

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 4 月 8 日現在

機関番号：14401

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2012～2014

課題番号：24591844

研究課題名(和文)低酸素腫瘍細胞の酸素化直後における放射線治療効果を規定する機序の解明

研究課題名(英文)Effects of oxygenation on radiosensitivity for hypoxic tumor cells.

## 研究代表者

小川 和彦(OGAWA, KAZUHIKO)

大阪大学・医学(系)研究科(研究院)・教授

研究者番号：40253984

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,000,000円

研究成果の概要(和文)：本研究では、低酸素腫瘍細胞が酸素化された直後の状態における放射線治療効果を規定する機序の分子病理学的解明を目的とした研究を行っている。今回の検討により、低酸素+酸素化群は、低酸素状態継続群と比較して有意に、腫瘍増殖が遅延していることが明らかとなった。さらに、マウスモデルにおいては、照射単独群と比較して照射+高圧酸素併用群における78遺伝子の発現が低下していることがわかった。そして、その内の20遺伝子においては、HIF-1等の低酸素に関連する遺伝子群の発現の減弱が認められた。以上より酸素化の程度の違いによる腫瘍増殖速度と遺伝子発現状況の違いを明らかにすることができた。

研究成果の概要(英文)：This study has investigated the effects and the mechanisms of oxygenation on radiosensitivity for hypoxic malignant tumor cells. Our results have indicated that hypoxic tumor cells irradiated under hypoxic conditions and oxygenation had significantly slow growth compared to those irradiated under hypoxic conditions. Furthermore, concerning in vivo group treated by irradiation and hyperbaric oxygenation, 78 genes have down-regulated compared to the group treated by irradiation without HBO. Especially, hypoxia and HIF-1-related genes, such as vascular endothelial growth factor and Insulin-like growth factor-binding protein, have prominently down-regulated. These results indicate that oxygenation affects and tumor growth delay and changes of gene expression for hypoxic tumor cells.

研究分野：放射線腫瘍学

キーワード：低酸素腫瘍細胞 放射線抵抗性に関わる機序 放射線治療効果 遺伝子発現 酸素化

## 1. 研究開始当初の背景

放射線治療において、酸素は放射線治療効果を規定する強力な因子であり、低酸素細胞と有酸素細胞は放射線治療効果において約3倍の違いが生じることが明らかとなっている。従って、以前より悪性腫瘍の放射線治療における放射線抵抗性の原因の一つとして低酸素腫瘍細胞の存在が指摘されてきた。このような低酸素腫瘍細胞を酸素化することができれば、放射線治療効果を高めることが可能であると考えられる。われわれは、高圧酸素療法(HBO)併用放射線治療(HBO直後に放射線治療を行う治療法)を行い、この治療法が安全かつ効果的であることを示してきた(Ogawa K, *et al. Int J Radiat Oncol Biol Phys*, 2011)。HBO直後には、正常細胞は急速に酸素濃度が低下していくのに対して、腫瘍細胞ではしばらくの間高濃度の酸素が蓄積することが明らかとなっており、このようなHBO併用放射線治療により低酸素細胞を酸素化することができれば、放射線治療効果を高めて治療成績の向上に寄与することが期待される。しかしながら、HBO併用放射線治療を行っても全く治療効果が認められない症例も存在しており、放射線治療効果が有る腫瘍細胞と無い腫瘍細胞における実際の酸素状態の程度の違いの他に、遺伝子発現状況や間質の状態の違いが生じている可能性があると考えられた。実際に、低酸素腫瘍細胞はHIF-1、VEGF等の低酸素関連遺伝子群の発現をきたしている他、低酸素状態における間質の変化や癌幹細胞の形質維持の状況などが有酸素状態の腫瘍細胞とは異なっていることが予想される。しかしながら、低酸素腫瘍細胞が酸素化された直後の状態における放射線治療効果・遺伝子発現状況の変化や放射線治療効果を規定する機序については現在までに明らかになっていないのが現状である。

低酸素腫瘍細胞の酸素化直後の状態における遺伝子発現状態の検討を行うことにより放射線抵抗性の詳細な機序を明らかにすることができれば、低酸素腫瘍細胞に対してより効果的な低酸素細胞増感剤や放射線治療法の開発に結び付く可能性があると考えられる。

## 2. 研究の目的

低酸素腫瘍細胞が酸素化された直後の状態における放射線治療効果を規定する機序の解明を行う。

## 3. 研究の方法

低酸素腫瘍細胞が酸素化された直後の放射線治療による遺伝子発現プロファイルの変化を明らかにするため、*in vitro*、*in vivo*の両面において検討を行う。同定された放射線治療効果に關与すると考えられる遺伝子群において、機能解析を行う。さらに、臨床検体を用いて同定した遺伝子群の臨床的意義を検討する。

【1】低酸素腫瘍細胞の酸素化による放射線治療効果、遺伝子発現プロファイルの*in vitro*における検討(図1)

