

## 科学研究費助成事業（学術研究助成基金助成金）研究成果報告書

平成 25 年 6 月 3 日現在

機関番号：82110

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2011～2012

課題番号：23791463

研究課題名（和文）内用放射線療法における癌の放射線抵抗性誘導機構の解明と新規放射線増感剤への応用

研究課題名（英文）The novel mechanism of cancer radioresistance on internal radiation therapy and development of radiosensitizers

研究代表者

大島 康宏 (OSHIMA YASUHIRO)

独立行政法人日本原子力研究開発機構・量子ビーム応用研究部門・博士研究員

研究者番号：00588676

研究成果の概要（和文）：本研究では、放射線誘発性 ATP 放出を介した癌の放射線抵抗性誘導機構ならびに ATP 選択的受容体(P2受容体)を標的とした新規放射線増感剤の可能性について検討した。その結果、<sup>131</sup>I 標識抗体による細胞外 ATP 放出と P2Y<sub>6</sub>受容体を介した放射線抵抗性の誘導を見出し、さらに P2Y<sub>6</sub>受容体阻害薬が <sup>131</sup>I 標識抗体の細胞増殖抑制効果を促進することを見出した。以上より、P2Y<sub>6</sub>受容体阻害薬の新規放射線増感剤としての可能性を見出した。

研究成果の概要（英文）： In this study, we investigated the mechanism of radioresistance through radiation-induced extracellular ATP release and possibility of P2 receptor inhibitor as a novel radiosensitizer. We found extracellular ATP release after treatment of <sup>131</sup>I-labeled antibody and an involvement of P2Y<sub>6</sub> receptor in radioresistance. Moreover, we elucidated that the inhibitor of P2Y<sub>6</sub> receptor enhanced growth inhibition of cancer cells induced by <sup>131</sup>I-labeled antibody, suggesting P2Y<sub>6</sub> receptor inhibitor as a novel radiosensitizer.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
交付決定額	3,400,000	1,020,000	4,420,000

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：内用放射線療法、<sup>131</sup>I-trastuzumab、ATP、細胞外 ATP 放出、P2 受容体、放射線抵抗性、P2Y<sub>6</sub>受容体、放射線増感剤

## 1. 研究開始当初の背景

近年、癌の治療法の一つとして放射性核種を結合させた抗体等を体内に投与し、癌細胞に密着した放射性核種による細胞レベルでの放射線照射により癌を治療する「内用放射線療法」が注目されている。我が国でも <sup>90</sup>Y 標識抗体（ゼパリン）が悪性リンパ腫に対する治療薬として 2008 年 1 月に認可を受け、臨床応用されている。このように、内用放射線療法は悪性リンパ腫の新たな治療法として優れた効果を発揮している一方で、固形癌に対しては様々な検討が行われているにも

関わらず、十分な効果が得られていない。一般に固形癌では、癌の増大に伴う癌組織内部の低酸素化、および低酸素化に基づく細胞周期制御、DNA 修復酵素や増殖因子の誘導、抗アポトーシス反応等により放射線感受性が低下しており、十分な放射線治療効果が誘導されづらいことが知られている。そこで、放射線感受性の低下を補う、つまり、放射線増感作用を有する薬剤を使用することにより、固形癌に対する内用放射線療法の現状を打破できると考えられる。これまで、放射線増感効果を目指して癌組織内の酸素濃度を向

上させる薬剤の開発が盛んに行われてきたが、臨床的に使用可能な放射線増感剤は未だ存在しない。従って、画期的な放射線増感剤の開発には、異なった視点からのアプローチが重要であることから、新たな標的分子の探索および新たな作用機序を持つ薬剤の設計が必要であると考えられる。

放射線生物学において、放射線照射を受けた細胞から様々な情報伝達物質が放出され、放射線非照射細胞に対しても放射線照射の影響が伝達される『放射線バイスタンダー効果』が新たな現象として注目されている。生体内エネルギー通貨として知られる ATP は細胞内に多量に存在し、虚血や浸透圧変化などの様々なストレス刺激によって細胞外へ放出され、P2 受容体を介して様々な生理現象を誘導する。申請者は放射線による生体影響について、ATP によるバイスタンダー効果という点に着目した研究を進めており、これまでに  $\gamma$  線照射による細胞外への ATP 放出、およびそれを介した細胞内シグナル活性化や細胞内抗酸化活性の増強について明らかにしている。一方で、P2 受容体活性化は細胞増殖や DNA 修復酵素の核内移行、ヒト血液細胞の放射線防護に寄与することが報告されていることから、放射線によって癌細胞から放出された ATP が、放射線抵抗性を誘導している可能性が十分に考えられる。しかしながら、癌細胞における放射線誘発性 ATP 放出の影響は知られていない。そこで、申請者は放射線照射によって放出された ATP による放射線抵抗性の誘導およびそのメカニズムを明らかにし、P2 受容体阻害薬を新規放射線増感剤として内用放射線療法の効果増強に利用できないかと考え、本研究を計画した。

