

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 4 月 1 日現在

機関番号：16101

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2009～2011

課題番号：21591726

研究課題名（和文）：血管新生阻害によって惹起される放射線感受性増強のメカニズムに関する研究

研究課題名（英文）：Mechanism of radio-sensitizing effect caused by angiogenesis inhibitor

研究代表者

西岡 将規 (NISHIOKA MASANORI)

徳島大学・病院・助教

研究者番号：50398020

研究成果の概要（和文）：血管新生阻害によって惹起される放射線感受性増強のメカニズムを解明し、低酸素下での癌治療成績を向上させることが目的である。TPI（Thymidine phosphorylase inhibitor）は VEGF、TGF β 、Rad 51 mRNAs の発現抑制、VEGF、CD34 タンパク発現抑制、TUNEL 染色陽性細胞の増加を介し、TPI が血管新生阻害作用だけでなく DNA 修復を阻害してアポトーシスによって放射線の効果を増強させることを確認した。Oridonin は放射線との併用による抗腫瘍効果は autophagy でなく apoptosis によることを確認し、そのメカニズムとしては HIF1 α 、VEGF、Ang-2 mRNA の抑制、Ki-67 細胞減少の低下を確認した。TPI、Oridonin とともに血管新生阻害作用、放射線増感作用を有することを確認した。

研究成果の概要（英文）：Combination of TPI and RT synergistically inhibited the cell viability in a time- and dose-dependent manner. The combination of TPI and RT reduced the tumor growth compared with RT alone. The mRNA levels of VEGF, TGF- β and Rad51 and the protein expressions of VEGF and CD34 were significantly lower in the combination than the others. The combination markedly increased the TUNEL positive cells, suggesting that TPI augments the cancer cell death through inhibition of angiogenesis and DNA repair system in the radiotherapy. Oridonin suppressed growth of HCT-15 and HT-29 cells through induction of apoptosis and autophagy. However, combined with RT and Oridonin augmented growth suppression through induction of apoptosis. In orthotopic model, combination of RT and Oridonin showed significant reductions in tumor volume.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2009 年度	2,200,000	660,000	2,860,000
2010 年度	700,000	210,000	910,000
2011 年度	700,000	210,000	910,000
年度			
年度			
総計	3,600,000	1,080,000	4,680,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：外科系臨床医学・消化器外科学

キーワード：癌・放射線・血管新生・放射線増感剤・低酸素・HIF-1・Oridonin・TPI (Thymidine phosphorylase inhibitor)

1. 研究開始当初の背景

低酸素下における癌細胞は放射線感受性が低く、放射線癌治療に対する抵抗性や、さらには治療後再発をおこす原因の一つとして非常に重要である。癌の基本的環境は低酸素であり、低酸素は癌治療において避けることのできない問題のひとつである。近年、放射線療法に化学療法を併用する化学放射線療法が主流となっている一方で、化学療法では分子標的剤が注目され血管新生阻害薬などが使用されているが、血管新生が阻害されると癌細胞はますます低酸素状態となる。今後、血管新生阻害剤を併用した化学放射線療法が行われる可能性があるが、血管新生阻害作用と癌の低酸素状態に注目した放射線治療の感受性増強のメカニズムに関する研究は皆無である。そこで血管新生阻害作用と放射線増感作用を有する TPI (Thymidine phosphorylase inhibitor) と Oridonin に着目し、化学放射線療法の感受性増強のメカニズムについて研究を行うこととした。

2. 研究の目的

血管新生阻害薬は高い抗腫瘍効果を示すが、癌細胞は低酸素状態になり低酸素下における癌細胞は放射線感受性が低くなるのが問題である。この矛盾した血管新生阻害作用と癌の低酸素状態に焦点を当て放射線治療の感受性増強のメカニズムを解明し、低酸素下での癌治療成績を向上させることが目的である。

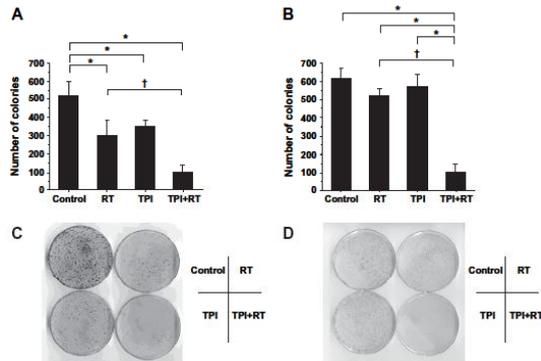
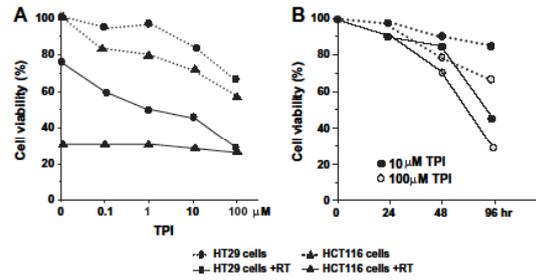
3. 研究の方法

