

令和 5 年 6 月 8 日現在

機関番号：30109

研究種目：若手研究

研究期間：2020～2022

課題番号：20K15655

研究課題名（和文）イヌ腫瘍に対するミトコンドリア代謝阻害薬の放射線増感効果に関する臨床研究

研究課題名（英文）A clinical study on the radiosensitizing effect of mitochondrial metabolism inhibitors on canine tumors

研究代表者

出口 辰弥（Deguchi, Tatsuya）

酪農学園大学・獣医学群・助教

研究者番号：10849962

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 2,400,000円

研究成果の概要（和文）：本研究は、マウスの移植腫瘍組織、および犬の自然発生腫瘍において、Seahorse XFp Analyzerを用いることで、腫瘍組織から直接的にミトコンドリア電子伝達系のエネルギー代謝活性を測定できることを示した。今後、採材方法をさらに改善し、臨床症例数を蓄積することで悪性度や分化度などの予後因子、および治療反応性との関連性を検討することができると考えられる。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究は多種多様な腫瘍のイヌから腫瘍組織をサンプリングし、ミトコンドリア電子伝達系活性を評価することで、自然発生の腫瘍のエネルギー代謝を解明する糸口となり、エネルギー代謝を標的とした新たな抗ガン治療として発展する可能性が高い。また、今後、症例数を蓄積することで腫瘍のエネルギー代謝が腫瘍の予後因子に関連することが証明できれば、腫瘍のエネルギー代謝を測定することがより一般的になり、後続研究へ応用される可能性が非常に高い。

研究成果の概要（英文）：The energy metabolic activity of mitochondrial electron transport chains could be measured in transplanted tumor tissue from mice and spontaneous tumors from dogs using the Seahorse XFp Analyzer. In the future, the prognostic factors such as malignancy and differentiation as well as the relationship with response to therapy can be investigated by improving the sampling method and accumulating the number of clinical cases.

研究分野：腫瘍生物学

キーワード：ミトコンドリア代謝 腫瘍 放射線 イヌ 放射線増感剤 PD-L1

1. 研究開始当初の背景

放射線照射は、細胞のミトコンドリア代謝と形態に影響を与え、腫瘍細胞のエネルギー代謝は重要な標的となってきた。腫瘍のエネルギー代謝は、腫瘍の病態把握に重要であり、治療標的としても注目されてきた。従来、がん細胞は Warburg 効果で周知されるように、主に解糖系を利用したブドウ糖代謝によってエネルギーである ATP を得ていると考えられてきた。しかし、最近の研究では、X 線照射によって腫瘍細胞のミトコンドリアの電子伝達系が活性化することが示され、照射後のミトコンドリア活性によって ATP が生産され、腫瘍細胞の生存に寄与していることがわかってきた。このように、腫瘍細胞は放射線などのストレス下で腫瘍細胞はエネルギー代謝を変化させる可能性があり、腫瘍の代謝を正確に理解することが治療の発展に不可欠であると考えられる。

2. 研究の目的

本研究は、マウスに移植した腫瘍組織を用いて腫瘍のエネルギー代謝をはじめとした腫瘍の微小環境を評価し、臨床例の腫瘍組織で腫瘍のエネルギー代謝ならびに免疫回避機構を定量する方法を最適化する。次に、北海道大学附属動物病院に来院した腫瘍罹患犬を対象としてミトコンドリアの代謝状態を定量し、北海道大学附属動物病院に来院した腫瘍罹患犬を対象に、犬の自然発生腫瘍におけるミトコンドリア電子伝達系のエネルギー代謝を評価し、測定可否の影響を及ぼす因子についての検討を行った。

3. 研究の方法

イ) 犬腫瘍細胞株におけるミトコンドリア代謝活性の測定

犬の腫瘍細胞株は、犬骨肉腫細胞株 HMPOS、および犬悪性黒色腫細胞株 CMeC, LMeC を用いた。培養下の犬腫瘍細胞が 70%コンフルエントに達したことを確認し、以下の 4 群に無作為に振り分けた。(A)Control 群、(B)X 線照射(RT)群：5 Gy の X 線照射、(C)メトホルミン投与(Met)群：メトホルミン溶液を 50 μ M 添加、(D)RT+Met 群：メトホルミン溶液を 50 μ M 添加、24 時間後に 5 Gy の X 線照射。処理後の細胞を、1 ウェルあたり細胞数 5×10^4 個入った 5%FBS 入り RPMI 培養液 80 μ l 入れ、Seahorse XFp Analyzer を用いて OCR を測定した。

