

令和 3 年 4 月 27 日現在

機関番号：14301

研究種目：若手研究

研究期間：2019～2020

課題番号：19K17137

研究課題名（和文）血清アルブミンの酸化度に基づくがんの放射線感受性予測法の開発

研究課題名（英文）Prediction of the radiosensitivity against cancer based on the redox balance of serum albumin

研究代表者

井上 実（Inoue, Minoru）

京都大学・医学研究科・助教

研究者番号：20826010

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）：血清アルブミンの酸化は、放射線治療効果を予測する因子ではないことが分かった。しかし、血清アルブミンの酸化が強く見られる膵がん症例では、好中球細胞外トラップ(NETs)の形成および遠隔臓器再発が有意に多く、全生存期間も短いことが分かった。現在、検体数を追加した検証の後、論文投稿を予定している。膵がんとNETsに関連した研究として、膵がんの新規治療薬候補として知られる5-(N-ethyl-N-isopropyl)-Amiloride (EIPA) がナトリウム・カルシウム交換体の阻害を通じて、非炎症性にNETsを誘導する事を明らかにした。本結果はRedox Biology誌に採択された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究成果の社会的意義として、血清アルブミンの酸化度を治療前に測定する事で、膵がん患者の予後を予測し得ることが挙げられる。今後、同予測に応じた治療内容の選択が可能となるかもしれない。本研究成果の学術的意義として、膵がんの転移におけるNETsの重要性が示唆された事から、NETsの生成機構の解明に関する基礎研究の促進につながる事が挙げられる。これにより、NETs阻害剤を用いた転移抑制戦略への展開が期待される。

研究成果の概要（英文）：We demonstrated that oxidation of serum albumin is not associated with the efficacy of radiotherapy for the patients with pancreatic cancer. However, albumin oxidation is associated with the higher plasma NETs level, higher proportion of distant metastasis, and lower overall survival. We will report the result as a research article after all of the samples are examined. We also investigated potent triggers of NETs in pancreatic cancer. An amiloride analog 5-(N-ethyl-N-isopropyl)-Amiloride (EIPA) is known to inhibit the growth of pancreatic cancer cells and thus is considered to be a promising drug for pancreatic cancer. However, we demonstrated that EIPA trigger NETs release via inhibition of sodium-calcium exchange. The research article was accepted by Redox Biology.

研究分野：放射線治療

キーワード：がん 放射線治療 血清アルブミン 好中球細胞外トラップ ナトリウム・カルシウム交換体

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

血清アルブミンは血中に最も豊富に存在するタンパクで、34番目のアミノ酸 システイン (Cys-34) が遊離チオールを有することから抗酸化物質として機能する (Halliwell B., *Biochem Pharmacol.* 1998)。その血中濃度は、同様に抗酸化物質として知られる還元型グルタチオンの100倍にも及ぶため、血清アルブミンは血中の主たる抗酸化物質と言える。Cys-34の遊離チオールは、生体内の活性酸素種 (Reactive oxygen species: ROS) の分解と引き換えに、スルホン酸などへ酸化され、抗酸化能を失う (血清アルブミンの酸化)。がん病変に対して行われる放射線治療では、放射線の電離作用により ROS が過剰に産生され、結果として、がん細胞の DNA は損傷され、細胞死が誘導される (Hall EJ. *Radiobiology for the radiologist*, 3rd ed. Lippincott, 1988)。よって、血清アルブミンの抗酸化能は放射線治療の殺腫瘍効果を減弱している可能性があり、血清アルブミンの酸化度が放射線治療施行患者の予後因子となっている可能性がある。

2. 研究の目的

本研究は、血清アルブミンの抗酸化能が放射線治療の殺腫瘍効果を低下させる、という仮説を検証するとともに、血中の血清アルブミンの酸化度が、放射線治療施行症例の予後因子となり得るかについて実証することを目的とする。

