

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 6 月 6 日現在

機関番号：32620

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2013～2016

課題番号：25461927

研究課題名(和文) Hsp 90を標的とした低酸素細胞放射線増感に関する基礎的研究

研究課題名(英文) Hypoxic radiosensitization by DMAG, an Hsp90 inhibitor

研究代表者

笹井 啓資 (Sasai, Keisuke)

順天堂大学・医学部・教授

研究者番号：20225858

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,900,000円

研究成果の概要(和文)：Hsp90阻害剤17-[2-(Dimethylamino) ethyl]amino-17-desmethoxy geldanamycin (DMAG)の低酸素細胞放射線増感効果を明らかにした。ヒト由来細胞HT1080および HeLa細胞について常酸素状態および低酸素状態でDMAGの放射線増感効果をコロニー法で求めた。常酸素状態での100nM DMAG 24時間暴露ではわずかな放射線増感効果を両細胞で認めた。4時間の低酸素処理を加えると著明な増感効果を示した。HeLa細胞を100nM DMAG 24時間暴露した場合、Hsp90抑制と細胞周期への影響はみとめたが、低酸素処理を加えても差異はなかった。

研究成果の概要(英文)：We investigated the radiosensitizing activity of 17-[2-(dimethylamino)ethyl] amino-17-desmethoxygeldanamycin (DMAG), an inhibitor of Hsp90, on hypoxic cells. Two human tumor cell lines, HT1080 and HeLa, were used. The radiosensitivity of cells was assessed by a standard colony-forming assay. The exposure of HeLa cells to 100nM DMAG for 24 h significantly increased the expression of Hsp70, a marker of Hsp90 inhibition. However, there was no difference in its expression between cases with and without hypoxic treatment for 4 h. Exposure to DMAG for 24 h was slightly cytotoxic, but no further effect was observed with the additional hypoxic treatment. DMAG at 100nM showed a weak radiosensitizing effect on both cells under oxalic conditions. However, Sensitizer enhancement ratios for hypoxic HeLa and HT1080 cells were significantly greater than those for oxalic cells. Western blot analysis also demonstrated that the treatment decreased the expression of HIF-1 alpha.

研究分野：放射線科学

キーワード：低酸素細胞放射線増感 Hsp90阻害剤 DMAG

1. 研究開始当初の背景

放射線治療成績を改善させる方法としては、物理的に放射線を集中させる方法と薬剤等の併用により正常組織と腫瘍組織の感受性の違いを増強させる生物学的方法が存在する。生物学的方法として放射線増感剤、温熱療法などの研究が盛んに行われてきた。放射線増感剤は「貧者の粒子線治療」と期待されたが、残念ながら大きな成果を上げるに至っていない。

かつて期待された低酸素細胞増感剤は、世界的に臨床研究が進められたがニモダールを除いて有用性が証明できなかった。ニモダールもデนมマークのみで有用性が認められたのみで、臨床応用も同国内に留まっている。本邦では本研究代表者を含めて多くの研究者が候補薬剤を開発してきた。

本研究代表者らはフッ素化ニトロイミダゾール KU2285 を開発したが、本格的な臨床試験を実施することができなかった。このような状況で、臨床現場では種々の抗癌剤との同時併用治療が一般的になっている。特に、頭頸部、肺、食道、婦人科領域では化学放射線療法が標準治療となりつつあるが、十分に満足できる治療成績を上げているとは言いがたい。

分子シャペロンである Heat-shock protein 90 (Hsp 90) は細胞内蛋白の約 1% を占め、種々の遺伝子発現に重要な役割を担っている。多くの癌細胞では過剰発現を呈していることが明らかになっており、癌治療において新しいターゲットとして注目を浴びている。すでに、15 種類以上の Hsp90 阻害剤が単独あるいは抗癌剤との併用で臨床試験が行われている。この中では Geldanamycin 誘導体である 17AAG が最も開発が進んでいる。放射線との併用でも、*in vitro* で Kubota らが常酸素状態の細胞に対して放射線増感作用を報告している。

