

令和 4 年 5 月 9 日現在

機関番号：14501

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2018～2021

課題番号：18K09788

研究課題名(和文) 治療抵抗性の改善と副作用の軽減を目指した革新的ながん治療法の開発応用

研究課題名(英文) Development of cancer therapies to improve resistance and reduce side effects

研究代表者

長谷川 巧実 (Hasegawa, Takumi)

神戸大学・医学研究科・講師

研究者番号：50546497

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,200,000円

研究成果の概要(和文)：本研究では、炭酸ガスを効率良く生体内に吸収させることができる特殊なゲルを用いた局所的炭酸ガス投与方法を用いることで、口腔扁平上皮癌に対する放射線治療の併用効果を確認した。併用群においては、放射線照射によって誘導される活性酸素関連因子であるanti-human ROS modulator 1とcaspase8に加え、炭酸ガス投与によるミトコンドリア経路のアポトーシス関連因子(PARP, caspase 3, 9)の発現亢進を認めた。したがって、経皮的炭酸ガス投与は口腔扁平上皮癌に対し腫瘍内低酸素環境を改善し、放射線療法と併用することで腫瘍増殖抑制効果の増大が期待できることが示唆された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

治療抵抗性を示す原因として腫瘍内の低酸素環境が重要であるが、腫瘍内低酸素環境を有効かつ効率的に改善する方法は確立していない。本研究では、局所的炭酸ガスによる効率的で、低リスクな治療法の確立を目指すもので学術的意義が示された。また、低酸素環境を改善することにより治療抵抗性が改善され、既存治療である放射線治療との併用効果を確認できた。今後、臨床応用として、腫瘍縮小効果の増大とともに、副作用軽減効果が見込める低コストな治療法が提供できる可能性があり、社会的意義があると考えられる。

研究成果の概要(英文)：In the present study, the combination of transcutaneous CO₂ and radiation therapy significantly inhibited tumor growth compared with other treatments using a local carbon dioxide gas administration method. In the combination group, anti-human ROS modulator 1 and caspase8 were increased by radiation therapy (RT), and mitochondrial apoptosis (PARP, caspase 3, 9) were increased by transcutaneous CO₂ therapy. These results indicated that transcutaneous CO₂ could potentially improve the antitumor effect of RT by decreasing the intratumoral hypoxia and increasing the mitochondrial apoptosis. Our findings indicated that CO₂ therapy may be a novel adjuvant therapy in combination with RT for OSCC.

研究分野：炭酸ガス

キーワード：炭酸ガス 口腔癌 放射線 治療抵抗性

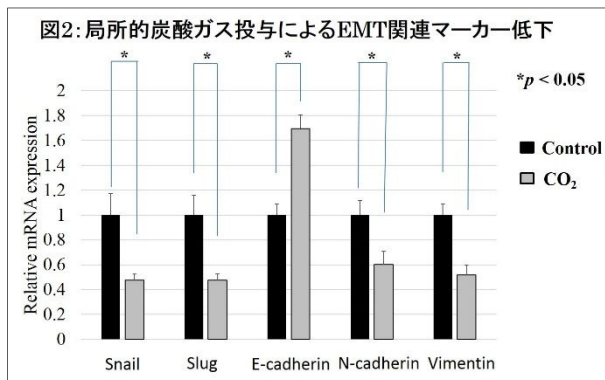
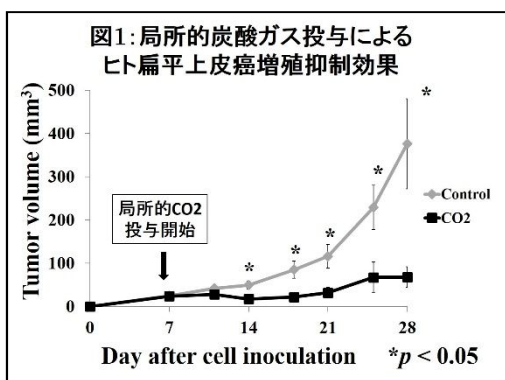
1. 研究開始当初の背景

