

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 6 月 2 日現在

機関番号：11101

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2013～2014

課題番号：25861056

研究課題名(和文)照射後血中オステオポンチンを指標としたHIF-1阻害剤併用放射線治療法の開発

研究課題名(英文)Development of the combination radiation therapy with the HIF-1 inhibitor that assumed blood osteopontin after irradiation an indicator.

研究代表者

佐藤 まり子(SATO, Mariko)

弘前大学・医学部附属病院・その他

研究者番号：30645263

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,100,000円

研究成果の概要(和文)：腫瘍微小環境における低酸素状態はがん放射線治療の抵抗因子となる。近年開発された薬剤LW6は、抵抗性獲得の一端を担うHIF-1の蓄積を阻害することで低酸素腫瘍の治療抵抗性改善に働くことが期待される。

ヒト肺腺癌A549細胞を用い、LW6を培地中に投与して通常酸素または低酸素(1% O₂)下で培養し、アポトーシス解析とミトコンドリア膜電位を評価した。結果、LW6が低酸素細胞選択的にミトコンドリア膜電位の脱分極を介して活性酸素種(ROS)産生を増強し、アポトーシスを誘導することが明らかとなった。

LW6は、特に腫瘍組織中の低酸素細胞を標的としたがん治療への新たな戦略のひとつとなる可能性を有する。

研究成果の概要(英文)：Hypoxia-inducible factor 1 (HIF-1) activates the transcription of genes that act on the adaptation of cancer cells to hypoxia. LW6, a recently developed HIF-1 inhibitor, is expected to improve resistance to cancer therapy in hypoxic tumors by inhibiting the accumulation of HIF-1.

In this study, we revealed that LW6 induced hypoxia-selective apoptosis together with the loss of mitochondrial membrane potential. The intracellular reactive oxygen species levels increased in LW6-treated hypoxic A549 cells and LW6 induced a hypoxia-selective increase of mitochondrial reactive oxygen species.

In conclusion, LW6 inhibits the growth of hypoxic A549 cells by affecting the mitochondria. The inhibition of the mitochondrial respiratory chain has emerged as a useful strategy to maneuver apoptosis in cancer cells.

研究分野：放射線治療

キーワード：低酸素 HIF-1阻害剤 アポトーシス ミトコンドリア脱分極 活性酸素

1. 研究開始当初の背景

腫瘍微小環境における低酸素状態はがん放射線治療の抵抗因子となる。この一端を担う Hypoxia-inducible factor-1 α (HIF-1 α) は腫瘍血管増生や再発・転移を促進する。近年、放射線照射後に残存する腫瘍細胞では HIF-1 α が誘導されており、癌の再発に関与する可能性が報告された (Nat Commun 2012)。その分子生物学的機序は不明であったが、最近我々は、電離放射線が腫瘍細胞内の reactive oxygen species (ROS) レベルを遅発性に増大させること、この遅発性 ROS 蓄積は特に低酸素状態で顕著に起こり、再酸素化後も HIF-1 α の発現を有意に増強させるという極めて重要な研究成果を得た。つまり放射線照射後に残存した低酸素腫瘍細胞では、照射によってさらに治療抵抗性が増した状態にある。したがって低酸素状態にある腫瘍組織の存在を把握し、HIF-1 カスケードを阻害することで放射線治療効果を向上させることができると考えられる。

HIF-1 α は酸素存在下で von Hippel-Lindau (VHL) タンパク質による水酸化を契機として、ユビキチンプロテアソーム系で分解される。近年開発された薬剤 LW6 は VHL タンパク質の発現を増強し、低酸素下でも HIF-1 α の分解を誘導し治療抵抗性を改善することが報告された (Biochem Pharmacol 2010)。放射線照射のタイミングに合わせて LW6 を投与することにより、放射線照射による不可避な HIF-1 α 発現による治療抵抗性の増強を抑制し、治療効果を大幅に増強させることが期待される。

2. 研究の目的

腫瘍再酸素化との相乗効果が期待される VHL タンパク質発現増強薬 LW6 を併用して HIF-1 カスケードを阻害することによって、放射線治療効果の向上を狙う。