ロ) 犬のがん幹細胞を用いたミトコンドリア代謝活性の測定

ZsGreen1-cODC を含むレンチウイルスベクターを調整した。C 末端に 51 個のアミノ酸をコードするイヌの cODC 配列を特異的なプライマーを用いて増幅した。この PCR 断片を pZsGreen1-C1 に ZsGreen1 の C 末端をクローニングした。その後 ZsGreen1 とイヌ cODC を含む断片をレンチウイルスベクターにクローニングした。HMPOS 細胞および MegTCC 細胞にレンチウイルス上清を感染させ、10% FBS および 10 μ g/ml のプラストサイジンを追加した RPMI-1640 で培養した。その後、シングルセルクローニングを行い、HMPOS-ZsG と MegTCC-ZsG 細胞を作製した。セルソーティングによって選別した ZsG-細胞と ZsG+細胞を、Seahorse XFp Analyzer を用いてミトコンドリアの代謝パラメータである基礎呼吸、プロトンリーク、ATP 産生、最大呼吸、ならびに非ミトコンドリア呼吸を測定結果から算出した。

ハ) マウスの移植腫瘍組織におけるミトコンドリア代謝活性の測定

犬骨肉腫細胞株の HMPOS を移植したマウスの腫瘍組織を用いて、腫瘍体積が 100 mm³ 以上のマウスを、以下の 4 群のいずれかに無作為に振り分けた。各群の条件の後に、腫瘍組織を採材、腫瘍細胞を単離し、Seahorse XFp Analyzer を用いて OCR を測定した。

(A) Control 群、(B) RT(X 線照射)群：20 Gy の X 線照射全身、(C) Met 群：1 日 2 回 5 日間、1 回 50 mg/kg のメトホルミン塩酸塩、腹腔内投与。(D) RT+Met 群：(C)と同様に、1 日 2 回 5 日間メトホルミンの腹腔内投与。投与 4 日目に、(B)と同様に放射線照射。

同時採取した腫瘍組織に対してフローサイトメトリーを用いて腫瘍細胞における抗 PD-L1 の発現解析を行った。

ニ) 犬の自然発生腫瘍におけるミトコンドリア代謝活性の定量方法の検討

2022 年 5 月から 11 月までに北海道大学附属動物病院を受診し、腫瘍性疾患を疑う犬を対象とした。外科的辺縁部切除もしくは外科的手術の後、メスにて検体の一部を採取、もしくは 25G 注射針を用いて症例の皮膚越しに FNA を行った。検体は RPMI 培養液に入れ氷冷した。その後、採取した検体を処理し、腫瘍細胞を単離し、Seahorse XFp Analyzer を用いて酸素消費速度(OCR)を測定した。病理組織による診断を、確定診断とした。OCR の測定が可能であった群と、測定できなかった群に分けて、犬種、年齢、性別、体重、採材方法、腫瘍の良性悪性、腫瘍の発生部位、腫瘍の細胞学的分類、腫瘍の種類、腫瘍のステージ(悪性腫瘍のみ)について検討を行った。

