子捕捉療法) は、ホウ素原子 ^{10}B と熱中性子との核変換反応によって生じる、高い LET を有するヘリウム原子核 (α 線) とリチウム原子核を用いた放射線治療である。BNCT の生物効果は、ホウ素と中性子との反応に基づくホウ素線量に依存するため、腫瘍細胞のホウ素の取り込みは重要な因子となる。ホウ素薬剤として臨床利用されている ^{10}B -p-boronophenylalanine (^{10}B -BPA, ボロノフェニルアラニン) は、フェニルアラニンがホウ酸残基で化学修飾されたもので、アミノ酸の細胞膜透過を可能にする膜タンパク質であるアミノ酸トランスポーター (L-type amino acid transporter 1; LAT1) を介し、他のアミノ酸との逆輸送によってがん細胞に取り込まれると考えられており、今日では多くのがんに対する BNCT で効果が研究されている。腫瘍細胞のホウ素取り込み能に依存して細胞内に移行し分布する ^{10}B -BPA は、腫瘍内の低酸素状態にある腫瘍細胞には非常に分布しにくく、結果として BNCT の治療効果が低下し、低酸素状態にある腫瘍細胞への殺細胞効果が低下することが懸念される。実際に、 ^{10}B -BPA を用いた BNCT において、慢性的な低酸素条件で培養された細胞では、 ^{10}B -BPA の取り込み能が酸素濃度に依存して有意に低下することが明らかにされた (J Radiat Res 2018;59:122-8)。しかしながら、その分子メカニズムについては未だ解明されておらず、低酸素細胞に対する BNCT の治療効果の減弱に対する具体的な改善策が明確になっていない。

2. 研究の目的

本研究では、大線量の粒子線により傷害された細胞の細胞死の機序を明らかにするとともに、BNCT の治療効果増強に關する治療標的存在を見出すことを目的とした。また、これを達成するために必要なホウ素集積性への腫瘍環境因子としての低酸素の影響を、低酸素環境で細胞内に蓄積する Hypoxia-inducible factor 1 α (HIF-1 α) に着目して評価することで、 ^{10}B -BPA を用いた BNCT の治療効果の減弱に対する HIF-1 α の影響を解明することを目的とした。また、HIF-1 α を阻害することで、低酸素細胞に対する BNCT の効果を増強することができるか否かを評価した。

3. 研究の方法

本研究では、ヒト膠芽腫細胞株 T98G、ヒト口腔扁平上皮癌由来細胞株 HSC-3、ヒト乳癌由来細胞株 MCF-7 を用いた。T98G には DMEM/F12 を、HSC-3 および MCF-7 には DMEM を培養培地として用い、培地には 10%FBS および Penicillin/streptomycin を添加して、37°C、5% CO₂ の条件下で各細胞を培養した。

(1) HIF-1 α が誘導された細胞における BNCT 効果の減弱評価

低酸素チャンバーを用いた 1% O₂ の低酸素負荷、および疑似低酸素薬であるデフェロキサミン (deferrioxamine; DFO) の投与により、各培養細胞内に HIF-1 α を誘導した。1% O₂ の低酸素負荷および 5 μM の DFO 投与から 24 時間後に各細胞から total RNA を抽出し、逆転写反応の後に real time RT-PCR を実施して、LAT1 の遺伝子発現量を評価した。また、培養培地に ^{10}B -BPA を 30 ppm の終濃度で投与し、2 時間後に細胞内ホウ素量を評価した。さらに、mono azo rhodamine (MAR) を用いた低酸素イメージングを用いて、HIF-1 α を誘導刺激した各細胞内の低酸素状態を評価した。

(2) small interfering RNA (siRNA) による HIF-1 α のノックダウン

siRNA により HIF-1 α の発現をノックダウンした細胞に対して 5 μM の DFO を投与し、24 時間後に各細胞から total RNA を抽出し、逆転写反応の後に real time RT-PCR を実施して、LAT1 の遺伝子発現量を評価した。

(3) HIF 阻害剤を用いた低酸素細胞に対する BNCT 増感効果の検討

本研究では HIF 阻害剤として 3-(5'-ヒドロキシメチル-2'-フリル)-1-ベンジリンダゾール (YC-1) を用いた。各細胞に対して 0.5 μM の YC-1 を添加し、1% O₂ の低酸素条件下で 24 時間培養した後に ^{10}B -BPA を投与し、2 時間後に加速器中性子ビームを照射した。コロニー形成法を用いて細胞の生残率を評価し、低酸素細胞に対する HIF 阻害剤を併用した BNCT の増感効果を検討した。また、0.5 μM の YC-1 を添加し、1% O₂ の低酸素条件下で 24 時間培養した後、各細胞からタンパク質を回収し、ウェスタンブロット法を用いて HIF-1 α および LAT1 のタンパク発現を評価した。

