

令和 4 年 5 月 16 日現在

機関番号：13901

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2018～2021

課題番号：18K07672

研究課題名(和文) がんの低酸素耐性・幹細胞性獲得と低酸素イメージング剤集積に関する研究

研究課題名(英文) Does acquisition of hypoxia tolerance and stemness by cancer cells affect the accumulation of a hypoxia imaging agent.

研究代表者

古川 高子 (Furukawa, Takako)

名古屋大学・医学系研究科(保健)・教授

研究者番号：00221557

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,300,000円

研究成果の概要(和文)：本研究ではNADH依存的にがん幹細胞性獲得に深く関与するCtBPに注目し、Cu-ATSMの集積に関わる、新たな治療抵抗性獲得の機序を追求した。

5% O₂で長期培養したMCF7では、CtBPとCD133の発現が顕著に増加、Cu-ATSMの集積も有意に増加して、Cu-ATSMの集積がNADH/NAD⁺比に依存するCtBPを介した性質変化を捉える可能性が示唆された。MCF7移植腫瘍においても、Cu-ATSM高集積領域でCtBPの発現が高くなる傾向が認められ、⁶⁴Cu-ATSMの集積とCtBPの活性亢進の関連性が示唆された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

放射性の銅で標識されたCu-ATSMは低酸素細胞の過還元状態を反映して集積し、低酸素PETイメージング剤の一つとして利用されているが、その集積と腫瘍の予後不良を結ぶメカニズムは明確には示されていない。今回Cu-ATSMの集積に関わる、HIF-1活性化以外の新たな治療抵抗性獲得の機序として、CtBPを介するがん幹細胞性の獲得の可能性が示され、Cu-ATSMの細胞集積に反映されるがんの特性を探る一助となった。今後Cu-ATSMを用いる診断・治療を推進する上で有用な情報となると考えられる。

研究成果の概要(英文)：High Cu-⁶⁴-ATSM accumulation in tumor was shown to predict poor prognosis. Cancer stem cell-like cells were reported to be more abundant in the area of high Cu-ATSM accumulation. Increased cellular accumulation of Cu-ATSM has also been reported to associate with increased NADH/NAD⁺ ratio, which was shown to increase the C-terminal binding protein (CtBP) activity involved in the acquisition of cancer cell stemness. In this study, we focused on CtBP, and pursued the possible mechanism of treatment resistance which can relate to the accumulation of Cu-ATSM.

In MCF7 cells conditioned to 5% O₂, both CtBP and CD133, a stem cell marker, expression and Cu-ATSM accumulation significantly increased, which suggest that Cu-ATSM may capture the changes in cancer cell characteristics mediated by CtBP dependent on high cellular NADH/NAD⁺ ratio. High levels of intratumoral Cu-ATSM accumulation was observed where CtBP expression tends to be high, which supported the in vitro results.

研究分野：分子イメージング

キーワード：放射性薬品 腫瘍イメージング 低酸素 がん幹細胞

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

固形腫瘍の低酸素領域は、放射線治療に重要なラジカル発生を抑制するだけでなく、hypoxia inducible factor-1 (HIF-1) の活性上昇などによりがん細胞の性質を変化させることで治療抵抗性を獲得することが知られている。腫瘍の低酸素領域を画像化する放射性医薬品には、FMISO、FAZA などのニトロイミダゾール系化合物と Cu-ATSM の 2 つのグループが開発されている。どちらのグループも患者の予後を予測することが報告されているものの、それらと HIF-1 の腫瘍内分布を比較すると、ある程度の重複は認められるものの一致はしない[1]。申請者らはこれまで腫瘍への Cu-ATSM の集積が何を反映しているのか、何が Cu-ATSM の集積と難治性と結びついているのか、に強い関心を持ってきたが、低酸素のマーカーとされるニトロイミダゾール系化合物や HIF-1 と異なる腫瘍内分布や、厳しい低酸素よりマイルドな低酸素状態で取り込みが高いことなど、Cu-ATSM の持つユニークな特性を十分に説明できるメカニズムを提案できずにきた。最近、長期のマイルドな低酸素が歯髄細胞の幹細胞性を増進すること[2]、NADH/NAD⁺比の上昇により、CtBP を介するエピジェネティックな変化が EMT や幹細胞性の獲得に繋がることなどを報告する論文が発表され[3]、がん細胞における低酸素や代謝の変化による NADH/NAD⁺比の上昇が、Cu-ATSM の集積と難治性の獲得をつないでいるのではないかと考え、本研究課題の着想に至った。