(1) *In vitro* で大腸癌細胞株に対する増殖抑制試験を行い、TPI, Oridonin の Cytotoxicity、放射線との併用による増感作用を比較検討した。
 (2) *In vivo* では BALB/c ノドマウスの直腸前壁を切開してイレウスを予防した後、大腸癌細胞を直腸後壁粘膜下に移植して同所性モデルを作成し、TPI、Oridonin、放射線の単独群、TPI、Oridonin と放射線の併用群で、それぞれ腫瘍体積及びマウスの体重を測定した。さらに各群で低酸素、血管新生、細胞周期、アポトーシスに関連する遺伝子・タンパク質について PCR および免疫染色で比較検討した。

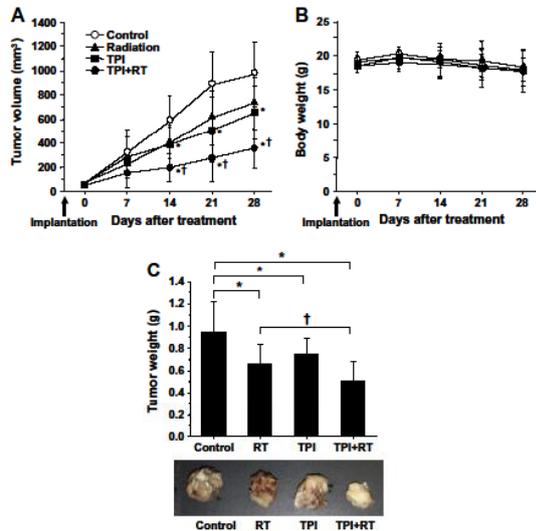
4. 研究成果

TPI の成果

(1) MTT assay において、TPI は大腸癌細胞株 HT29 細胞で時間依存性・濃度依存性に腫瘍増殖を有意に抑制した。Colony formation assay においても TPI は放射線 (RT) との併用により、HT29 細胞で放射線単独群と比較して腫瘍の増殖を相乗効果的に有意に抑制した。

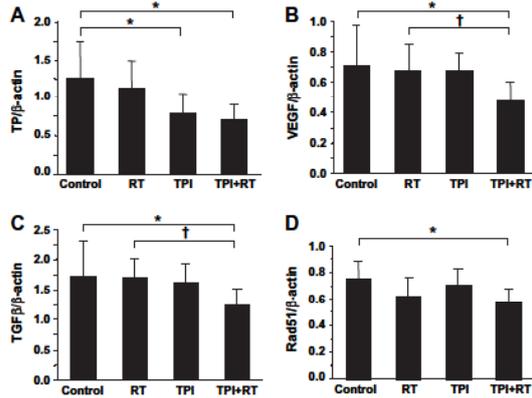


(2) *In vivo* での抗腫瘍効果に関しては TPI 単独群は無治療群と比較して有意に腫瘍の増殖と重量の増加を抑制した。TPI+RT 群は RT 単独群と比較して有意に腫瘍の増殖と重量の増加を抑制した。また、全ての治療群において下痢や体重減少などの有害事象は認めなかった。

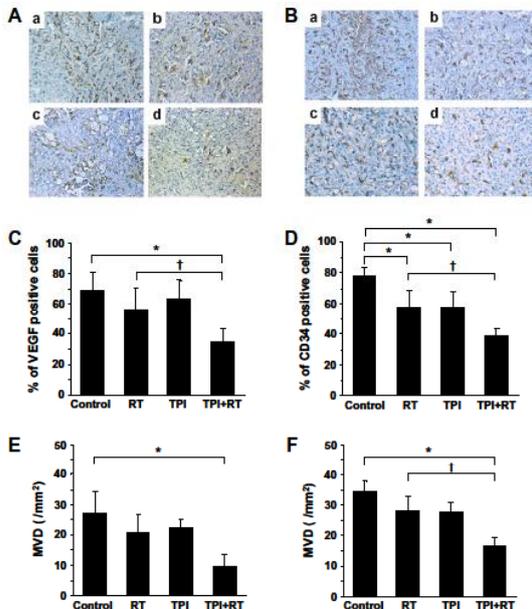


(3) TPI の放射線増感作用に関するメカニズムについて、腫瘍内の遺伝子変化を各群で検討すると、TPI 使用群で TP の mRNA は有意に減少していた。また、TPI+RT 群は無治療群と比較して VEGF, TGF β, Rad51 の mRNAs の発現が有意に抑制されていた。その他の血管新生に関与する HIF-1α, Angiopoietin 1, CD44 の mRNA の発現は各群において有意差は