## 2. 研究の目的

本研究は、固形癌に対する内用放射線療法の治療効果を向上させるため、内用放射線療法の妨げとなる新たな放射線抵抗性誘導機構を明らかにし、その機序に基づく放射線増感剤を見出すことを目的とする。具体的には、放射線誘発性 ATP 放出を介した癌の放射線抵抗性誘導機構について検討し、ATP 選択的受容体 (P2 受容体) を標的とした新規放射線増感剤の可能性を提示する。

## 3. 研究の方法

本研究では、内用放射線療法に用いられる  $^{131}\text{I}$  をヒト上皮増殖因子受容体 2 型 (HER2) 特異的抗体である trastuzumab に標識した、 $^{131}\text{I}$  標識 trastuzumab ( $^{131}\text{I}$ -trastuzumab) を合成し、細胞増殖抑制効果、放射線誘発性 ATP 放出、

放射線抵抗性誘導メカニズムについて検討した。

### (1) $^{131}\text{I}$ -trastuzumab の合成

日本アイソトープ協会より購入した  $^{131}\text{I}$  を、クロラミン T 法により trastuzumab に標識した。その後、限外濾過膜による精製・濃縮を行い、安定性、HER2 特異的結合活性について検討した。

### (2) $^{131}\text{I}$ -trastuzumab による細胞増殖抑制の検討

HER2 陽性ヒト卵巣癌細胞である SKOV3 に対する  $^{131}\text{I}$ -trastuzumab の放射能濃度依存的な細胞増殖抑制について検討した。具体的には、コロニー形成法に従い、SKOV3 に対して  $^{131}\text{I}$ -trastuzumab および trastuzumab を処置し、24 時間培養後、細胞を洗浄・回収し、200 cells/well で 6 well プレートに播種、14 日間培養した。培養後はクリスタルバイオレット染色を行い、コロニー数をカウントした。

### (3) $^{131}\text{I}$ -trastuzumab による細胞外 ATP 放出の検討

SKOV3 に対して  $^{131}\text{I}$ -trastuzumab 処置を行い、一定時間経過後に培養上清を回収し、培養上清中の ATP 濃度をルシフェリン・ルシフェラーゼ法により測定した。

### (4) 放射線誘発性 ATP 放出を介した放射線抵抗性誘導の有無についての検討

ATP 分解酵素である Apyrase 存在下において、 $^{131}\text{I}$ -trastuzumab による細胞増殖抑制について検討し、細胞外 ATP の消失による細胞障害性の変化を検討した。

### (5) 放射線誘発性 ATP 放出を介した放射線抵抗性誘導メカニズムの検討

SKOV3 における P2 受容体サブタイプの発現様式について、各 P2 受容体 (P2X<sub>1-7</sub>, P2Y<sub>1-6,8-14</sub>) に対するプライマーを用い、RT-PCR 法によって mRNA 発現を検討した。さらに、放射線抵抗性の誘導に関与する P2 受容体を探索するため、各 P2 受容体特異的アゴニストおよびアンタゴニスト存在下における  $^{131}\text{I}$ -trastuzumab による細胞増殖抑制について検討した。

## 4. 研究成果

### (1) $^{131}\text{I}$ -trastuzumab の合成

クロラミン T 法による  $^{131}\text{I}$ -trastuzumab の標識合成の結果、標識率：約 20%、放射化学的純度：約 96%、比放射能：105 MBq/mg となった。緩衝液および血漿中

における安定性について検討した結果、37°Cで24時間培養後においても85%以上が<sup>131</sup>I-trastuzumabとして存在した。また、HER2陽性細胞およびHER2陰性細胞を用いて、<sup>131</sup>I-trastuzumabのHER2特異的結合について検討したところ、HER2陽性細胞に対して高い結合性を有する一方で、未発現細胞への結合は殆ど認められず、HER2依存的な結合活性が認められた。