3. 研究の方法

実験にはヒト肺腺癌 A549 細胞を用いた。

(1) LW6 の HIF-1 α 発現抑制作用の評価

20 μ M LW6 を培地中に投与して、通常酸素下で細胞を 12 時間培養した。

通常酸素下または低酸素 (1% O₂) 下で 8 時間培養後、細胞を回収し、HIF-1 α および VHL 発現量をウェスタンブロット法にて評価した。

通常酸素下または低酸素 (1% O₂) 下で 20 時間培養後、細胞を回収し、HIF-1 α 発現量をフローサイトメトリーにて評価した。

(2) LW6 の細胞毒性評価とアポトーシスに関する作用の評価

ミトコンドリアの代謝毒性を評価するた

め、20 μ M LW6 をそれぞれ培地中に投与して通常酸素下で 24 時間細胞を培養し、MTS アッセイを行った。

また、0、10、20、50 μ M LW6 をそれぞれ培地中へ投与し、通常酸素下または低酸素 (1% O₂) 下で細胞を 48 時間培養後、トリパンブルー色素排除試験を行った。

次に、LW6 のアポトーシスに関する作用を評価するため、20 μ M LW6 を培地中に投与して通常酸素下で 12 時間培養した。

通常酸素下または低酸素 (1% O₂) 下で 36 時間培養後、細胞を回収した。細胞を Annexin- および PI で共染色し、フローサイトメトリーにてアポトーシス細胞の割合を評価した。

通常酸素下または低酸素 (1% O₂) 下で 48 時間培養後、細胞を回収した。FITC-conjugated monoclonal active caspase-3 antibody apoptosis kit を用いてアポトーシス誘導に関する酵素のひとつである活性化型カスパーゼ 3 を標識し、フローサイトメトリーにて発現量を評価した。

(3) LW6 の細胞周期に対する作用の評価

20 μ M LW6 を培地中に投与して、通常酸素下で細胞を 12 時間培養後、通常酸素下または低酸素 (1% O₂) 下で 36 時間培養し細胞を回収した。TritonX100 で細胞膜透過処理を行い、PI で染色してフローサイトメトリーにて細胞周期解析を行った。

(4) LW6 によるミトコンドリア由来 ROS 産生量およびミトコンドリア膜電位の変化に関する解析

20 μ M LW6 を培地中に投与して、通常酸素下で細胞を 12 時間培養した。

通常酸素下または低酸素 (1% O₂) 下で培養し 0、2、4、8、12、24 時間後に細胞を回収した。MitoSOXTM RED を用いてミトコンドリア由来 ROS を染色し、フローサイトメトリーにて ROS 産生量を評価した。

通常酸素下または低酸素 (1% O₂) 下で 8 時間培養後、JC-1 で染色し、蛍光顕微鏡で観察した。

通常酸素下または低酸素 (1% O₂) 下で 8 時間培養後、細胞を回収した。JC-1 で染色し、フローサイトメトリーにてミトコンドリア膜電位を評価した。

4. 研究成果

HIF-1 α 発現は低酸素曝露により増強し (P < 0.01)、LW6 投与により、低酸素誘導性 HIF-1 α 発現は抑制された (P < 0.01)。通常酸素下において、LW6 の HIF-1 α 発現抑制作用は認めなかった。また、VHL 発現量は LW6 投与により変化しなかった。したがって、LW6 の HIF-1 α 発現抑制作用は、VHL 発現増強によるものではないことが示された。

MTS アッセイにおいて、20 μ M LW6 では細胞毒性を認めなかった。トリパンブルー色

素排除試験では、LW6 投与によって低酸素細胞の生残率が通常酸素細胞の生残率よりも有意に低下し、この細胞毒性は濃度依存性を示した。アポトーシス解析では、通常酸素細胞においては LW6 投与と非投与でアポトーシス細胞の割合に変化は認めなかった ($0.76\pm 0.49\%$ vs. $1.12\pm 0.20\%$, $P > 0.05$) が、低酸素細胞では LW6 投与により有意に増加した ($2.23\pm 0.39\%$ vs. $5.54\pm 0.32\%$, $P < 0.01$)。さらに、この LW6 による低酸素腫瘍細胞に対するアポトーシス誘導について、カスパーゼ経路の関与を評価するため、活性化型カスパーゼ 3 の発現量を評価したところ、通常酸素細胞では LW6 投与で活性化型カスパーゼ 3 発現に変化は認めなかった (1.00 ± 0.031 vs. 1.15 ± 0.024 , $P > 0.05$) が、低酸素細胞では LW6 投与により発現が有意に増強した (1.00 ± 0.024 vs. 1.40 ± 0.048 , $P < 0.01$)。