3. 研究の方法

3-1. In vitro での血清アルブミンの酸化度と放射線感受性との関連

通常培養条件に還元型および酸化型の血清アルブミンを添加し、がん細胞に照射を施す。放射線治療が頻度高く施行される肺・膵・頭頸部・大腸がんの細胞株を用いる。放射線治療の殺腫瘍メカニズムで重要なイベントである下記 a), b) および照射後の細胞生存割合 c) と、血清アルブミン酸化度との相関性を検証する。

- a) 照射後の細胞内 ROS レベル (ROS プロブ DCFDA による蛍光測定)
- b) 照射後のゲノム DNA 二本差切断の程度 (Western blot による γ -H2AX 発現の定性評価)
- c) 照射後のがん細胞のコロニー形成能

3-2. In vivo での血清アルブミンの酸化度と放射線感受性との関連

上記 1) で用いた細胞株の皮下移植マウスモデルを用いる。腫瘍生着後、MSA の遊離チオールを酸化させるヨードアセトアミドを投与し、原発腫瘍へ照射を行い、照射後の腫瘍体積を検証する。

3-3. がん患者における血清アルブミン酸化度と放射線感受性との関連

申請者所属施設のバイオバンクに保存されている放射線治療施行症例の血漿検体を用いて、血清アルブミン酸化度を HPLC により解析し、放射線治療効果、無増悪生存割合、全生存割合との関連性を後ろ向きに解析する。対象がん種は、1) および 2) で血清アルブミンの酸化度と放射線感受性との関連が示されたがん種とする。

4. 研究成果

3-1. In vitro での血清アルブミンの酸化度と放射線感受性との関連

肺がん細胞株 (A549)、膵がん細胞株 (MiaPaCa2, BxPC3)、頭頸部がん細胞株 (FaDu, CAL-33)、大腸がん細胞株 (WiDr, HCT116) における、還元型および酸化型血清アルブミン含有培地での照射後の ROS レベル、 γ -H2AX の発現、細胞生存割合を検証した。MiaPaCa2 を除く細胞株において、還元型および酸化型血清アルブミンの両培養条件間で ROS レベル、 γ -H2AX の発現、細胞生存割合のいずれにおいても有意差を認めなかった。MiaPaCa2 では、酸化型血清アルブミン培養群において、照射後に γ -H2AX の発現および細胞死割合の増加を認めたが (図 1, 2)、ROS レベルは酸化型、還元型血清アルブミン両群において、有意差を認めず、ROS とは異なるメカニズムで γ -H2AX 発現の上昇および細胞死の増加で起こっていることが示唆された。現在までそのメカニズムを継続してきたが、明らかなものを見つけることはできていない。

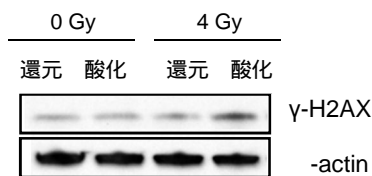


図 1. MiaPaCa2 での γ -H2AX 発現

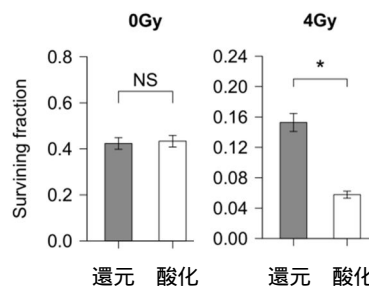


図 2. MiaPaCa2 での細胞生存割合

3-2. In vivoでの血清アルブミンの酸化度と放射線感受性との関連

上記 3-1 で有意差を認めた MiaPaCa2 を本実験に用いた。MiaPaCa2 をヌードマウスの皮下に移植し、皮下腫瘍を形成させた後、ヨードアセトアミドを腹腔内に2日おきに投与し、血清アルブミンを酸化させた。ヨードアセトアミド投与1週間後、皮下腫瘍に8 Gyの線照射を行い、その後の腫瘍体積の推移を検証した(図3)。上記 3-1 で得られた In vitroの結果と異なり、血清アルブミン酸化群と対照群との間で、照射後の腫瘍の増殖速度に有意差は認めなかった。本結果は、血清アルブミンの抗酸化能は放射線治療効果に影響を及ぼさないことを示唆している。