4. 研究成果

イ) 犬腫瘍細胞株におけるミトコンドリア代謝活性の測定

犬腫瘍細胞株 HMPOS, CMeC, LMeC について、control 群、RT 群、Met 群、なら

びに RT+Met 群に分け、OCR の測定を行った (図 1)。HMPOS では RT 群が control 群に比べ、基礎呼吸、最大呼吸、ならびに非ミトコンドリア呼吸にて有意に高かった ($p=0.015$, $p=0.050$, $p=0.037$)。CMeC では RT 群が control 群に比べ、全ての代謝活性パラメータにて有意に高かった ($p<0.01$, $p<0.01$, $p=0.011$, $p<0.01$, $p=0.022$)。LMeC では RT 群が control 群に比べ、全ての代謝活性パラメータにて有意に高かった (いずれも $p<0.01$)。一方で、HMPOS の Met 群は、control 群と比べ、基礎呼吸、ATP 産生、ならびに非ミトコンドリア呼吸にて有意に低かった ($p<0.01$, $p<0.01$, $p=0.037$)。CMeC の Met 群は、control 群と比べ、基礎呼吸、ならびにプロトンリークで有意に低かった (いずれも $p<0.01$)。LMeC の Met 群は、control 群と比べ、全ての代謝活性パラメータにて有意に低かった (いずれも $p<0.01$)。また、HMPOS の RT+Met 群は、RT 群と比べ、基礎呼吸、最大呼吸、ならびに非ミトコンドリア呼吸にて有意に低かった ($p=0.013$, $p<0.01$, $p<0.01$)。CMeC の RT+Met 群は、RT 群と比べ、基礎呼吸、ならびに最大呼吸にて有意に低かった ($p=0.012$, $p=0.022$)。LMeC の RT+Met 群は、RT 群と比べ、全ての代謝活性パラメータにて有意に低かった (いずれも $p<0.01$)。

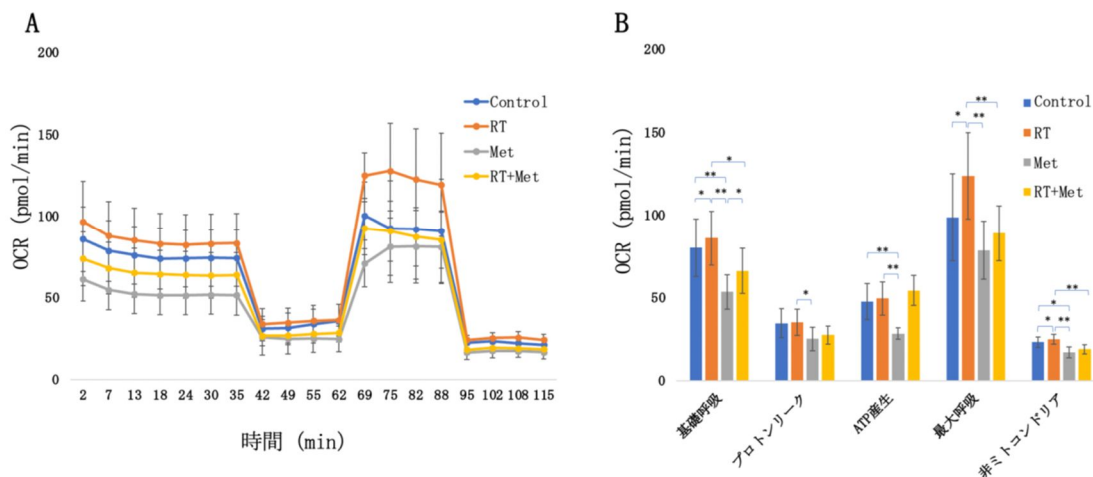


図 1. HMPOS における各群での平均 OCR

HMPOS における control 群、RT 群、Met 群、ならびに RT+Met 群での OCR の変動を評価した。A は、縦軸に OCR (pmol/min)、横軸に時間 (min) を示し、B は、基礎呼吸、プロトンリーク、ATP 産生、最大呼吸、ならびに非ミトコンドリア呼吸を算出し、縦軸に OCR を示した。各点は 6 回の測定にて得られた OCR の平均値 ± 標準偏差を示す。*: $p<0.05$ 、**: $p<0.01$

ロ) ZsG+細胞および ZsG-細胞でのミトコンドリア代謝活性の定量

HMPOS において ZsG+細胞を 12 時間培養した場合の代謝活性パラメータである基礎呼吸、プロトンリーク、ATP 産生、最大呼吸、ならびに非ミトコンドリア呼吸の測定を行った (図 2)。ZsG+細胞の方が ZsG-細胞よりもプロトンリーク、非ミトコンドリア呼吸が有意に低かった。 ($p=0.04$, $p=0.04$)