- (2) <sup>131</sup>I-trastuzumabによる細胞増殖抑制の検討  
<sup>131</sup>I-trastuzumabは、図1に示すようにSKOV3に対して放射能濃度依存的な細胞増殖抑制効果を示した。一方、<sup>131</sup>I-trastuzumabと同濃度のtrastuzumabで処置を行った場合には、細胞増殖抑制効果は認められなかったことから、<sup>131</sup>I-trastuzumabは<sup>131</sup>Iに依存した細胞増殖抑制効果を誘導していることが示された。

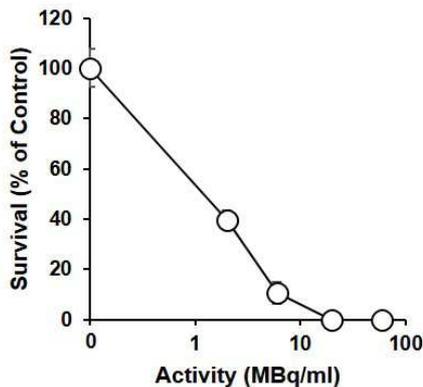


図1 <sup>131</sup>I-trastuzumabによる細胞増殖抑制効果

- (3) <sup>131</sup>I-trastuzumabによる細胞外ATP放出の検討  
細胞外ATP濃度は、図2に示すように<sup>131</sup>I-trastuzumab (4 MBq/ml)添加5分後から上昇が認められ、添加20分後にピークとなり、その後ベースラインにまで低下した。<sup>131</sup>I-trastuzumab (4 MBq/ml)と同濃度のtrastuzumabでは、細胞外ATP濃度の上昇は認められなかったことから、<sup>131</sup>Iによる放射線照射によってSKOV3において細胞外ATP放出が誘導されることが明らかとなった。

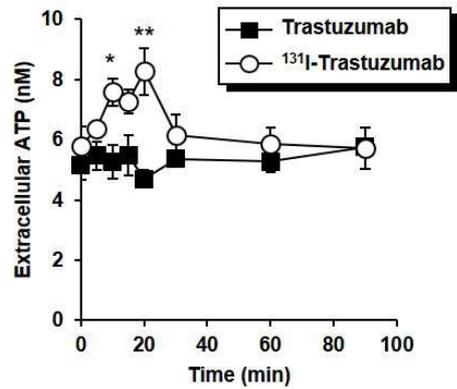


図2 <sup>131</sup>I-trastuzumabおよびtrastuzumab処置による細胞外ATP濃度の時間依存的変化  
\* P < 0.05, \*\* P < 0.01

- (4) 放射線誘発性ATP放出を介した放射線抵抗性誘導の有無についての検討  
<sup>131</sup>I-trastuzumab処置により細胞外へATPが放出され、放射線抵抗性に関与するかを検討するため、Apyrase存在下における<sup>131</sup>I-trastuzumab (4 MBq/ml)による細胞増殖抑制について検討したところ、0.5 U/mlのApyraseによって細胞増殖抑制の増強が認められた。(3)、(4)の結果より、<sup>131</sup>Iによる放射線により細胞外へ放出されたATPが放射線抵抗性の誘導に関与する可能性が示唆された。
- (5) 放射線誘発性ATP放出を介した放射線抵抗性誘導メカニズムの検討  
<sup>131</sup>I-trastuzumab処置によって細胞外へ放出されたATPは、ATPを放出した細胞自身もしくは隣接する細胞のP2受容体を活性化し、放射線抵抗性を誘導している可能性が考えられる。そこで、SKOV3に発現するP2受容体を解析し、さらに、各P2受容体を選択的なアゴニスト、アンタゴニストを作用させた場合における細胞増殖抑制について検討した。SKOV3におけるP2受容体の発現様式を検討したところ、P2X<sub>4</sub>、P2Y<sub>2</sub>、P2Y<sub>6</sub>受容体の顕著な発現が認められた。次に、<sup>131</sup>I-trastuzumabによる細胞増殖抑制に対する各P2受容体アゴニストの影響について検討したところ、図3に示すようにP2Y<sub>6</sub>受容体選択的アゴニストであるUDP存在下において、<sup>131</sup>I-trastuzumabによる細胞増殖抑制は有意に抑制された。さらに、P2受容体アンタゴニストの影響について検討したところ、P2受容体阻害薬であるPPADSおよびP2Y<sub>6</sub>受容体選択的阻害

