

## 科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成24年 5月31日現在

機関番号：16401

研究種目：基盤研究（C）

研究期間：2009～2011

課題番号：21591612

研究課題名（和文） 過酸化水素水による低酸素癌細胞の放射線抵抗性の克服

研究課題名（英文） Overcoming the radioresistance in hypoxic cancer cells by using hydrogen peroxide

研究代表者

刈谷 真爾（KARIYA SHINJI）

高知大学・教育研究部医療学系・助教

研究者番号：20314990

研究成果の概要（和文）：低酸素状態下の癌細胞はX線に抵抗性であるが、X線照射直前に癌細胞を培養している液に過酸化水素水を投与することにより、酸素正常状態と同等以上の細胞死が確認できた。過酸化水素水が細胞培養液に投与されると酸素が発生するが、今回用いた過酸化水素水の濃度では癌細胞が低酸素状態から脱却できるほどの酸素は発生しておらず、癌細胞が低酸素状態から脱却したことが細胞死の増強した原因とは考えられなかった。以上のこととこれまでの研究結果から考えて、今回の細胞死にはリソソーム等の細胞内小器官が関与していると考えられる。

研究成果の概要（英文）：Cancer cells in hypoxic conditions are known familiarly as X-ray resistant. When cancer cells were exposed to hydrogen peroxide just before the X-irradiation, the cells in hypoxic condition occurred death more than cancer cells in normoxic conditions. When hydrogen peroxide was administered into cell medium, oxygen generated. In our study, however, the oxygen pressure increased in the medium was a mere 3.6 mmHg, which was not enough for hypoxic conditions to become normoxic conditions. It is considered that subcellular organella such as lysosome are concerned with this cell death.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2009年度	1,700,000	510,000	2,210,000
2010年度	1,300,000	390,000	1,690,000
2011年度	500,000	150,000	650,000
年度			
年度			
総計	3,500,000	1,050,000	4,550,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：内科系臨床医学・放射線科学

キーワード：癌、放射線、低酸素細胞

## 1. 研究開始当初の背景

現在放射線治療装置として汎用されているリニア・アクセレーターによる高エネルギーX線および電子線は低LET（linear energy transfer）放射線であり、その生物学的効果

は重粒子線等に比べて低い。そのため、悪性黒色腫、種々の肉腫、多形性神経膠芽腫等の腫瘍にはリニア・アクセレーターによる放射線治療の効果は乏しい。

ところが、我々はこれまでの研究で、著し

い低 LET 放射線抵抗性を有する HS-0s-1 ヒト骨肉腫細胞株に対して、X線照射に加えて過酸化水素水を同時併用することによって放射線感受性が增強されることが明らかになった (Int J Mol Med. 12(6):845-850, 2003)。さらに、X線に対してアポトーシス抵抗性である PC-3 ヒト前立腺癌細胞株に対しても、X線照射と過酸化水素水を同時に投与することによりアポトーシスが飛躍的に増強すること、またそのアポトーシスがリソソーム依存性であることを明らかにした (第 66 回日本癌学会学術総会 2007、13<sup>th</sup> International Congress of Radiation Research 2007)。この増強作用のメカニズムとして現在我々が考えているのが、過酸化水素により腫瘍局所の抗酸化酵素ペルオキシダーゼ/カタラーゼを不活性化させることにより腫瘍のX線感受性を高めると共に、そのときに発生する酸素により腫瘍局所を高酸素化し、低 LET 放射線抵抗性腫瘍を放射線高感受性に変換しているという説である。

一方で、その後の研究ですべての癌細胞が必ずしも、過酸化水素水を同時併用することでX線感受性が高まるわけではないこともわかってきた。

## 2. 研究の目的

(1) 低酸素状態にある癌細胞に過酸化水素水を投与した上でX線を照射する。一方、正常酸素状態にある癌細胞にも X 線を照射し、それぞれのアポトーシスを起こした細胞の割合を比較する。それによって低酸素状態にある癌細胞が、過酸化水素水を事前投与することによって、正常酸素状態にある癌細胞に匹敵する程度のアポトーシスを来たすかどうかを検証する。

(2) 低酸素状態にある癌細胞の培養液に過酸化水素水を投与し、投与直後からの培養液中の酸素分圧を経時的に測定する。それによって癌細胞が低酸素状態から脱却できるほどに培養液中の酸素分圧が上昇しているかどうかを検証する。