4. 研究成果

(1) HIF-1 α が誘導された細胞における BNCT 効果の減弱評価

1% O₂ の低酸素環境で培養された細胞における LAT1 の遺伝子発現量は、通常酸素比でそれぞれ、T98G で 0.637 \pm 0.082、HSC-3 で 0.687 \pm 0.061、MCF-7 で 0.519 \pm 0.083 であり、いずれの細胞も LAT1 の遺伝子発現量が通常酸素条件に比べて低下した。DFO 投与細胞における LAT1 の遺伝子発現量は、通常酸素比でそれぞれ、T98G で 0.748 \pm 0.149、HSC-3 で 0.360 \pm 0.014、MCF-7 で 0.551 \pm 0.034 であった。1% O₂ の低酸素環境で培養された細胞における BPA 投与 2 時間後の細胞内ホウ素量は、T98G で 0.770 \pm 0.110、HSC-3 で 0.663 \pm 0.074、MCF-7 で 0.881 \pm 0.096 であり、いずれの細胞においても 2 時間後のホウ素の取り込み量は減少した。DFO 投与条件においても同様に、2 時間後のホウ素の取り込み量は減少した。MAR を用いた生細胞

中の低酸素状態のイメージングより、1% O₂の低酸素負荷条件のサンプルの蛍光強度は、通常酸素条件に比べて強く、5 μMのDFO投与条件における蛍光強度は、通常酸素条件に比べて若干強い結果となった。

(2) small interfering RNA (siRNA) による HIF-1α のノックダウン

HIF-1α の発現をノックダウンした細胞に対し、DFO 投与下にて細胞内の LAT1 の遺伝子発現量を評価したところ、発現量は HIF-1α をノックダウンしていないコントロールサンプル比でそれぞれ、T98G で 1.256 ± 0.101 、HSC-3 で 2.354 ± 0.093 、MCF-7 で 1.298 ± 0.056 となり、いずれの細胞においても LAT1 の発現量が回復した。このことから、低酸素細胞における LAT1 の発現低下に対して、HIF-1α が関与している可能性が示唆された。

(3) HIF 阻害剤を用いた低酸素細胞に対する BNCT 増感効果の検討

YC-1 を添加して 1% O₂の低酸素負荷条件にて細胞を 24 時間培養し、¹⁰B-BPA を投与して 2 時間後に中性子照射を実施したところ、YC-1 非添加群および添加群における BNCT 後の細胞生存率は、T98G で 0.473 ± 0.137 および 0.283 ± 0.071 、HSC-3 で 0.424 ± 0.062 および 0.299 ± 0.054 となり、YC-1 の添加によって中性子照射後の細胞生存率は低下し、低酸素細胞に対する BNCT の効果の増感が示された。

本研究より、低酸素細胞における BNCT の治療効果の低下には、低酸素応答により蓄積された HIF-1α による LAT1 遺伝子発現の低下が関与することが示唆された。HIF 阻害剤 YC-1 は、低酸素腫瘍細胞において ¹⁰B-BPA を用いた BNCT の抗腫瘍効果を増強した。BNCT における HIF 阻害剤の併用は、低酸素細胞に対する BNCT の治療効果を増感させる可能性がある。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計1件（うち査読付論文 1件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 1件）

1. 著者名 Takaomi Harada, Katsumi Hirose, Yuki Wada, Mariko Sato, Koji Ichise, Masahiko Aoki, Takahiro Kato, Ken Takeda, and Yoshihiro Takai	4. 巻 -
2. 論文標題 YC-1 sensitizes the antitumor effects of boron neutron capture therapy in hypoxic tumor cells	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Journal of Radiation Research	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1093/jrr/rraa024	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1件（うち招待講演 0件/うち国際学会 1件）

1. 発表者名 Takaomi Harada
2. 発表標題 Possibility of HIF-1 target therapy for the hypoxic cells resistant to BNCT
3. 学会等名 The 16th International Congress of Radiation Research (Manchester, UK) (国際学会)
4. 発表年 2019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
研究協力者	高井 良尋 (TAKAI Yoshihiro)		
研究協力者	廣瀬 勝己 (HIROSE Katsumi)		