薬である MRS2578 によって、<sup>131</sup>I-trastuzumab による細胞増殖抑制は有意に増強された (図 4)。

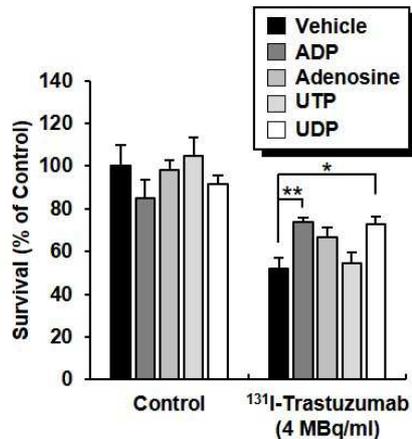


図 3 <sup>131</sup>I-trastuzumab による細胞増殖抑制に対する P2 受容体アゴニストの影響 (Vehicle: DMEM medium, ADP:100 μM, Adenosine: 100 μM, UTP: 100 μM, UDP: 100 μM, \* P < 0.05, \*\* P < 0.01)

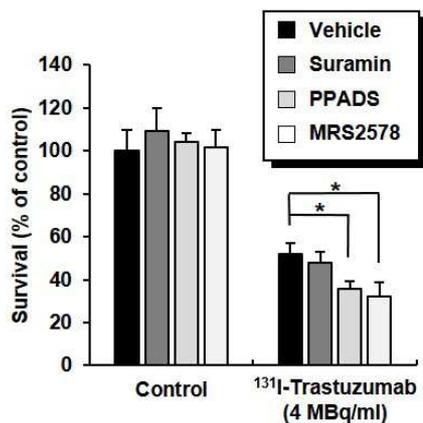


図 4 <sup>131</sup>I-trastuzumab による細胞増殖抑制に対する P2 受容体アンタゴニストの影響 (Vehicle: DMEM medium, Suramin:10 μM, PPADS: 10 μM, MRS2578: 1 μM, \* P < 0.05)

これらの結果より、<sup>131</sup>I による放射線照射によって細胞外へ放出された ATP は、P2Y<sub>6</sub> 受容体を介して放射線抵抗性を誘導していることが示唆され、P2Y<sub>6</sub> 受容体選択的阻害薬が新規放射線増感剤として有用である可能性が示された。また、P2Y<sub>1</sub>、P2Y<sub>12</sub> および P2Y<sub>13</sub> 受容体アゴニストである ADP 存在下においても <sup>131</sup>I-trastuzumab の細胞増殖抑制は有意に抑制された。これまでに P2Y<sub>1</sub> 受容体を介した DNA 修復タンパク質の核内移行の促進が報告されている。

SKOV3 における P2 受容体の発現様式の検討において、P2Y<sub>1</sub> 受容体の発現はわずかに認められたため、放射線誘発性 ATP は P2Y<sub>6</sub> 受容体に加えて、P2Y<sub>1</sub> 受容体を介することによって放射線抵抗性を誘導している可能性も示唆された。

#### 【まとめ】

内用放射線療法における新たな放射線抵抗性誘導機構として、<sup>131</sup>I-trastuzumab 処置によって細胞外へ放出された ATP が P2Y<sub>1</sub> および P2Y<sub>6</sub> 受容体を介して放射線抵抗性を誘導することが示唆された。また、内用放射線療法の新規放射線増感剤として、P2 受容体阻害薬、特に P2Y<sub>6</sub> 受容体阻害薬が有用である可能性が示唆された。

本研究は内用放射線療法における放射線誘発性 ATP 放出の生体影響を初めて明らかにすると同時に、内用放射線療法の治療効果向上のための新たな標的を提示した。P2Y<sub>6</sub> 受容体を標的とした放射線増感剤の開発について、今後、動物レベルでの評価を行い、その有効性について更なる検討を進める予定である。

#### 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 0 件)

[学会発表] (計 0 件)

[図書] (計 0 件)

[産業財産権]

○出願状況 (計 0 件)

○取得状況 (計 0 件)

[その他]

#### 6. 研究組織

##### (1) 研究代表者

大島 康宏 (OHSHIMA YASUHIRO)

独立行政法人日本原子力研究開発機構・量子ビーム応用研究部門・博士研究員

研究者番号：00588676