

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 5 月 23 日現在

機関番号：12301

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2012～2013

課題番号：24791276

研究課題名(和文)低酸素腫瘍に対するX線・重粒子線感受性の分子生物学的機構の解明に関する基礎的研究

研究課題名(英文)Basic research of X-ray and carbon ion beam radiation sensitivity for the treatment of hypoxic tumor cells and investigation of its molecular biological mechanism

研究代表者

齋藤 淳一 (Jun-ichi, Saitoh)

群馬大学・医学(系)研究科(研究院)・講師

研究者番号：70572816

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,800,000円、(間接経費) 840,000円

研究成果の概要(和文)：通常酸素，低酸素条件におけるmTOR阻害剤による放射線感受性の修飾について検討した．実験にはヒト肺腺癌細胞株A549を使用し，タンパク質発現はウェスタンブロット、細胞生存率はcolony assay法で解析した．細胞の生存が10%となる線量(D10)から酸素増感比(OER)を求めた．Temsirrolims併用により低酸素条件下で誘導されるHIF-1aの発現は減少した．X線単独での通常酸素，低酸素条件下のD10は、それぞれ5.1Gy、14.2Gyで、OERは2.8であった．Temsirrolimus併用下では通常酸素，低酸素条件下のD10はそれぞれ4.8Gy、5.4GyでOERは1.1であった．

研究成果の概要(英文)：The effect of mTOR on the radioresistance of cancer cells under hypoxia was evaluated using mTOR inhibitor, temsirolimus. Clonogenic survival assays were performed to examine the survival rate of the human lung adenocarcinoma cell line, A549. The oxygen enhancement ratio was calculated for the dose at which 10% of the cells survive (D10) under normoxia and hypoxia. Western blotting was performed to investigate how temsirolimus affects on mTOR and HIF-1 pathway under normoxia and hypoxia. A549 cells under normoxia and hypoxia showed radioresistance as indicated that D10 values of cells under normoxia and hypoxia were 5.1 Gy and 14.2 Gy, respectively. By combination use of temsirolimus, cell surviving rates of A549 cell under hypoxia were decreased in compared to those under normoxia and showed D10 values of cells under normoxia and hypoxia were 4.8 Gy, and 5.4 Gy, respectively. The cells in hypoxic condition expressed higher HIF-1 and the expression level of HIF-1 were decreased by temsirolimus.

研究分野：放射線生物学

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：放射線抵抗性 低酸素 mTOR HIF-1

1. 研究開始当初の背景

腫瘍内の低酸素状態を評価することは、放射線治療にとって重要である。低酸素状態にある細胞は酸素に富む状態に比べ、X線照射の場合で約2.5~3倍放射線抵抗性であることが知られている。ヒトの固形腫瘍では、腫瘍の増殖の状態に応じて低酸素細胞が腫瘍内に不均一に存在し、放射線感受性を低下させる主因となっていると考えられている。近年の分子生物学的研究では、低酸素はVEGFなどの血管新生因子の発現と関係するだけでなく、p53やbcl-2などのアポトーシスに関連する分子とも密接な関係をしていることが報告されている。低酸素は放射線に対する抵抗性を誘導するとともに、腫瘍の浸潤や転移といった腫瘍の悪性度と直接関係している可能性も示されている。