MegTCC においても同様に測定を行った。ZsG+細胞を 12 時間培養した場合の代謝活性パラメータである基礎呼吸、プロトンリーク、ATP 産生、最大呼吸、ならびに非ミトコンドリア呼吸の測定を行った (図 3)。12 時間培養した場合、ZsG+細胞の方が ZsG-細胞よりも基礎呼吸、プロトンリーク、最大呼吸、非ミトコンドリア呼吸の OCR が有意に低かった。 ($p=0.03$, $p=0.01$, $p=0.03$, $p=0.02$)

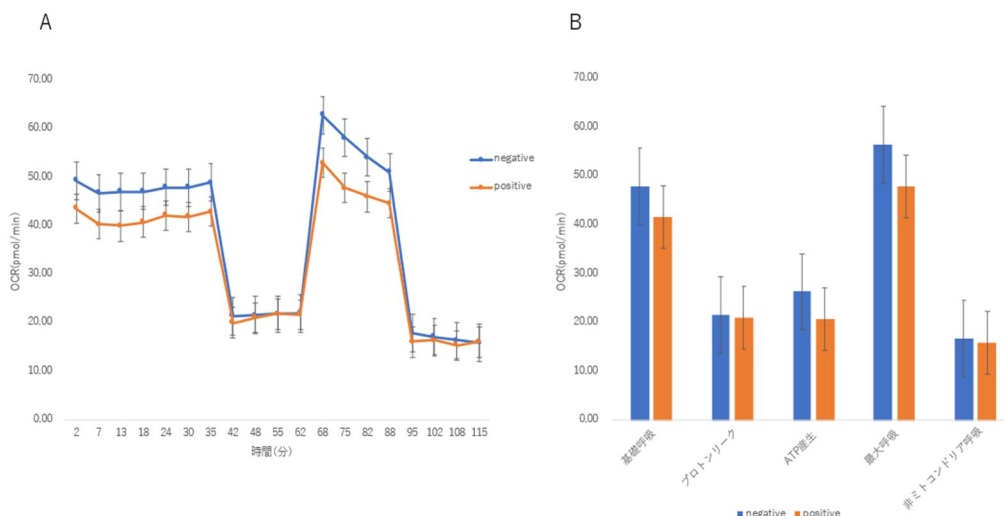


図.2 HMPOS-ZsGreen における各群での平均 OCR(12 時間培養)

12 時間培養した HMPOS-ZsGreen の ZsG+細胞, ZsG-細胞での OCR の変動を評価した。A は、縦軸に OCR (pmol/min) 横軸に時間 (分) を示し、B は、基礎呼吸、プロトンリーク、ATP 産生、最大呼吸、ならびに非ミトコンドリア呼吸を算出し、縦軸に OCR を示した。各点は 6 回の測定にて得られた OCR の平均値 ± 標準偏差を示す。*: $p < 0.05$

八) マウスの移植腫瘍組織におけるミトコンドリア代謝活性の測定

移植マウスを control 群、RT 群、Met 群、ならびに RT+Met 群に分け、各条件の後に OCR を測定した (図 3)。RT 群は、control 群と比べ、基礎呼吸、最大呼吸、ならびに非ミトコンドリア呼吸にて有意に高く (いずれも $p < 0.01$)、プロトンリークにおいて高い傾向 ($p = 0.067$) にあった。一方で、Met 群と control 群の間で、いずれも有意差は認められなかった。また、RT+Met 群では、RT+Met 群と RT 群の間で、いずれも有意差は認められなかった。

エネルギー代謝解析と同様の処置および同様の採材方法において、HMPOS 移植マウスの腫瘍組織において、放射線照射後に Programmed cell Death ligand 1 (PD-L1) 発現が上昇することがわかった (図 4)