## 3. 研究の方法

(1) 低酸素状態にある PC-3 ヒト前立腺癌細胞に 0.1mM 過酸化水素水を投与した群と投与しない群を用意し、さらに X 線 10Gy を照射する群としない群とに分ける。①対象群、②低酸素状態・X線群、③低酸素状態・過酸化水素群、④低酸素状態・X線+過酸化水素群)。X線照射2日後に細胞を回収しアポトーシスを起こしている細胞の割合をフローサイトメトリーを用いて測定する。同様に、正常酸素状態にある PC-3 ヒト前立腺癌細胞に X 線 10Gy を照射し (⑤正常酸素状態・X線群)、同様にフローサイトメトリーを用いてアポトーシスを起こしている細胞の割合を測定

する。

(2) 低酸素状態にある PC-3 ヒト前立腺癌細胞の培養液に、濃度の異なった過酸化水素水を投与し、その後の培養液中の酸素分圧の変化を酸素分圧測定器を用いて観察する。

## 4. 研究成果

(1) 低酸素状態にある PC-3 ヒト前立腺癌細胞に 0.1 mM 過酸化水素水を投与した直後に X 線 10Gy を照射し、正常酸素状態にある PC-3 ヒト前立腺癌細胞に X 線 10Gy を照射した場合と比較した。低酸素状態にある PC-3 ヒト前立腺癌細胞に X 線 10Gy を照射したときに起こるアポトーシスの割合は、正常酸素状態にある PC-3 ヒト前立腺癌細胞に X 線 10Gy を照射したときよりも低かったが、過酸化水素水 0.1mM を X 線照射直前に投与しておくこと、正常酸素状態にある PC-3 ヒト前立腺癌細胞よりも高率にアポトーシスを起こした。また、低酸素状態にあつて、X 線と過酸化水素水を併用した場合のアポトーシスを来たした細胞の割合は、X 線単独の場合のアポトーシスを来たした細胞の割合と過酸化水素水単独の場合のアポトーシスを来たした細胞の割合の合計よりも高く、相乗効果があることが示された (図 1)。

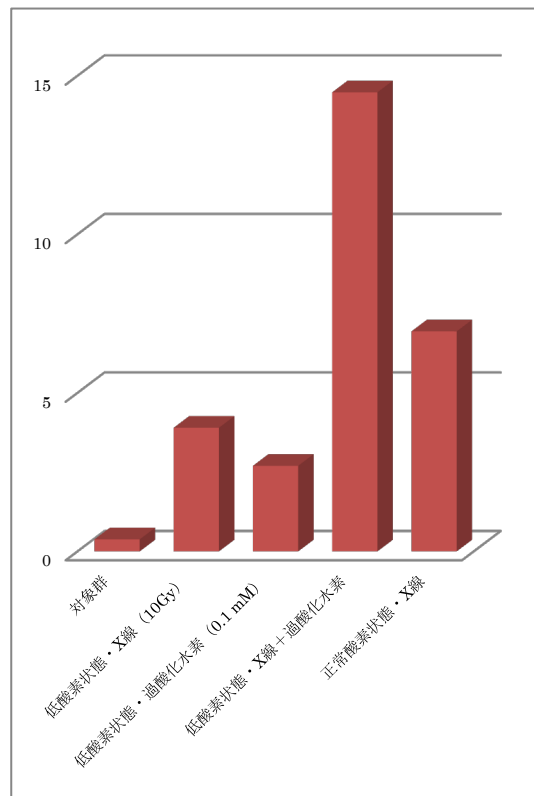


図 1 各群におけるアポトーシスの割合

X 線と過酸化水素水の併用でアポトーシスの割合が高くなった原因が、低酸素状態にあ

る PC-3 ヒト前立腺癌細胞が過酸化水素水の投与によって正常酸素状態になったことのみによるとすると、アポトーシスを起こす細胞の割合が、正常酸素状態にある PC-3 ヒト前立腺癌細胞に X 線を照射した場合を上回ることはないはずである。従って、低酸素状態にある PC-3 ヒト前立腺癌細胞における X 線照射と過酸化水素水の同時投与によって起こったアポトーシスについても、正常酸素状態にある低酸素状態にある PC-3 ヒト前立腺癌細胞における X 線照射と過酸化水素水の同時投与によって起こったアポトーシスと同様にリソソーム依存性のアポトーシスが起こったと考えられる。