細胞周期解析では、低酸素曝露により G1 アレストが生じたが、LW6 投与による細胞周期の変化は認めなかった。

最近、LW6 がミトコンドリアの好気性代謝に関与する主な酵素である malate dehydrogenase 2 (MDH2) を標的として作用することが報告された (Angew Chem Int Ed Engl 2013)。ミトコンドリアの酸素消費には ROS 産生が直接関与するため、ミトコンドリア由来の ROS 産生量を経時的に測定し、LW6 の影響を評価した。通常酸素環境と比較して、低酸素環境で ROS 産生は増強し低酸素曝露後 24 時間時点まで高いレベルを維持した。LW6 は通常酸素下でも ROS 産生を増加させたが、その作用は低酸素下でより顕著となり、24 時間曝露した時点においても非常に高いレベルで推移した。次にミトコンドリア膜電位を測定すると、低酸素細胞に LW6 を投与した場合、ミトコンドリア膜電位の低下した細胞が有意に増加した。通常酸素細胞では LW6 投与によるこのような変化は認められず、LW6 の作用が低酸素依存性であることが示唆された。

今回我々は、LW6 が低酸素細胞選択的に腫瘍細胞へアポトーシスを誘導することを明らかにした。低酸素下では HIF-1 α の蓄積により細胞の低酸素応答が生じるため、HIF-1 α を抑制することで腫瘍細胞のアポトーシスやネクローシスを誘導することができると考えられ、我々の実験はこれと矛盾しない結果となった。

また、低酸素環境はミトコンドリア内膜の透過性を亢進させ、これがシトクロム c の放出へとつながる。ミトコンドリア膜における電子伝達系の阻害はアポトーシスを誘導することが明らかとなっており、今回、LW6 は MDH2 を抑制することで間接的に電子伝達系を阻害し、アポトーシスが誘導されたと考えられる。さらに、LW6 を投与した低酸素細胞では、ミトコンドリアの機能障害により細胞内 ROS 産生が増加し、アポトーシスへとつながるミトコンドリア膜電位の低下を促し

たと考えられた。

LW6 は HIF-1 α の蓄積を阻害し、低酸素細胞のミトコンドリア膜電位の脱分極を介してアポトーシスを誘導することが明らかとなった。LW6 は、特に腫瘍組織中の低酸素細胞を標的としたがん治療への新たな戦略のひとつとなる可能性を有する。

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 1 件)

Mariko S, Katsumi H, Ikuo K, Masahiko A, Hideo K, Yoshiomi H, Hiroyoshi A, Yuichiro N, Yoshihiro T. LW6, a HIF-1 inhibitor, selectively induces apoptosis in hypoxic cells through depolarization of mitochondria in A549 human lung cancer cells. Molecular Medicine Reports に掲載予定(時期未定)。

[学会発表](計 4 件)

1. 佐藤まり子 他. HIF-1 α 阻害剤である LW6 は低酸素腫瘍細胞のアポトーシスを誘導する. 第 11 回がんハイポキシア研究会, 2013.
2. Mariko S. et al. How Can We Overcome Hypoxia- and Radiation-Induced EMT? - Contribution of Blockade on HIF-1 and JNK Phosphorylation With LW6. ASTRO 56th Annual Meeting, 2014.
3. 佐藤まり子 他. HIF-1 阻害剤 LW6 による低酸素誘導性 EMT 抑制作用機序の解明. 第 12 回がんハイポキシア研究会, 2014.
4. 佐藤まり子 他. 照射誘導性 EMT をいかに抑制するか? - LW6 による HIF-1 阻害/JNK リン酸化阻害作用の寄与. 日本放射線腫瘍学会 第 27 回学術大会, 2014.

[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]

ホームページ等
なし

6 . 研究組織

(1)研究代表者

佐藤 まり子 (SATO, Mariko)
弘前大学・医学部附属病院・助教
研究者番号：30645263

(2)研究分担者

なし

(3)連携研究者

なし