本研究の研究代表者(齋藤)は、これまでに、酸素分圧測定や低酸素細胞マーカーを用いた腫瘍内低酸素状態の評価に関する研究成果を発表している。その結果、微小電極をマウスに移植した腫瘍内に刺入して酸素分圧を測定する方法では、腫瘍の大きさが増すと酸素分圧は有意に低下しており、in vivoで放射線照射を行い、直後に腫瘍を摘出してin vitroでコロニーアッセイ法を行うと、腫瘍容積の増加により明らかに、放射線感受性は低下していた。また本研究の研究代表者は、平成22年度、23年度に“低酸素腫瘍に対するX線と炭素イオン線の感受性と分子生物学的機構に関する基礎的研究”の研究課題による科学研究費の補助により、肺癌細胞A549において、0.1mmHg以下の低酸素状態では1時間の曝露で明らかなHIF-1 α の誘導がみられたこと、低酸素状態1時間の曝露で常酸素の状態と比して2.6倍放射線抵抗性であったこと、ただし、この急性低酸素の条件下においてはHIF-1 α 阻害剤の添加により放射線抵抗性は改善されなかったことを報告した。また肺癌細胞A549、H3255において、低酸素状態と関連する因子である一酸化窒素の合成阻害剤を放射線照射と併用することで放射線感受性が増加したこと、HIF-1 α とEGFRの発現およびPDK1の活性が減少したこと、また、EGFR野性株のA549では一酸化窒素の合成阻害剤とゲフィチニブを併用することにより顕著な放射線増感効果が認められたことを報告した。

群馬大学では、放射線抵抗性難治腫瘍の新たな治療法確立のため、炭素イオン線治療を開始している。X線に対して抵抗性である低酸素腫瘍は、炭素イオン線の強い殺細胞効果に期待が寄せられている。しかし、低酸素腫瘍に対する重粒子線治療の基礎的、臨床的效果に関する研究や、低酸素状態と放射線感受性、低酸素に関連する分子生物学的機序に関しては未知な点も多い

2. 研究の目的

以上から、低酸素腫瘍に対する放射線治療戦略を作成する上で、(1)低酸素状態に関連する分子生物学的機序の詳細な検討を引き続き行うことが必要であり、(2)低酸素腫瘍における炭素イオン線の治療効果に関する検討を行い、炭素イオン線治療のX線抵抗性腫瘍に対する臨床的適応拡大に向けた至適な生物学的効果の解明に関した検討が必要と考えられる。

具体的には、(1)に関しては、低酸素腫瘍の実験系においてHIF-1の上流のregulatorとされるMammalian target of rapamycin (mTOR)の発現・活性や、放射線照射時にHIF-1, mTORの阻害剤を併用することによる感受性の変化や低酸素因子の変動に関する検討を行う。

(2)に関しては、酸素濃度を可変できるチェンバー内に腫瘍細胞を設置した状態で放射線照射を行うことにより酸素濃度とX線、炭素イオン線の抗腫瘍効果について比較検討を行う。

3. 研究の方法

実験にはヒト肺癌由来細胞株A549を使用した。通常酸素条件、低酸素条件下の細胞生残率については、低酸素条件として、低酸素チェンバー(京都科学)を使用し、酸素分圧 <0.1 mmHgの条件で24時間培養の後に照射し、そのまま1時間 <0.1 mmHgで培養した後に細胞を回収、希釈して10日間培養し、コロニー数を計測することで評価した。mTOR阻害剤(Temsirolimus)の至適濃度の決定は、通常酸素条件下において薬剤を0.01~10nM 10倍希釈で48時間接触させ、同条件のコロニー形成法で評価した。薬剤併用下での細胞生残率の変化については、mTOR阻害剤を48時間接触させ、通常酸素、または酸素分圧 <0.1 mmHgの条件で24時間培養の後に照射し、そのまま1時間 <0.1 mmHgで培養した後に細胞を回収、希釈培養し、コロニー数を計測することで評価した。また、細胞の生存が10%の値となる線量(D10)から酸素増感比を求めた。

細胞のタンパク質発現に関してはウェスタンブロット法により解析した。上記条件と同様の通常酸素条件、低酸素条件下におけるmTOR、リン酸化mTOR、HIF-1 α 、リン酸化p70S6キナーゼ、リン酸化4E-BP1の発現について検討を行った。

4. 研究成果

X線単独での、通常酸素条件、低酸素条件下のD10は、それぞれ5.1Gy、14.2Gyで、酸素増感比は2.8であった(図1)。mTOR阻害剤の至適濃度については、IC50は0.08Mであり、細胞生残率が25%であった1nMを以降の研究での併用濃度と決定した。mTOR阻害剤を