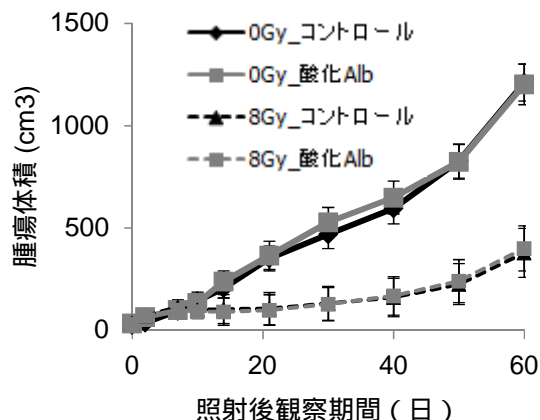


図3. MiaPaCa2 皮下腫瘍の照射後変化

3-3. がん患者における血清アルブミン酸化度と放射線感受性との関連

上記 3-1 および 3-2 の結果からは、血清アルブミンの酸化度は放射線治療の殺腫瘍効果に影響を及ぼさないと考えられるが、実際のがん症例では異なる結果が得られる可能性も捨てきれないため、当院で根治的放射線治療を施行した膵がん症例の解析を行った(課題名:膵がんの化学放射線治療における新規バイオマーカーとしての血清アルブミン酸化度の意義 [当院医の倫理委員会承認番号: R1831])。50例の解析の結果、血清アルブミンの酸化度と放射線治療効果とに有意な相関は認められなかった。しかし、血清アルブミンの酸化が強い症例、つまり、還元型血清アルブミン濃度が低い症例では、還元型血清アルブミン濃度が高い症例と比べ、有意に全生存割合ならびに無遠隔臓器再発生存割合が低いことが判明した(図4, 5)。遠隔臓器転移再発が多い原因として、転移ニッチとして機能することが知られている好中球細胞外トラップ(Neutrophil extracellular traps [NETs])に着目し、血漿中の NETs を測定したところ、還元型血清アルブミン濃度が低い症例では、還元型血清アルブミン濃度が高い症例と比べ、有意に血漿中の NETs が多く認められ、NETs が転移促進の一因となっていることが示唆された。現在、あと5例の追加検体を解析しているところである。これらの結果を併せて最終的な結果を導出する予定である。