2. 研究の目的

がん細胞の急速な増殖は、固形がんにおいて低酸素、低栄養などの厳しい生存環境を作り出し、この環境による選択を受け、生き残ったがん細胞がより高い増殖能や治療抵抗性を持ち、転移や再発につながるとされる。このため、より厳しい低酸素状態がより強い治療抵抗性の獲得につながると考えられがちであるが、Cu-ATSM の集積が高い腫瘍内領域では厳しい低酸素状態の存在は観察されず、「適者生存」による選択が治療抵抗性獲得の主なメカニズムとは考え難い。本課題の目的は、低酸素腫瘍の診断・治療に用いられる Cu-ATSM の集積と難治性を結ぶメカニズムを明らかにし、腫瘍の低酸素状態についての理解を深めるとともに、より有効ながんの診断・治療の実現につなげることである。

3. 研究の方法

ヒトがん細胞株である MCF7 と U87MG を高グルコース培地中 O₂濃度 20% (コントロール)、低グルコース培地中 O₂濃度 20% (低グルコース)、高グルコース培地中 O₂濃度 5% (マイルドな低酸素)の 3 条件で 3 か月以上培養し、マイルドな低酸素及び低グルコースに順応した培養細胞とコントロール細胞を準備した。各条件で培養した細胞の CtBP2 およびがん幹細胞マーカーとして CD133 の発現量をウエスタンブロッティングで評価した。また各条件で培養した細胞への ⁶⁴Cu-ATSM と ¹⁸F-FAZA の集積を比較した。

さらに、in vivo での検討を行うため、免疫不全マウスを用い MCF7 腫瘍モデルを作製した。3.7MBq の ⁶⁴Cu-ATSM を尾静脈より投与し、1 時間後に安楽死させ、腫瘍凍結切片のオートラジオグラフィを行った。また、前記切片から 50µm 以内の領域の切片で CtBP2 免疫組織染色を行い、オートラジオグラフィと比較した。

4. 研究成果

a) CtBP2 およびがん幹細胞マーカーの発現変化

低グルコース条件、マイルドな低酸素条件で培養した MCF7 と U87MG の CD133、CtBP2 の発現をウエスタンブロッティング法で検討したところ、MCF7 では、CD133、CtBP2 の発現がともに低グルコース条件で緩やかに増加マイルドな低酸素条件で顕著に増加した。U87MG では、CD133 の発現は、低グルコース条件、マイルドな低酸素条件ともに減少したが、CtBP2 の発現は、両条件ともに顕著な変化は見られなかった。

b) ⁶⁴Cu-ATSM および¹⁸F-FAZA の細胞集積変化

低グルコース条件で培養した MCF7 では、コントロールの MCF7 と比較して ⁶⁴Cu-ATSM の集積に有意な差が見られなかったのに対し、マイルドな低酸素条件で培養した MCF7 では、コントロールの MCF7 と比較して ⁶⁴Cu-ATSM の集積が有意に増加した。また、U87MG では、低グルコース条件での培養で、コントロールの U87MG と比較して ⁶⁴Cu-ATSM の集積に有意な差は見られず、マイルドな低酸素条件で培養した場合も、コントロールの U87MG と比較して ⁶⁴Cu-ATSM の集積が増加傾向を示すも有意な差には至らなかった。

¹⁸F-FAZA の集積に関しては、MCF7 および U87MG どちらの細胞でも、マイルドな低酸素条件で培養した細胞でコントロールの細胞と比較して ¹⁸F-FAZA の集積が有意に増加した。

細胞質の NADH/NAD⁺比の上昇を招く培地組成の変化では、⁶⁴Cu-ATSM の集積は有意な増加を示したが、¹⁸F-FAZA の集積には有意な差は見られなかった。

c) ^{64}Cu -ATSM の高集積領域における CtBP2 の発現

MCF7 腫瘍切片内の ^{64}Cu -ATSM の分布を示すオートラジオグラフィでは、 ^{64}Cu -ATSM の高集積領域が腫瘍辺縁部で、低集積領域は主に腫瘍中心部で観察され、この切片の隣接切片の免疫染色では腫瘍辺縁部の CtBP2 発現が腫瘍中心部より高い傾向が見られた。