頭頸部扁平上皮癌に対する根治手術や化学放射線療法は、患者に苦痛を強いることとなり、特に高齢者においては、その毒性から適応外となることも少なくない。近年では、80歳以上の患者に標準治療を施行すると、健康余命が大幅に短縮されとの報告(Yamada et al. Oral Oncol. 2017)もあり、癌治療における副作用軽減や合併症対策は急務である。

一方、癌の治療抵抗性の原因のひとつとして、癌が生体の免疫システムから回避する免疫抑制能があげられる。これをターゲットとした抗PD-L1抗体など分子標的治療薬が高い効果をあげているが、これらの薬剤は非常に高額で、医療費圧迫などの社会的問題になっている。

近年われわれは、炭酸ガスを効率良く生体内に吸収させることができる特殊なゲルを用いた局所的炭酸ガス投与法を用いることで、局所の酸素供給を増やし、細胞内のミトコンドリア量が増加することを証明した(Oe, Hasegawa et al. Biochem Biophys Res Commun. 2011)。さらに、われわれは、細胞内のミトコンドリアの量に注目し、実験を行った結果、ヒト口腔扁平上皮癌のミトコンドリア量やその機能維持に関わる因子(PGC-1 α , TFAM)が、正常組織内より少ないことを確認した(Takeda Hasegawa et al. Head & Neck. 2016)。

そこで、ヌードマウスに移植したヒト扁平上皮癌に対し、局所的炭酸ガス投与を行ったところ、腫瘍内低酸素環境改善とミトコンドリア量増加によるミトコンドリア経路のアポトーシスの活性化による癌の増殖抑制が確認された(図1) (Takeda, Hasegawa et al. PLoS One. 2014)。さらには、癌幹細胞や転移にも関わりの深い上皮間葉移行(EMT)の低下によるリンパ節転移の抑制も確認された(図2) (Iwata, Hasegawa et al. Int J Oncol. 2016)。しかし、局所的炭酸ガス投与による治療抵抗性に対する効果や、既存の治療への併用効果は不明である。



2. 研究の目的

本研究は、局所的炭酸ガス投与による放射線治療への併用効果を観察することを目的としている。

3. 研究の方法

(1) in vitro における局所的炭酸ガス投与と放射線治療との併用効果

HSC-3 における放射線照射の抗腫瘍効果および 50% 阻害線量 (IC₅₀)

ヒト口腔扁平上皮癌由来細胞 (HSC-3) を 25cm² フラスコ内で培養、その後線量の異なる放射線照射 (0 Gy, 2 Gy, 8 Gy) を行い、それぞれ 1000 cell/well ずつ 6 well プレートに播種。2 週間培養後にギムザ染色を行い、コロニー数を測定し、放射線照射線量とコロニー数の関連性および 50% 阻害線量 (IC₅₀) を調査した。

放射線照射の抗腫瘍効果におけるアポトーシス活性と活性酸素産生の関連性

非照射および IC₅₀ 照射の HSC-3 に対し APO-Direct kit according to the manufacturer's protocol および ROS production was evaluated using anti-human ROS modulator 1 (ROMO-1) を用いて FACS Calibur™ flow cytometer によるアポトーシス関連因子の発現と活性酸素 (ROS) の発現を測定し、照射線量との関連性を検討した。

(2) in vivo における局所的炭酸ガス投与と放射線治療との併用効果

7 週齢免疫不全マウスを、経皮的炭酸ガス投与群 (CO₂ 群)、放射線照射群 (RT 群)、併用療法

群 (combination 群) そして対照群の 4 群にランダムに分類。HSC-3 をマウス背部皮下に移植し、移植 14 日後より週 2 回、経皮的炭酸ガス投与 (20 分/回) あるいは放射線照射 (IC₅₀/回) を行い、移植 28 日後まで計 4 回行った。各回の腫瘍体積とマウスの体重を測定し、実験終了直後に採血、その後腫瘍組織を採取し 4 群で以下について比較を行った。