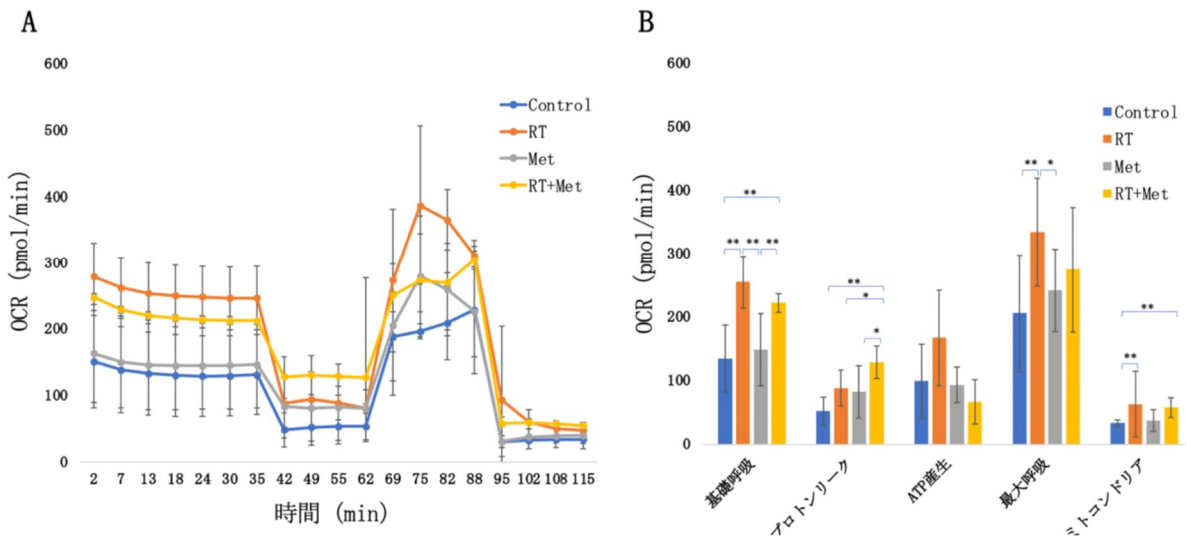


図 3. マウス移植腫瘍組織における各群での平均 OCR

control 群、RT 群、Met 群、ならびに RT+Met 群での OCR の変動を評価した。A は、縦軸に OCR (pmol/min) 横軸に時間 (min) を示し、B は、基礎呼吸、プロトンリーク、ATP 産生、最大呼吸、ならびに非ミトコンドリア呼吸を算出し、縦軸に OCR を示した。各点は 3 回の測定にて得られた OCR の平均値 ± 標準偏差を示す。