併用した場合は、通常酸素条件・低酸素条件下の D10 は、それぞれ 4.8Gy, 5.4Gy で、酸素増感比は 1.1 であった (図 2)。

通常酸素条件下で mTOR 阻害剤を併用した場合の殺細胞効果は相加効果と考えられたが、低酸素条件下では mTOR 阻害剤併用により、細胞生存率は高線量域において著明に低下し、特に低酸素条件下で放射線増感作用を持つと考えられた。

通常酸素条件下、低酸素条件下ともに、mTOR 阻害剤併用群において mTOR の発現は同様に抑制された。また、mTOR 阻害剤併用により、低酸素条件下で誘導される HIF-1a の発現は濃度依存性に減少した。リン酸化 p70 S6 キナーゼとリン酸化 4E-BP1 の発現については、これらの発現は低酸素条件下では観察されず、通常酸素条件下での発現が mTOR 阻害剤併用により抑制された (図 3)。

mTOR 阻害薬の併用により、低酸素条件下で放射線増感効果が認められ、mTOR が低酸素細胞の放射線治療抵抗性に関連する因子である可能性が示唆された。その作用メカニズムには mTOR 阻害薬による HIF-1a 発現低下が関連している可能性が考えられた。

図 1

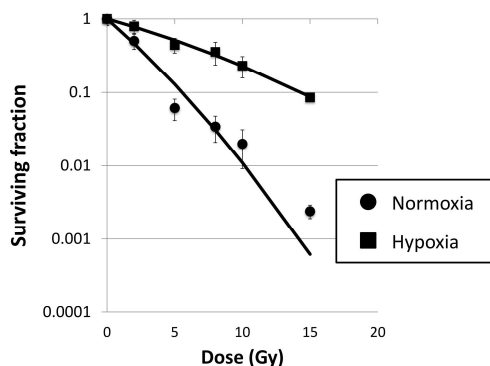


図 2

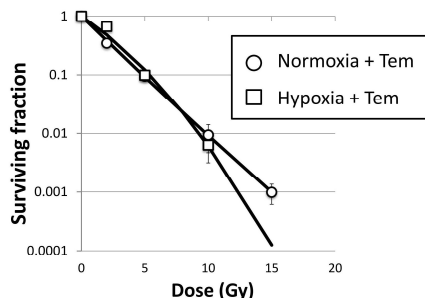
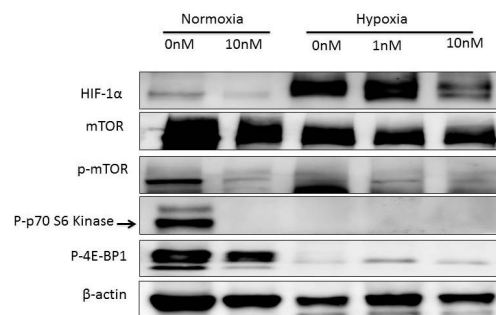


図 3



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 2 件)

1. 牛島弘毅, 鈴木義行, 尾池貴洋, 齋藤淳二, 中野隆史. 通常酸素・低酸素条件下における mTOR 阻害剤(Temsirolimus)の放射線増感効果. 第 50 回 日本放射線腫瘍学会 生物部会学術大会. 2012 年 06 月 30 日, 沖縄県宜野湾市.

2. Hiroki Ushijima, Jun-ichi Saitoh, et al. Radiosensitizing Effects of mTOR Inhibitor(Temsirolimus) under Normoxic/Hypoxic Conditions. 54th ASTRO Annual Meeting. 2012 年 10 月 28 日 ~ 2012 年 10 月 31 日, Boston, USA.

[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:

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

齋藤 淳一 (SAITOH JUN-ICHI)

群馬大学・大学院医学系研究科・講師

研究者番号：70572816

(2) 研究分担者

()

研究者番号：

(3) 連携研究者

()

研究者番号：