以上の結果を見ると、培養細胞において、がん幹細胞マーカーとされる CD133 と、がん幹細胞性の獲得に関与するとされる CtBP2 の関係をみた実験では低グルコース条件で培養した MCF7 の CD133 および CtBP2 の発現はともに緩やかに増加し、マイルドな低酸素条件で培養した MCF7 の CD133 および CtBP2 の発現はともに顕著に増加した。このことは、MCF7 において CtBP2 とがん細胞のがん幹細胞性獲得との関連を示すものと考えられる。マイルドな低酸素条件での培養は歯髄幹細胞でより幹細胞らしい性質を獲得すると報告されており[2]、本研究で得られた結果はこの報告と一致するものである。一方、一般に低グルコース条件での培養は NADH/NAD⁺比を低下させ、CtBP の発現も低下させると報告されており[3]、今回得られた結果とは相違している。低グルコース条件で培養した細胞への ^{64}Cu -ATSM の集積に有意な差が見られなかったが、マイルドな低酸素条件で培養した細胞への ^{64}Cu -ATSM の集積は有意に増加している。このことから、我々は培地のグルコース濃度の変化による NADH/NAD⁺比の変化は小さく、がん細胞のエピジェネティックな変化を促進しないが、低酸素環境下での培養による NADH/NAD⁺比の変化はこれに比べて大きく、がん細胞のエピジェネティックな変化を促進するのではないかと考えている。以上のことから、乳がん由来の MCF7 細胞において、 ^{64}Cu -ATSM の細胞集積は CtBP の活性亢進と関連づけられる可能性が示された。

しかしながら、低グルコース条件およびマイルドな低酸素条件で培養した U87MG では、CtBP2 の発現に顕著な差は見られなかったのに対し CD133 の発現は減少しており、以前報告された CtBP とがん幹細胞性獲得との関係とは異なる結果を示した。CD133 は前立腺、乳房、肝臓などさまざまながん細胞のがん幹細胞性を識別するマーカーとして知られているが、ヒト結腸がん細胞である HT29 において、CD133 は単独ではがん幹細胞マーカーとして使用できず、別のがん幹細胞マーカーと併用する必要があるという報告があり、がん細胞の種類によりがん幹細胞を識別するためのタンパク質に違いがある可能性がある。このことは、CtBP とがん幹細胞性獲得の間には細胞の種類に依存した他の要因が関与する可能性をうかがわせる。

これらの結果から、 ^{64}Cu -ATSM の細胞集積は、高 NADH/NAD⁺比に依存する CtBP を介したがん細胞の性質変化を捉えている可能性が示されたが、マイルドな低酸素条件で培養した細胞への ^{18}F -FAZA の集積も有意に増加したことから、 ^{18}F -FAZA もまた ^{64}Cu -ATSM と同様に高 NADH/NAD⁺比を介したがん細胞の性質変化を捉えている可能性が考えられた。一方、乳酸塩を加えた培地においてピルビン酸塩を加えた培地よりも、 ^{64}Cu -ATSM の集積は有意に増加したが、 ^{18}F -FAZA の集積には有意な差は見られなかった。乳酸塩を加えた培地では NADH/NAD⁺比は上昇し、ピルビン酸塩を加えた培地では NADH/NAD⁺比は低下するとされている[4]。このことから ^{18}F -FAZA の細胞集積が示すがん細胞の性質変化は、 ^{64}Cu -ATSM の細胞集積が示すような高 NADH/NAD⁺比に依存する CtBP を介した性質変化ではない別の要因が関与している可能性が考えられた。