*: $p < 0.05$ 、**: $p < 0.01$

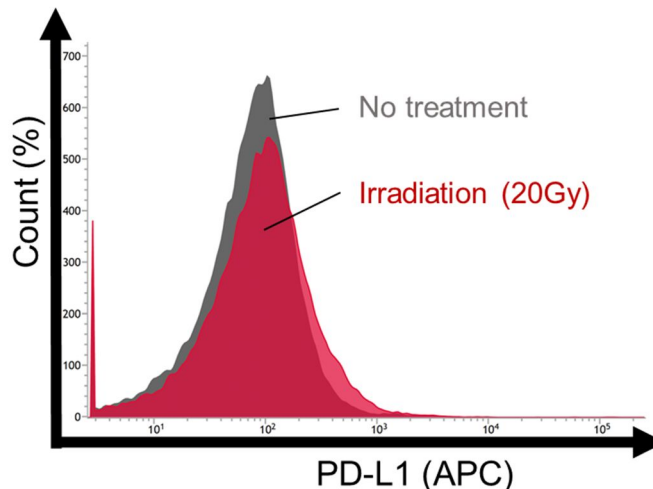


図.4 HMPOS 移植マウスにおける PD-L1 発現

HMPOS 移植マウスの腫瘍組織から採材した腫瘍細胞において放射線によって PD-L1 の発現が上昇している。

二) 犬の自然発生腫瘍におけるミトコンドリア代謝活性の定量方法の検討

全 36 例で測定を行い、代謝活性パラメータである基礎呼吸、プロトンリーク、ATP 産生、最大呼吸、ならびに非ミトコンドリア呼吸の測定が可能であった症例は 12 例であった。測定可能な症例の年齢中央値は 13.5 歳、測定できなかった症例の中央値は 12 歳であり、測定可能な症例は有意に年齢が高かった ($p=0.02$)。また、測定可能な症例のうち未去勢雄が 3 例、去勢雄が 5 例、未避妊雌が 1 例、避妊雌が 3 例であり、測定できなかった症例のうち未去勢雄が 5 例、去勢雄が 13 例、未避妊雌が 1 例、避妊雌が 5 例で有意差は生じなかった。 ($p=0.98$)。犬種における測定可能な症例と測定できなかった症例で有意差は生じなかった ($p=0.88$)。体重の中央値は測定可能な症例では 5.5kg、測定できなかった症例では 6.0kg で有意差は生じなかった ($p=0.43$)。また良性腫瘍では 2/9 例 (22%)、悪性腫瘍では 10/27 (37%) で測定が可能であり、腫瘍の良悪による有意差は生じなかった ($p=0.43$)。採材方法別にみると生検では 6/13 例 (46%)、FNA では 4/12 例 (33%)、手術では 2/11 例 (18%) で測定が可能であり、採材方法による有意差は生じなかった ($p=0.31$)。腫瘍の部位別にみると口腔が 8/15 例 (53%)、体表が 2/16 例 (13%)、鼻腔が 2/3 例 (67%)、その他 0/2 例 (0%) であり、口腔で測定しやすく、体表で測定するのが難しかった ($p=0.038$)。腫瘍の細胞学的分類別にみると、上皮系腫瘍が 6/17 例 (35%)、間葉系腫瘍が 6/17 例 (35%)、独立円形腫瘍が 0/2 例 (0%) であり、細胞学的分類によって有意差は生じなかった。腫瘍の種類別にみると悪性黒色腫で 6/10 例 (60%) で測定が可能であり他の腫瘍よりも測定しやすかった ($p=0.04$)。悪性腫瘍において腫瘍のステージ別にみると、ステージ 1、2 では 4/13 例 (31%)、ステージ 3 では 2/8 (25%)、ステージ 4 では 4/6 例 (66%) で測定が可能であり、ステージによる有意差は生じなかった ($p=0.39$)。測定できた症例の腫瘍の種類の内訳は悪性黒色腫 6 例、肛門嚢腺癌 1 例、鼻腔内腺癌 2 例、扁平上皮癌 1 例、乳腺腫 1 例、棘細胞性エナメル上皮腫 1 例であった。測定できた症例の情報は表 2 に示した。犬種はミニチュア・ダックスフンド 4 例、チワワ 2 例、雑種 2 例、柴犬 1 例、ウェルシュコーギー 1 例、ミニチュアシュナウザー 1 例、ラブラドルレトリバー 1 例であった。性別は去勢雄 5 例、未去勢雄 3 例、避妊雌 3 例、未避妊雌 1 例であり、年齢の中央値は 13.5 歳 (範囲: 11 歳 ~ 18 歳) であった。

本研究は、犬腫瘍細胞株、マウス移植腫瘍組織、ならびに犬自然発生腫瘍において、Seahorse XFp Analyzer を用いた OCR の測定から、犬腫瘍におけるミトコンドリア電子伝達系代謝活性の定量を試みた研究である。Seahorse XFp Analyzer を用いた OCR の測定は、ヒトの腫瘍細胞同様、犬の腫瘍細胞においても可能であり、さらに、他の動物種の腫瘍においても実施されていない移植腫瘍組織および自然発生腫瘍における測定が可能であった。また、各種条件によりミトコンドリア電子伝達系代謝活性を変化させた腫瘍細胞の OCR の変動を検出でき、これは、個々の自然発生腫瘍の異なる代謝状態を検出できる可能性を示唆している。加えて同様の手技で腫瘍の免疫回避機構に関わる PD-L1 の発現解析を行ったところ、腫瘍のミトコンドリア代謝の呼吸活性と同様に放射線暴露下において PD-L1 の発現が上昇することがわかり、腫瘍の免疫回避機構やさまざまなサイトカインも腫瘍のエネルギー代謝や腫瘍の治療抵抗性に関連があることが示唆された。

今後、本研究から測定がしやすい結果の得られた口腔内腫瘍から症例数を蓄積することで、予後因子および治療反応との関連性を検討することができると考えられ、腫瘍の代謝を標的とした治療の確立への寄与が期待される。

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 出口 辰弥、細谷 謙次、安井 博宣、稲波 修、奥村 正裕	4. 巻 55
2. 論文標題 獣医療におけるがん幹細胞を標的とした放射線治療に向けた基礎研究	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 放射線生物研究	6. 最初と最後の頁 322-341
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） なし	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0件

〔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
---------	---------