Labo data による白血球数の比較

採取した血液(10 μ L)を Turk's solution (190 μ L)で希釈し、hemocytometer を用いて測定した。

Immunohistochemical analysis による HIF-1 α と ROMO-1 発現の比較

採取した組織をホルマリン固定、パラフィン包埋した。rabbit anti-human HIF-1 α antibody (1:1000) (Abcam) および anti-human ROS modulator 1 (ROMO-1) antibody (1:1000) (Abcam)を用いて染色し、BZ-8000 confocal microscope (Keyence, Osaka, Japan)による測定を行った。

Immunofluorescence staining によるアポトーシス活性の比較

APO-Direct kit following the manufacturer's protocol (BD Pharmingen)を用いて染色し、BZ-8000 confocal microscope による測定を行った。さらに ImageJ software, version 1.47 (National Institutes of Health, Bethesda, MD, USA)を用いて定量評価も行った。

Immunoblot analysis によるアポトーシス活性の比較

採取した組織から細胞溶解物を抽出し、lysis buffer に混濁した後、遠心分離によりタンパクを抽出。anti-human caspase-8 antibody (1:1000) (Cell Signaling Technology, Danvers, MA, USA)、anti-human caspase-9 antibody (1:1000) (Cell Signaling Technology)、anti-human caspase-3 antibody (1:1000) (Cell Signaling Technology)、anti-human PARP antibody (1:1000) (Cell Signaling Technology)、anti-human α -tubulin antibody (1:2000) (Sigma-Aldrich)を用いてウェスタンブロッティング法を行い、Chemilumino analyzer LAS-3000 mini (Fujifilm, Tokyo, Japan)を用いて検出した。さらに ImageJ software を用いて定量評価も行った。

すべての測定結果は Stat View-J 4.5 software (HULINKS Inc., Tokyo, Japan)で、5%の有意差検定を行った。

4 . 研究成果

(1)in vitro における局所的炭酸ガス投与と放射線治療との併用効果

細胞レベルでは、HSC-3 は照射線量の増大に伴いコロニー数の減少を認め、IC₅₀は 5.0 Gy であった(図 3)。そして 5.0 Gy を照射した HSC-3 において、活性酸素関連因子である ROMO-1 とアポトーシスの関連性が示唆された(図 4)。