Oxygen glucose deprivationの状態にしたグリオブラスト-マ細胞(U87)、頭頸部癌細胞(SCCVII)( $2 \times 10^7$  cells/dish、培地10 ml)を低酸素状態(O<sub>2</sub>: 1%, CO<sub>2</sub>: 5%)で培養する。それらの細胞を照射中に低酸素状態と酸素化した状態(O<sub>2</sub>: 20%, CO<sub>2</sub>: 5%)において照射を行う。また、コントロールとして照射を行わないで途中酸素化した群を追加する。照射においては、1回照射(2 Gy, 5Gy, 10 Gy)のそれぞれにおける検討を行う。低酸素状態の確認には、照射前後でHIF-1、GLUT-1、RAD群の検討を行い、酸素化の有無と細胞レベルにおける照射の影響についての確認を行う。そして、これらの3群において放射線治療効果の違いを検討する。さらに、治療効果で有意差が認められた線量を1つ選び、それぞれの群において、照射または酸素化の1週間後にRNA抽出を行った後、マイクロアレイによる遺伝子発現プロファイルの違いを検討する。その結果は、Real-time PCRにて確認をする。

【2】低酸素腫瘍細胞の酸素化による放射線治療効果、遺伝子発現プロファイルの*in vivo*における検討

ヌードマウスに、低酸素細胞含有率が多いことが明らかとなっているグリオブラスト-マ細胞株(U87)や頭頸部癌細胞株(SCCVII)などを移植する。そして、そのまま照射した群とHBOを行った直後に照射する群を比較する(マウス、n = 10)。HBOにおいては、小動物用HBO治療用チャンバーにて暴露時間や気圧を変化させ、最適な条件にて行う。照射においては、1回照射(2 Gy, 5 Gy, 10 Gy)、分割照射2Gy or 3 Gy(朝夕1回づつ) x 3日間(合計12 Gy or 18 Gy)のそれぞれにおける検討を行う。さらに、コントロールとして照射を行わないでHBOを施行した群を追加する。それぞれの群における治療効果(Growth delay法の検討と標本による病理学的検索)の検討を行う。さらに、治療効果で有意差が認められた1回照射と分割照射の線量をそれぞれ1つ選び、再増殖後の腫瘍のRNA抽出後に、マイクロアレイにおける遺伝子発現

プロファイルの違いを検討する。

### [3] 放射線治療効果に関連する遺伝子群における機能解析の検討

同定された遺伝子群において、培養細胞レベルで遺伝子・蛋白レベルでの放射線による変動を明らかにする。また、同定された遺伝子において、細胞レベルでsiRNA施行細胞と未施行細胞における放射線治療効果の検討を行い、その意義を確認する。

## 4. 研究成果

Oxygen glucose deprivation の状態にしたグリオブラスト - マ細胞 (U87)、頭頸部癌細胞(SCCVII) ( $2 \times 10^7$  cells/dish、培地 10 ml)を低酸素状態(O<sub>2</sub>: 1%, CO: 5%)で培養し、それらの細胞を照射中に低酸素状態と酸素化した状態(O<sub>2</sub>: 20%, CO<sub>2</sub>: 5%)において照射を行なった。また、コントロールとして照射を行わないで途中酸素化した群を追加した。照射においては、1回照射(2 Gy, 5Gy, 10 Gy)のそれぞれにおける検討を行う。低酸素状態の確認には、照射前後でHIF-1、GLUT-1、RAD群の検討を行い、酸素化の有無と細胞レベルにおける照射の影響についての確認を行う。そして、これらの3群において放射線治療効果の違いを検討する。さらに、治療効果で有意差が認められた線量を1つ選び、それぞれの群において、照射または酸素化の1週間後にRNA抽出を行った後、マイクロアレイによる遺伝子発現プロファイルの違いを検討した。以上の検討からは、HIF-1等の低酸素に関連する遺伝子群の発現の減弱や消失が認められた。次に、U87においては腫瘍細胞をマウスに移植してコントロール群、照射群、照射+高圧酸素併用群の3群において比較を行った。照射においては、2 Gy/dayで合計20 Gy、高圧酸素は2.5気圧で30-60分を照射直前に施行した。以上の検討からは、照射+高圧酸素併用群は照射単独群、コントロール群と比較してgrowth delay法にて有意に腫瘍増殖の遅延が認められた。

今後は、マウスに照射を行った3群における遺伝子発現状況の同定、機能解析を行い、それらの放射線治療効果に関する意義を明らかにする。さらに、臨床検体を使用することにより、同定された放射線治療効果に関連する遺伝子群の臨床的意義を明らかにする予定である。

## 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 1 件)

片桐千秋、松下正之、小川和彦。  
Effects of hyperbaric oxygenation on hypoxic tumor cells. 第3回国際放射線神経生物学会大会。2013

[図書](計 0 件)

[産業財産権]

出願状況(計 0 件)

名称：  
発明者：  
権利者：  
種類：  
番号：  
出願年月日：  
国内外の別：

取得状況(計 0 件)

名称：  
発明者：  
権利者：  
種類：  
番号：  
出願年月日：  
取得年月日：  
国内外の別：

[その他]  
ホームページ等

## 6. 研究組織

(1)研究代表者 小川 和彦  
( OGAWA Kazuhiko )  
大阪大学大学院医学系研究科・教授  
研究者番号：40253894

(2)研究分担者 松下 正之  
( MATSUSHITA Masayuki )  
琉球大学医学部・教授  
研究者番号：30273965

(3)研究分担者 石内 勝吾  
( ISHIUCHI Syogo )  
研究者番号：10312878

(4)研究分担者 吉見 直巳  
( YOSHIMI Naoki )  
研究者番号：30166996

(5)研究分担者 合志 清隆  
( KOSHI Kiyotaka )

研究者番号： 90195660

(3) 連携研究者 村山 貞之

(MURAYAMA Sadayuki )

研究者番号： 60239548

図 1