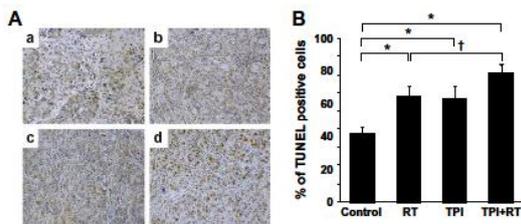
認めなかった。



(4) 血管新生因子に関して免疫染色で検討すると、TPI+RT 群では無治療群、RT 単独群と比較して VEGF, CD34 タンパクの発現が有意に抑制されていた。また、TPI+RT 群では無治療群と比較して MVD が有意に抑制されていた。



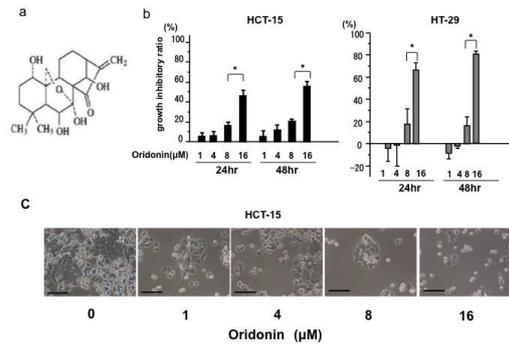
(5) アポトーシスとの関連を見てみると、TPI+RT 群は無治療群、RT 単独群と比較して TUNEL 染色陽性細胞の発現が有意に増加していた。



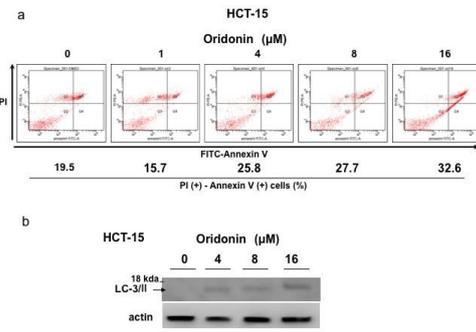
Oridonin の成果

(1) In vitro の検討では、Oridonin 単独に

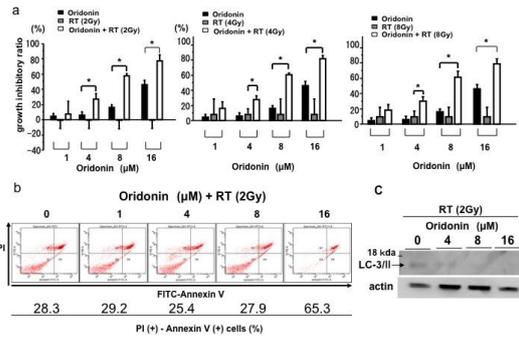
おいて二つの cell line 両方で濃度依存性に細胞増殖抑制効果が認められました。



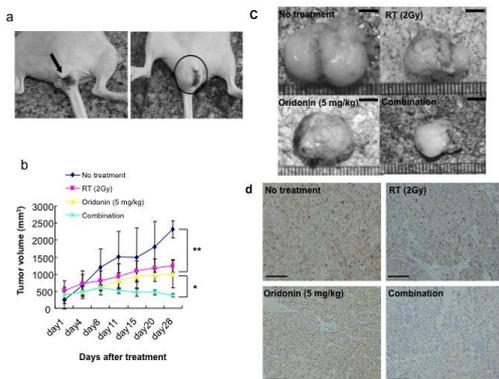
(2) Oridonin の細胞増殖抑制効果のメカニズムに関して Apoptosis と Autophagy について検討した。Annexin-V と Propidium iodide が両方陽性の細胞を apoptosis 細胞としてカウントすると、16 μM の Oridonin 単独群では 32.6%であった。Autophagy に関しては、autophagy のマーカーとして知られている LC-3 で検討した。Oridonin 単独では濃度依存性にその発現が上昇した。また、HIF1a の発現は Oridonin 単独では 16μM で急激に消失しました。