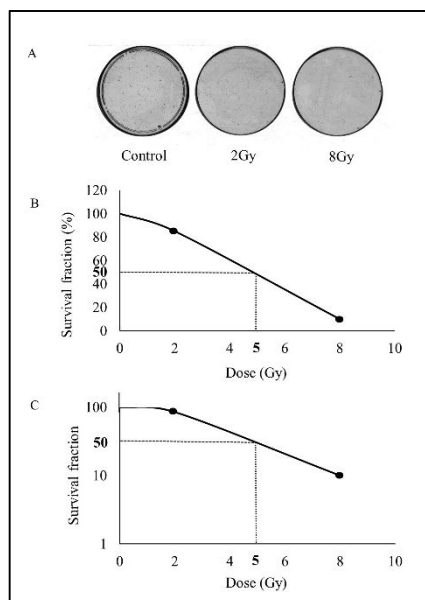


図 3

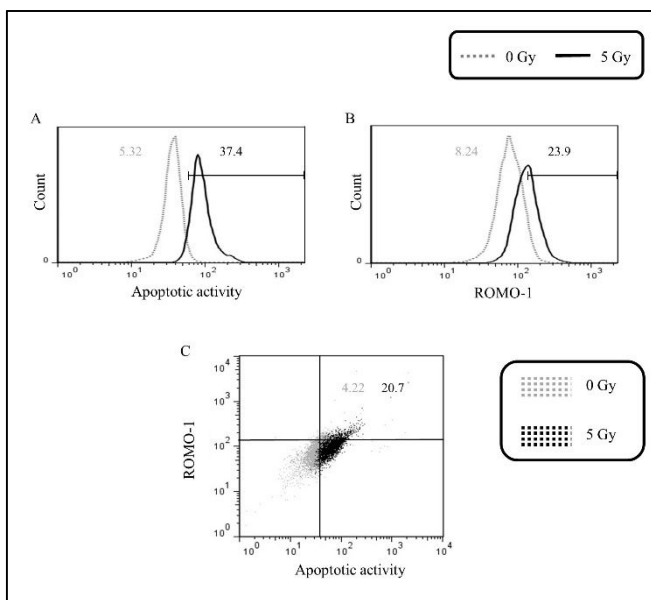


図 4

(2)in vivo における局所的炭酸ガス投与と放射線治療との併用効果

各回の治療時に腫瘍体積を測定し 4 群で比較検討を行ったところ、combination 群において最も腫瘍増殖抑制効果を認めた(図 5)。また治療の各回に測定した体重は 4 群において有意な差は認めず、実験終了時に行った採血結果における白血球数において、RT 群は CO₂ 群と比較して

有意に減少を認めた(図 6)。

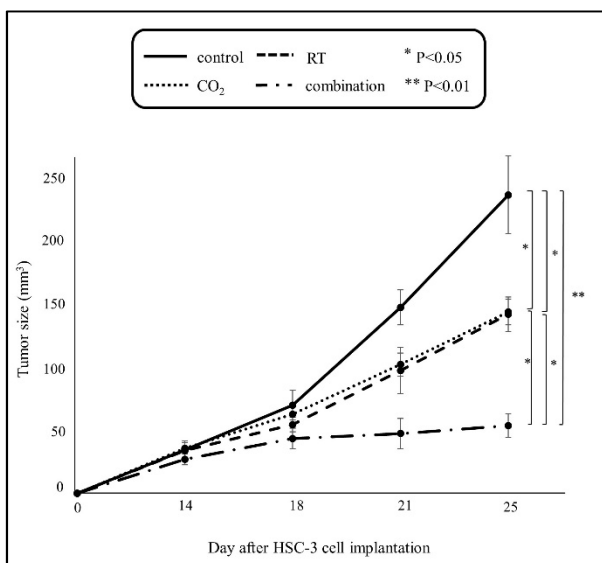


図 5

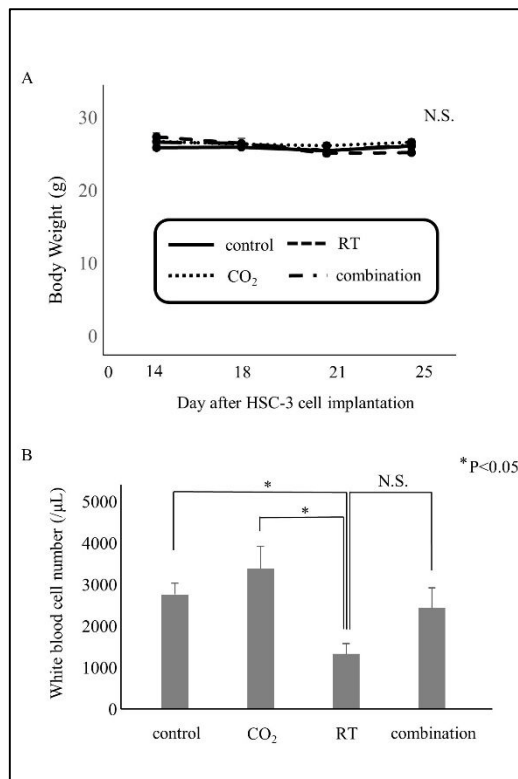


図 6

さらに採取した腫瘍組織を用いて比較検討を行ったところ、低酸素誘導因子 (HIF-1) は経皮的炭酸ガス投与を行った CO₂ 群と combination 群においてほとんど検出されず、ROMO-1 は放射線照射を行った RT 群および combination 群において著明に検出された(図 7)。さらに経皮的炭酸ガス投与を行った CO₂ 群および combination 群においてアポトーシス活性の増大を認め、combination 群はミトコンドリア経路のアポトーシス関連因子 (PARP, caspase 3, 9) の発現の亢進に加え caspase8 の発現の亢進を認めた(図 8)。