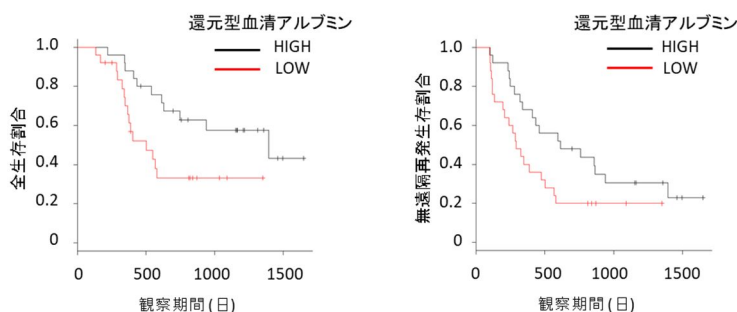


図4(左), 5(右). 膵がん根治的放射線施行症例の予後因子としての血清アルブミン酸化度の意義

以上より、膵がん症例の遠隔転移にいて NETs の重要性が示唆されたため、膵がんの新規治療薬として基礎研究の分野で注目されているマクロピノサイトーシス阻害剤 (Comisso C. *et al.*, *Nature*, 2013) と NETs との関連性についても本研究期間で検証を行った。マクロピノサイトーシス阻害剤として知られる 5-(N-エチル-N-イソプロピル)アミロライド(EIPA)は、膵がん細胞の血清アルブミン取込みを阻害し、栄養枯渇状態にすることで、細胞死を誘導する (Comisso C. *et al.*, *Nature*, 2013)。EIPA 投与によって、好中球も同様にアルブミン取込みが阻害されれば、細胞内の遊離チオール源が不足し、NETs の誘導が阻害され得る (Inoue M *et al.*, *Nat Commun*, 2018)。In vitro で好中球に EIPA を作用させたところ、強い NETs 誘導が認められた(図6)。興味深い事に、EIPA の NETs 誘導メカニズムは、血清アルブミンの取込み阻害ではなく、ナトリウム・カルシウム交換体の阻害による細胞内カルシウム濃度の上昇であった(図7)。本成果は、Redox Biology 誌に 2021 年 4 月 19 日に採択された。

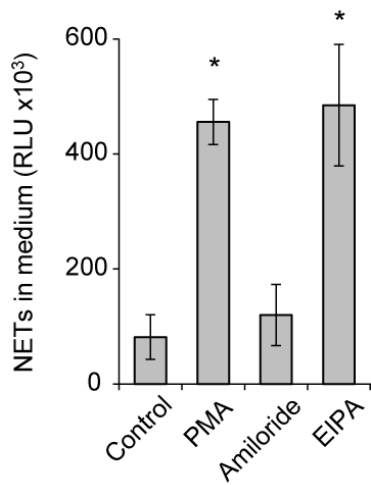


図 6. EIPA による NETs 放出誘導

PMA : Phorbol 12-Myristate 13-Acetate
 NETs 放出の陽性コントロールとして
 使用

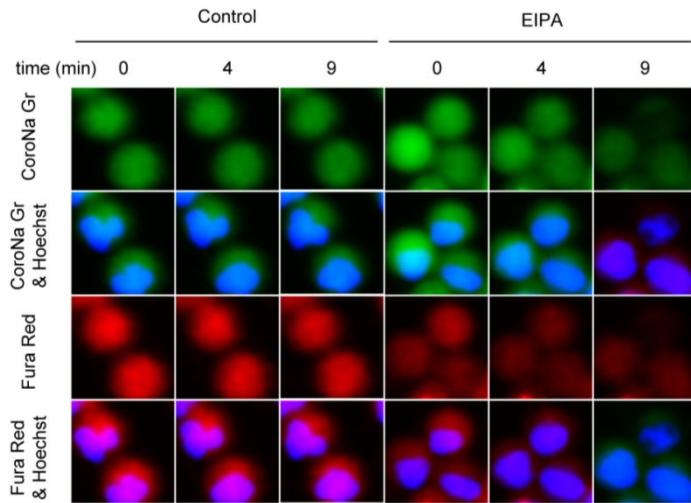


図 7. EIPA による細胞内 Na⁺低下/Ca²⁺増加

CoroNa Gr:細胞内 Na⁺インジケーター
 蛍光の低下は細胞内 Na⁺低下を反映
 Fura Red:細胞内 Ca²⁺インジケーター
 蛍光の低下は細胞内 Ca²⁺増加を反映

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 1件/うちオープンアクセス 1件）

1. 著者名 Minoru Inoue, Masahiro Enomoto, Michio Yoshimura, Takashi Mizowaki	4. 巻 In press
2. 論文標題 Pharmacological inhibition of sodium-calcium exchange activates NADPH oxidase and induces infection-independent NETotic cell death	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Redox Biology	6. 最初と最後の頁 In press
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.redox.2021.101983	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 該当する

〔学会発表〕 計1件（うち招待講演 0件/うち国際学会 0件）

1. 発表者名 井上 実, 吉村 通央, Scott V. Bratman, Fei-Fei Liu, 溝脇 尚志
2. 発表標題 抗NETs療法による転移性肺腫瘍の予防戦略
3. 学会等名 第58回癌治療学会学術集会
4. 発表年 2020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
---------------------------	-----------------------	----

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