(2) PC-3 ヒト前立腺癌細胞を 1%酸素濃度(酸素分圧約 7.6 mmHg) という低酸素状態で培養し、その培養液中にそれぞれ 0.1、0.2、0.4、1.0 mM 過酸化水素水を投与し、直後からの培養液中の酸素分圧を測定したところ、投与直後に急速な酸素分圧の上昇が見られ、その後時間経過とともに酸素分圧は緩やかに下降していった。また投与した過酸化水素水の濃度が高くなるに従って酸素分圧の上昇の程度も高くなった (図 2)。

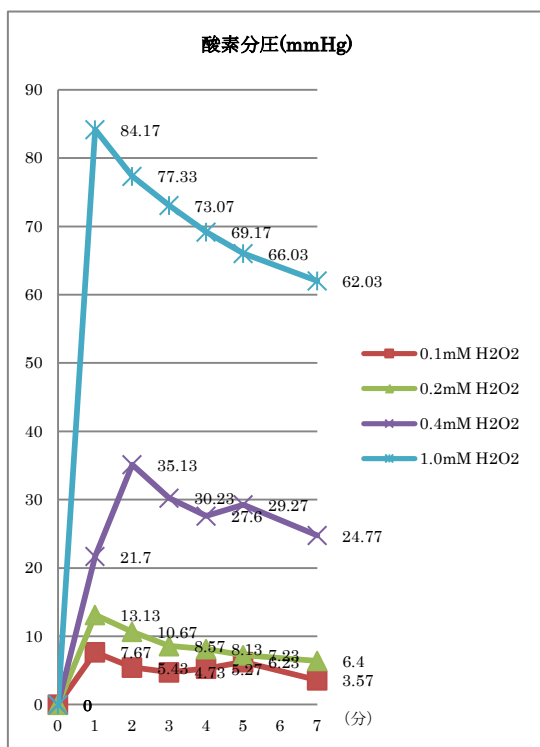


図 2 過酸化水素水投与後の培養液の酸素分圧

しかしながら、今回 X 線照射と併用して用いた過酸化水素水の濃度は 0.1 mM であり、この濃度の過酸化水素水を培養液に投与した時の培養液中の酸素分圧の平均上昇は、投

与 7 分後にはわずか 3.6 mmHg にすぎず、培養液中の酸素分圧は 11.2 mmHg 程度にしか上がっていないことになる。低酸素状態の細胞が酸素化によって放射線抵抗性から脱却するためには酸素分圧が少なくとも 30~40 mmHg になっている必要があるといわれていることから、今回の低酸素状態にある PC-3 ヒト前立腺癌細胞における X 線誘発アポトーシスが過酸化水素水によって増強した原因として、過酸化水素水から発生した酸素はほとんど関与していないことが明らかとなった。

以上の結果を総合すると、低酸素状態にある PC-3 ヒト前立腺癌細胞は過酸化水素水を X 線照射直前に投与することによって酸素化を来し放射線抵抗性から脱却したというよりも、正常酸素状態にある PC-3 ヒト前立腺癌細胞と同様、過酸化水素水によってリソソームといった細胞内小器官が X 線による障害を受けやすい状態に変化し、それによって、過酸化水素水を投与しない正常酸素状態にある PC-3 ヒト前立腺癌細胞よりも高い割合で X 線誘発アポトーシスを起こしたと考えられる。

## 5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文] (計 2 件)

- ① 刈谷真爾、徳廣志保、明間陵、小川恭弘、過酸化水素の放射線誘発細胞死増強効果についての基礎的研究、癌の臨床、査読無、57 巻、6 号、2012、pp. 271-277
- ② 刈谷真爾、澤田健、小林俊博、辛島尚、執印太郎、西岡明人、小川恭弘、Combination treatment of hydrogen peroxide and X-rays induces apoptosis in human prostate cancer PC-3 cells、International Journal of Radiation Oncology, Biology, and Physics、査読有、Vol. 75、No. 2、2009、pp. 449 - 455

[学会発表] (計 2 件)

- ① 刈谷真爾、過酸化水素の放射線誘発細胞死増強効果についての基礎的研究、日本放射線腫瘍学会第 24 回学術大会、2011 年 11 月 18 日、神戸
- ② 刈谷真爾、Hydrogen peroxide enhances radiation-induced apoptosis in hypoxic PC-3 prostate cancer cell line、14<sup>th</sup> International congress of radiation research、2011 年 8 月 30 日、ワルシャワ (ポーランド)

6. 研究組織

(1) 研究代表者

刈谷 真爾 (KARIYA SHINJI)

高知大学・教育研究部医療学系・助教

研究者番号：20314990