低酸素環境は悪性腫瘍内に存在し放射線の感受性を低下させることは、放射線生物学の分野では古くから知られている。近年の研究により、低酸素環境は、HIF1 などを介して VEGF などの多くの遺伝子発現を誘導することが明らかになってきた。Hsp90 は HIF1 を介した遺伝子発現にも重要な役割を担っていることが判明し、Hsp90 阻害剤が低酸素細胞放射線増感作用を有することが示唆されている。

本研究では新しい放射線増感ターゲットとしての HSP90 の特徴を明らかにする。特に Hsp90 阻害剤の低酸素細胞放射線増感作用と、その分子メカニズムを検討することで、新たな発想に基づく臨床応用可能な低酸素細胞放射線増感剤の開発を行う。

2. 研究の目的

分子シャペロンである Hsp 90 は細胞内蛋

白の約 1% を占め、種々の遺伝子発現に重要な役割を担っている。また、多くの癌細胞では過剰発現を呈している。腫瘍特異的な低酸素環境では Hsp90 が HIF1 を介する遺伝子発現に重要な役割を担っている。本研究は Hsp90 阻害剤を用いて、新たな低酸素細胞放射線増感剤を開発することを目的とする。

3. 研究の方法

Hsp90 阻害剤は 17-[2-(Dimethylamino)ethyl]amino-17-desmethoxy geldanamycin (DMAG) を使用した。DMSO に溶解後冷凍保存し、使用時に溶解希釈して細胞へ投与した。

使用した細胞はヒト由来 HT1080 (fibrosarcoma)、HeLa (uterine cervical cancer) および HSC-2 (oral squamous cell carcinoma) である。HT1080 および HeLa 細胞は ATCC より入手した。HSC-2 は JCRB 細胞バンクより購入した。実験は対数増殖期で行った。細胞は実験 3 日前に 2×10^5 を T25 フラスコに移植した。48 時間後に薬剤を投与し 24 時間暴露した。放射線照射は医療用リニアック 4MV X 線を用いて full build-up で行った。

細胞生存率はコロニー法で求めた。細胞を EDTA-トリプシンを用いて単細胞とし、最終的にコロニーが 50-100 個程度できるように調整した細胞数をディッシュに再移植した。10 日から 14 日間培養後、エタノールで固定しギムザ液でコロニーを染色した。50 個以上の細胞を有する集団をコロニーとして計測した。

酸素効果比および放射線増感率 (SER) は細胞生存率が 1% になる線量の比で計算した。細胞生存率は独立した 3 回以上の実験結果から求めた。

低酸素環境はアネロバック・ケンキ (三菱ガス化学) を用いて作成した。上述の細胞培養用フラスコをアネロバック・ケンキ用のジャー内で実験直前の 4 時間暴露させた。この条件での酸素効果比は 2.0-2.5 であった。但し、後述するように HSC-2 では 1.6 と低値であった。

薬剤の細胞周期への影響はフローサイトメトリーで求めた。

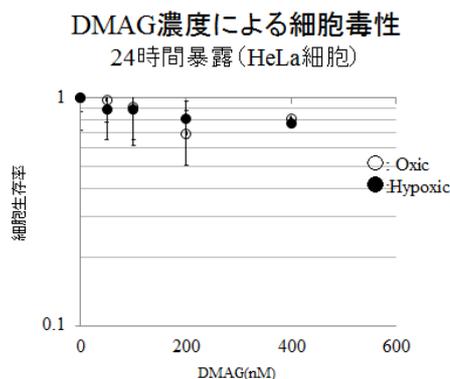
DMAG による Hsp90 の抑制効果は、Hsp90 抑制の指標である Hsp70 の発現をウエスタンブロット法で計測した。また Hsp90 と相互作用を有する HIF-1 α の発現もウエスタンブロット法で計測した。