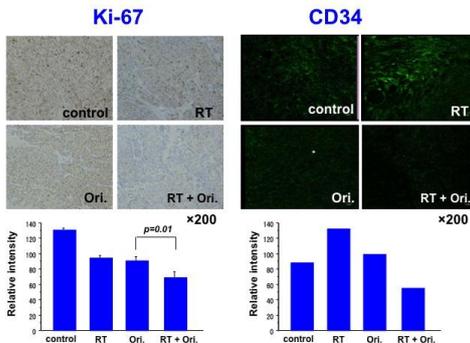
(3) Oridonin の放射線増感作用に関して検討した。放射線治療に Oridonin を併用することにより劇的に細胞増殖抑制効果が上昇する結果となった。Apoptosis に関しては、16 μM の Oridonin 単独群では 32.8%であったのに対して、Oridonin+RT 2Gy の併用治療にて 65.3%と急激に apoptosis 細胞が上昇する結果となった。Autophagy に関しては、Oridonin 単独では濃度依存性に LC-3 発現が上昇したが、放射線との併用では、それらはまったく発現が消失した。また、HIF1a の発現に関しても Oridonin+放射線との併用で消失した。



(4) 次に In vivo で、balb/c nude mouse を用いて直腸癌同所性モデルを作成し、腫瘍体積の推移、Caspase・LC-3・HIF・HIF-related protein、免疫で腫瘍増殖・腫瘍血管を評価した。腫瘍体積は、Oridonin+放射線との併用群で有意にその体積が減少した。また、In vivo でも In vitro の結果と同様に放射線併用にて autophagy は消失し、apoptosis が増強する結果となった。HIF1a に関しては Oridonin 単独ではその発現抑制は得られませんでした。放射線併用にて HIF1a の発現は低下し、VEGF も同様に発現が低下した。Angiopoietin-2 についても、放射線併用でやや発現が低下する傾向を認めた。



Immunohistochemical staining



(5) 腫瘍組織を免疫染色で観察すると、確かに細胞増殖は抑制され、CD34 による腫瘍血管染色でも Oridonin+放射線併用群で発現が抑制される傾向を認めた。

以上より、TPI、Oridonin がともに血管新生阻害作用、放射線増感作用を有することを確認した。今後、低酸素下での放射線の癌治療成績を向上させることを目指して、血管新生阻害と放射線増感との関係について、さらなるメカニズム解明を行っていきたい。

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 12 件)

① Miyatani T, Kurita N, Utsunomiya T, Iwata T, Nishioka M, Yoshikawa K, Higashijima J, Kashiwara H, Takasu C, Fukushima M, Shimada M. Platelet-derived endothelial cell growth factor/thymidine phosphorylase inhibitor augments radiotherapeutic efficacy in experimental colorectal cancer. *Cancer Lett.* 2012 May 28;318(2):199-205. [Epub ahead of print] doi: 10.1016/j.canlet.2011.12.010. Epub 2011 Dec 13. (査読有り) PubMed PMID: 22178656.

② Nishioka M, Shimada M, Kurita N, Iwata T, Morimoto S, Yoshikawa K, Higashijima J, Miyatani T. Clinicopathological Analysis of Distal Margin for Rectal Cancer after Preoperative Chemoradiation Therapy. *Hepatogastroenterology.* 2012 Feb 22;59(119). [Epub ahead of print] doi: 10.5754/hge11840. (査読有り)

③ Chikakiyo M, Shimada M, Nakao T, Higashijima J, Yoshikawa K, Nishioka M, Iwata T, Kurita N. Kampo medicine "Dai-kenchu-to" prevents CPT-11-induced small-intestinal injury in rats. *Surg Today.* 2012 Jan;42(1):60-7. Epub 2011 Nov 10. PubMed PMID: 22068671. (査読有り)

④ Yoshikawa K, Shimada M, Nishioka M, Kurita N, Iwata T, Morimoto S, Miyatani T, Komatsu M, Kashiwara H, Mikami C. The effects of the Kampo medicine (Japanese herbal medicine) "Daikenchuto" on the surgical inflammatory response following laparoscopic colorectal resection. *Surg Today.* 2011 Dec 28. [Epub ahead of print] (査読有り) PubMed PMID: 22202972.