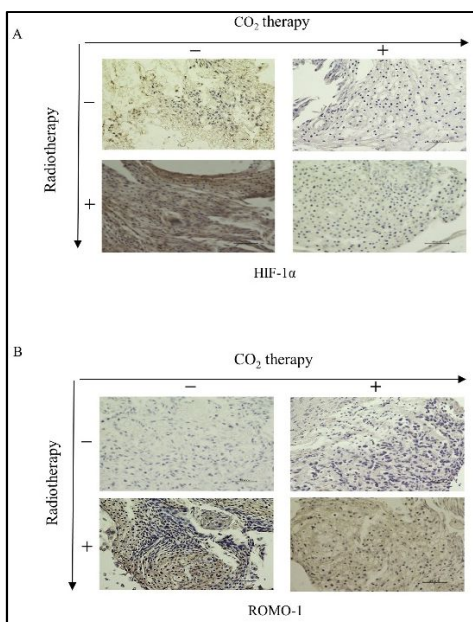


図 7

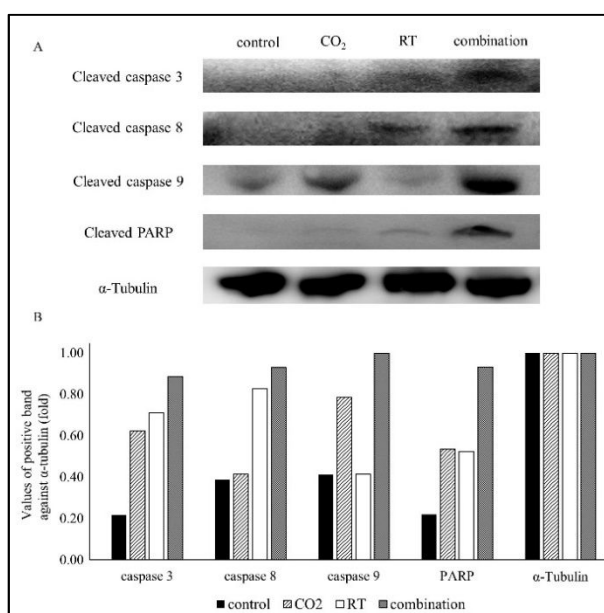


図 8

結論および考察、今後の展望

本研究結果から、経皮的炭酸ガス投与は口腔扁平上皮癌に対し腫瘍内低酸素環境を改善し、放射線療法と併用することで腫瘍増殖抑制効果の増大が期待できることが示唆された。その概要

としては放射線照射により ROS が産生され、デスレセプター経路のアポトーシスが促進されること、さらに経皮的炭酸ガス投与によるミトコンドリア経路のアポトーシスも促進されることが推察された。さらに併用療法による著明な副作用は認めなかった。今後、経皮的炭酸ガス投与は口腔癌放射線療法における有効な併用療法となる可能性が示唆された。

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 長谷川巧実、武田大介、斉藤泉、岩田英治、笥 康正、榊原晶子、明石昌也、南川勉、古森孝英
2. 発表標題 効率的な低酸素環境改善による口腔癌の新規治療法の開発と治療抵抗性の改善効果
3. 学会等名 第63回日本口腔外科学会総会・学術大会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 長谷川巧実、武田大介、斉藤 泉、岩田英治、笥康正、榊原晶子、明石昌也、南川勉、古森孝英
2. 発表標題 炭酸ガスを使用した効率的な低酸素環境改善による口腔癌の新規治療法の開発と治療抵抗性の改善効果
3. 学会等名 第37回日本口腔腫瘍学会総会
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	明石 昌也 (AKASHI MASAYA) (40597168)	神戸大学・医学研究科・教授 (14501)	
研究分担者	武田 大介 (TAKEDA DAISUKE) (80755637)	神戸大学・医学部附属病院・助教 (14501)	

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
---------	---------