4. 研究成果

(1) 薬剤の細胞毒性

HeLa 細胞を用いて、50-400nM の薬剤に 24 時間暴露時の細胞生存率を求めた。細胞生存率は濃度依存性に低下したのも 400nM

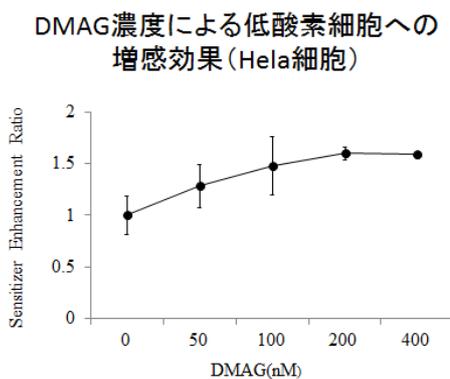
でも 0.81(SD 0.19)であった。アネロバックを用いて後半の4時間を低酸素環境にした場合でも細胞生存率に差異はなく 400nM で 0.77(0.15)であった。HT1080 細胞でもほぼ同様の結果であった(下図)。



(2) 酸素増感効果

HeLa 細胞を用いて常酸素状態および低酸素状態で DMAG100nM 24 時間暴露による放射線増感効果を求めた。低酸素環境は細胞毒性試験と同様の条件とした。常酸素状態では放射線増感効果はわずかであり SER は 1.3(SD 0.15)であった。一方、低酸素状態では SER 1.7(SD 0.25)と大きな増感効果を確認した。

次に低酸素細胞に対する増感効果の濃度依存性を求めたが、50nM、100nM、200nM、400nM で SER は 1.3(SD 0.18)、1.5(0.21)、1.6(0.28)、1.6(0.06)と 100nM 以上では大きな変化がなかった(下図)。



HT1080 細胞について 100nM で同様の実験を行った。常酸素細胞では HeLa 細胞同様に SER 1.1(0.06)と増感効果はあまり認められなかったが、4 時間の低酸素処理を加えると SER は 1.5(0.03)と有意に強い増感効果を確認した。

次に、HSC-2 細胞を用いて同様の実験を施行した。HSC-2 は CD44-variant が発現し、細胞外からシステインを取り込む性質が報告されている。HSC-2 を用いてコロニー法で

放射線増感効果を求めたが、常酸素細胞および低酸素細胞では SER それぞれ 1.0(0.09)、1.1(0.11)と放射線増感効果をほとんど認めなかった。また酸素増感比も 1.6(0.10)と他の細胞から有意に低値を示した。

以下に細胞毎の処理と増感率を示す。

増感効果のまとめ

| 細胞 | 濃度(nM) | 常酸素 | 低酸素 | 酸素効果比 |
|--------|--------|-----------|-----------|-----------|
| Hela | 50 | | 1.3(0.3) | |
| | 100 | | 1.5(0.2) | |
| | 100* | 1.2(0.2) | 1.7(0.3) | 2.5(0.5) |
| | 200 | | 1.6(0.3) | |
| | 400 | | 1.6(0.06) | |
| HT1080 | 100 | 1.1(0.06) | 1.5(0.3) | 2.1(0.06) |
| HSC-2 | 100 | 1.0(0.09) | 1.1(0.11) | 1.6(0.10) |

*は別シリーズの実験結果

(3)DMAG 暴露による細胞周期への影響

細胞周期は放射線感受性に強く影響するため、DMAG 暴露による細胞周期への影響を検討した。フローサイトメトリーで求めた DMAG100nM24 時間処理で S 期の変化が示唆されたが、低酸素処理の有無で有意な影響は認めなかった。したがって、細胞周期への影響が放射線増感には直接関与しないと考えられた。