ここまでの *in vitro* 実験で ^{64}Cu -ATSM の細胞集積と CtBP の活性亢進との関連が示唆された MCF7 細胞について、*in vivo* 実験にて腫瘍内の ^{64}Cu -ATSM の集積領域と CtBP2 の発現の関係を見た実験では、 ^{64}Cu -ATSM は腫瘍辺縁部で高集積を示し、かつその領域で CtBP2 の発現が高くなる傾向を示している。腫瘍辺縁部での ^{64}Cu -ATSM の高集積はその還元的な集積に深く関わる NADH の酸化型/還元型比を蛍光で捉えると、腫瘍の辺縁部が中心部よりも還元された状態であるという報告[15]と一致し、 ^{64}Cu -ATSM 高集積領域における CtBP2 の高発現は移植大腸がん細胞における ^{64}Cu -ATSM の高集積領域にがん幹細胞マーカー CD133 陽性の細胞が他の領域に比べて高密度に存在するという報告[6]との関連を示した。このことから、*in vivo* 実験においても、前述の *in vitro* 実験と同様に ^{64}Cu -ATSM の集積領域と CtBP の活性亢進領域との関連性が示唆された。したがって、我々は低酸素イメージング用 PET 薬剤 ^{64}Cu -ATSM の集積領域は、「低酸素環境下での HIF-1 活性亢進によるがん細胞の性質変化」という低酸素腫瘍と治療抵抗性獲得を結び上で一般化された道筋ではなく、「還元的な環境下での CtBP 活性亢進によるがん細胞の性質変化」という低酸素環境が間接的に関与した治療抵抗性獲得への道筋を捉えていると考えている。

本研究では、細胞の培養条件の違いによる低酸素イメージング用 PET 薬剤 ^{64}Cu -ATSM と ^{18}F -FAZA の細胞集積およびがん幹細胞マーカー CD133 と CtBP の発現の変化について検証した。どちらの低酸素イメージング剤も低酸素環境下で培養した細胞への集積が有意に増加しており、低酸素環境によるがん細胞の性質変化を捉える可能性を示した一方、 ^{64}Cu -ATSM の集積が増加する高 NADH/NAD⁺比において ^{18}F -FAZA の集積は増加せず、 ^{64}Cu -ATSM の集積と ^{18}F -FAZA の

集積はそれぞれ異なった経路でのがん細胞の性質変化を捉えている可能性を示唆した。
さらに、in vivo 実験において ^{64}Cu -ATSM の高集積領域で CtBP の高発現が観察されたことから、
我々は ^{64}Cu -ATSM の集積は高 NADH/NAD⁺比に依存する CtBP を介した経路でのがん細胞の性質変化を捉えている可能性を提案する。

(参考文献)

- [1] Furukawa T, et al. Oncol Rep. 2015 Sep;34(3):1379-87.
- [2] Ahmed NE, et al. Sci Rep. 2016 Oct 14;6:35476.
- [3] Di LJ1, et al. Nat Commun. 2013;4:1449.
- [4] Sun F, et al. PLoS ONE 2012 May; 7(5): e34525.
- [5] Xu H, et al. J Biomed Opt. 2010 May-Jun; 15(3): 036010. DOI: 10.1117/1.3431714.
- [6] Yoshii Y, et al. Nucl Med Biol. 2011 Feb; 38(2): 151-7.

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計2件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 竹川弘基, 小栗良太, 平松倭加彦, 森哲也, 牧野顕, 清野泰, 古川高子
2. 発表標題 64Cu-ATSMの集積と細胞のがん幹細胞性獲得の関係に関する検討
3. 学会等名 第14回日本分子イメージング学会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 竹川弘基, 小栗良太, 辻厚至, 古川高子
2. 発表標題 18F-FAZAの集積と低酸素による細胞の性質変化との関係に関する検討
3. 学会等名 第39回日本核医学技術学会総会学術大会
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
研究分担者	清野 泰 (Kiyono Yasushi) (50305603)	福井大学・高エネルギー医学研究センター・教授 (13401)	

	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	竹川 弘基 (Takekawa Koki)	名古屋大学・医学系研究科・大学院生 (13901)	

6. 研究組織（つづき）

	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	小栗 良太 (Oguri Ryota)	名古屋大学・医学系研究科・大学院生 (13901)	
研究協力者	平松 倭加彦 (Hiramatsu Wakahiko)	名古屋大学・医学系研究科・大学院生 (13901)	
研究協力者	浦 博貴 (Ura Hiroki)	名古屋大学・医学系研究科・大学院生 (13901)	

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関