⑤ Morimoto S, Shimada M, Kurita N, Sato

H, Iwata T, Nishioka M, Yoshikawa K, Miyatani T, Kashiwara H, Takasu C, Ikushima H. Preoperative Radiotherapy Combined with S-1 for Advanced Lower Rectal Cancer: Phase I Trial. Hepatogastroenterology. 2011 Dec 6;59 (117). doi: 10.5754/hge11699. [Epub ahead of print] (査読有り)

⑥ Higashijima J, Kurita N, Miyatani T, Yoshikawa K, Morimoto S, Nishioka M, Iwata T, Shimada M. Expression of histone deacetylase 1 and metastasis-associated protein 1 as prognostic factors in colon cancer. Oncol Rep. 2011 Aug;26(2):343-8. doi: 10.3892/or.2011.1312. Epub 2011 May 20. PubMed PMID: 21617866. (査読有り)

⑦ Nishioka M, Shimada M, Kurita N, Iwata T, Morimoto S, Yoshikawa K, Higashijima J, Miyatani T, Kono T. The Kampo medicine, Goshajinkigan, prevents neuropathy in patients treated by FOLFOX regimen. Int J Clin Oncol. 2011 Aug;16(4):322-7. Epub 2011 Jan 22. PubMed PMID: 21258836. (査読有り)

⑧ Miyatani T, Kurita N, Mikami C, Kashiwara H, Higashijima J, Yoshikawa K, Nishioka M, Sato H, Iwata T, Shimada M. Malignant potential of Barrett's esophagus: special reference to HDAC-1 and MTA-1 expression. Hepatogastroenterology. 2011 Mar-Apr;58(106):472-6. PubMed PMID: 21661415. (査読有り)

⑨ Nishioka M, Shimada M, Kurita N, Iwata T, Morimoto S, Yoshikawa K, Higashijima J, Miyatani T. Gene expression profile can predict pathological response to preoperative chemoradiotherapy in rectal cancer. Cancer Genomics Proteomics. 2011 Mar-Apr;8(2):87-92. PubMed PMID: 21471518. (査読有り)

⑩ Miyake K, Imura S, Nishioka M, Batmunkh E, Sugimoto K, Ohmoto Y, Shimada M. Serum evaluation of soluble interferon-alpha/beta receptor and high-sensitivity C-reactive protein for diagnosis of the patients with gastrointestinal and hepatobiliary-pancreatic cancer. Cytokine. 2010 Mar;49(3):251-5. Epub 2009 Oct 30. PubMed PMID: 19879773. (査読有り)

⑪ Yoshikawa K, Shimada M, Miyamoto H, Higashijima J, Miyatani T, Nishioka M,

Kurita N, Iwata T, Uehara H. Sonic hedgehog relates to colorectal carcinogenesis. J Gastroenterol. 2009;44(11):1113-7. Epub 2009 Aug 7. PubMed PMID: 19662327. (査読有り)

⑫ Miyake K, Shimada M, Nishioka M, Sugimoto K, Batmunkh E, Uto Y, Nagasawa H, Hori H. Downregulation of matrix metalloprotease-9 and urokinase plasminogen activator by TX-1877 results in decreased tumor growth and metastasis on xenograft model of rectal cancer. Cancer Chemother Pharmacol. 2009 Oct;64(5):885-92. Epub 2009 Feb 12. PubMed PMID: 19214512. (査読有り)

[学会発表] (計 3 件)

① Mikami C, Shimada M, Kurita N, Iwata T, Nishioka M, Morimoto S, Yoshikawa K, Miyatani T, Komatsu M, Kashiwara H, Utsunomiya T. Rediosensitizing effects of oridonin for human colon cancer. (オリドニンの放射線増感作用に関する検討.) 第 69 回日本癌学会総会 平成 22 年 9 月 23 日 (大阪国際会議場 大阪市)

② 小松正人, 島田光生, 西岡将規, 栗田信浩, 岩田貴, 森本慎也, 吉川幸造, 東島潤, 宮谷知彦, 中尾寿宏, 柏原秀也, 宇都宮徹. オリドニンの放射線増感作用に関する検討. 第 110 回日本外科学会定期学術集会 平成 22 年 4 月 8 日 (名古屋国際会議場 名古屋市)

③ 宮谷知彦, 島田光生, 小松正人, 中尾寿宏, 近清素也, 東島潤, 吉川幸造, 西岡将規, 岩田貴, 栗田信浩, 福島正和. 直腸癌に対する Thymidine phospholylase inhibitor の放射線増感作用に関する基礎的研究 第 109 回日本外科学会定期学術集会 平成 21 年 4 月 3 日 (マリンメッセ福岡大会議場 福岡市)

6. 研究組織

(1) 研究代表者

西岡 将規 (NISHIOKA MASANORI)

徳島大学・病院・助教

研究者番号: 50398021

(2) 研究分担者

栗田 信浩 (KURITA NOBUHIRO)

徳島大学・病院・特任教授

研究者番号: 30335814

岩田 貴 (IWATA TAKASHI)

徳島大学・大学院ヘルスバイオサイエンス研究部・准教授

研究者番号: 00380022

吉川 幸造 (YOSHIKAWA KOZO)

徳島大学・大学院ヘルスバイオサイエンス研究部・助教

研究者番号 : 80448331