(4)DMAG 暴露によるタンパク発現の変化

Hsp90 発現に対する DMAG100nM 24 時間処理の抑制効果を確認するため、Hsp90 抑制の指標である Hsp70 発現の程度を、HT1080 細胞を用いてウエスタンブロット法で測定した。低酸素処理の有無では Hsp70 の発現に差異を認めなかった。DMAG100nM 24 時間処理により、常酸素および低酸素どちらの条件でも有意に Hsp70 の発現が増加し Hsp90 の抑制を認めた。なお、常酸素および低酸素両条件には差がなかった。Hsp90 は発現量が多いため、今回の低酸素処理条件では大きな影響を受けなかったものと考えられた。

次に低酸素刺激により安定化して HIF1-β と二量体を形成し、HRE に結合することで GULT-1 や Nur77 などの細胞生存に關与する遺伝子をはじめ種々の遺伝子発現に關与する HIF1-α について検討した。Hsp90 は HIF1-α と相互作用をすることが知られている。

HIF1-α 発現に対する DMAG100nM 24 時間処理の影響を、HT1080 細胞を用いてウエスタンブロット法で測定した。

DMAG100nM 24 時間処理により、常酸素状態および低酸素状態で有意に HIF1-α の発現が抑制された。ただ、常酸素状態および低酸

素状態で HIF1- α 発現に差が認められず、その原因は明らかにならなかった。

(5)研究結果に対する考察とまとめ

Hsp90 阻害剤 DMAG は 0-400nM の範囲では、細胞毒性は軽度であった。HT1080 細胞および HeLa 細胞では常酸素細胞に対する放射線増感効果はわずかしか認められなかったが、低酸素細胞に対しては放射線増感率 1.3-1.7 程度の増感効果を示した。

一方、HSC-2 細胞では酸素状態を問わず、放射線増感効果が認められなかった。HSC-2 は CD44-variant が発現し、細胞外からシステインを取り込む性質があり、システインの-SH 基が放射線効果においては酸素と競合的に作用することが知られている。今後、HSC-2 細胞と他細胞との DMAG 効果の違いについて検討が必要と考えられた。

DMAG の細胞周期への影響は認められるが、あまり顕著ではなかった。Hsp90 阻害により HIF1- α 発現が抑制されることが明らかになり、HIF1 で発現が制御されるタンパクがこの低酸素増感効果に影響している可能性が示唆された。

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)

Kunogi H, Sakanishi T, Sueyoshi N, Sasai K. Prediction of Radiosensitivity Using Phosphorylation of Histone H2AX and Apoptosis in Human Tumour Cell Lines. Int J Radiat Biol. 90(7):587-93, 2014. doi: 10.3109/09553002.2014.907518.

Tabe Y, Hatanaka Y, Nakashiro M, Sekihara K, Yamamoto S, Matsushita H, Kazuno S, Fujimura T, Ikegami T, Nakanaga K, Matsumoto H, Ueno T, Aoki J, Yokomizo T, Konopleva M, Andreeff M, Miida T, Iwabuchi K, Sasai K. Integrative genomic and proteomic analyses identifies glycerol-3-phosphate acyltransferase as a target of low-dose ionizing radiation in EBV infected-B cells. Int J Radiat Biol. 92(1):24-34, 2016. doi: 10.3109/09553002.2015.1106021

〔学会発表〕(計 1 件)

Mizuno R, Sasai K, Nakashiro M. Hypoxic radiosensitization by DMAG, an Hsp90 inhibitor. 2017 年 9 月 24 日-27 日発表予定 ASTRO (アメリカ放射線腫瘍学会) 第 59 回 学術大会 サンディエゴ市 カリフォルニア州

〔図書〕(計 0 件)

〔産業財産権〕

出願状況 (計 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 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

笹井 啓資 (SASAI, Keisuke)
順天堂大学・医学部・教授
研究者番号：20225858

(2)研究分担者

田部 陽子 (TABE, Yoko)
順天堂大学・医学研究科・特任教授
研究者番号：70306968

(3)連携研究者

()

研究者番号：

(4)研究協力者

朝比奈 泰斗 (ASAHINA, Taito)