

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 6 月 10 日現在

機関番号：24601

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2013～2016

課題番号：25861967

研究課題名(和文) 口腔がんにおける硼素中性子捕捉療法後の細胞死メカニズムの解明

研究課題名(英文) Elucidation of the cell death mechanism after the boron-neutron capture therapy in oral cancer

研究代表者

山川 延宏 (Yamakawa, Nobuhiro)

奈良県立医科大学・医学部・助教

研究者番号：00526709

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)： 硼素中性子補足療法(BNCT)は、高LET放射線を利用した治療である。本研究はBNCTによる癌細胞の生と死の制御機構を明らかにすることを目的とした。ヒト歯肉扁平上皮癌細胞を用い、低LET放射線の殺細胞効果、アポトーシスの出現頻度を確認した。また、caspase3とPARPの活性が上がることを確認。10%生存率となる低LET放射線ではp53変異型遺伝子を有する癌細胞においては、アポトーシス出現頻度は10%程度であることが確認できた。

研究期間中、京都大学原子炉実験所での研究課題としては採択されていたが、東日本大震災以降は原子炉が稼働していなかったため、低LET放射線による研究のみとなった。

研究成果の概要(英文)： The boron-neutron capture therapy(BNCT) is one of the high LET radiation treatment.As for the high LET radiation, high effect of treatment is obtained regardless of the genotype of the cancer.A purpose of this study is to determine a control structure of the cell death of the cancer cell by BNCT.We used human gingival squamous cell carcinoma cells Ca9-22 for a study. Cellular sensitivities were determined using colony-forming assays. Apoptosis was detected and quantified with Hoechst 33342 staining. The activity of caspase-3 and PARP were analyzed with Western blotting.

During study period, our study was adopted in Kyoto University Research Reactor Institute.A nuclear reactor did not work after Great East Japan Earthquake.Therefore our study is only a study with the low LET radiation.

研究分野：口腔癌

キーワード：BNCT apoptosis p53

1. 研究開始当初の背景

放射線によるがん治療効果は、がん関連遺伝子の遺伝的背景の違いにより大きく異なることが明らかになりつつある。その中でも、p53 遺伝子はアポトーシスや細胞周期の制御に関与し、これが正常に機能するかどうかによって、がん治療後におけるがん細胞の生死を左右するという報告が数多くされている。実際、我々も培養細胞および移植系において、一般的に治療に用いられている低 LET 放射線の X 線では、p53 遺伝子型によって感受性が異なり、p53 遺伝子が欠損している細胞および変異型 p53 遺伝子を持つ細胞では抵抗性を示すことを明らかにし、さらには p53 遺伝子が欠損している細胞に正常型 p53 遺伝子を導入する、もしくは変異型 p53 遺伝子導入細胞に分子シャペロン処理 (グリセロール投与) すると、変異型 p53 タンパク質が正常型 p53 タンパク質を持つ機能に回復し、低 LET 放射線でも高い感受性が得られることを明らかにしてきた。(Asakawa I, Takahashi A, et al. *Anticancer Res.* 22: 2037-2043, 2002; Imai Y, Yamakawa N, Kirita T, et al. *Oral Oncol.* 41: 631-636, 2005)。つまり、このことは低 LET 放射線によるがん細胞死は、p53 遺伝子型に依存していることを明らかにするとともに、p53 変異型や欠損型の細胞を有するがん患者には、低 LET 放射線による治療では十分な治療効果が望めない可能性があることを示唆している。

口腔領域のがんは、比較的表在性が多く、機能温存の面からも放射線療法の意義は大きい。悪性腫瘍の半数とも言われる変異型 p53 の難治性のがんであれば、十分な放射線治療効果が望めないと考えられる。

一方、高 LET 放射線は生物学的効果比 (RBE) が高く、治療効果が高いことが知られている。我々は、放射線医学総合研究所 (千葉県) の重粒子線治療装置 (HIMAC) を利用して、高 LET 重粒子線は p53 遺伝子に関係なくアポトーシスを引き起こし、X 線に比べてがん細胞に高い殺細胞効果をもたらすことを明らかにした (Takahashi A, et al. *Int. J. Hyperthermia*, 19: 145-153, 2003; Takahashi A, et al. *Int. J. Radiat. Biol.*, 60: 591-597, 2004; Takahashi A, et al. *Int. J. Radiat. Biol.*, 81: 581-586, 2005)。さらに、高 LET 重粒子線照射後の p53 非依存的アポトーシスの経路は、Caspase-8 よりも Caspase-9 を経由した Caspase-3 が関与していることを報告してきた (Yamakawa N, Takahashi A, Kirita T, et al. *Cancer Sci.* 99:1455-1460, 2008)。さらに、高 LET 重粒子線による p53 非依存的アポトーシス誘導は、Akt を中心とした生存シグナル系が抑制されることにより、mTOR シグナル系を介した細胞増殖を抑制するとともに、Survivin を抑制し、Caspase-9 の阻害が解除され、アポトーシスが亢進することを報告してきた

(Nakagawa Y, Yamakawa N, et al. *Biochem Biophys Res Commun.* 423:654-60, 2012)。

BNCT は悪性脳腫瘍、頭頸部腫瘍をはじめとして難治性の癌を対象とし、癌細胞を選択的に破壊する有力な粒子線治療になると期待されていた。

2. 研究の目的

硼素中性子捕捉療法 (BNCT) は、X 線などの低 LET 放射線に比べて殺細胞効果が高く、がん細胞の遺伝子型に関係なく高い治療効果が得られると期待されている高 LET 放射線治療である。

我々は、低 LET 放射線では p53 の機能を失った細胞は抵抗性であるが、高 LET 重粒子線では p53 遺伝子型に関係なくアポトーシスを引き起こすことを報告し、さらにその経路とメカニズムを解明してきた。

そこで、本研究では BNCT による生と死の制御機構を明らかにすることを目的とし、p53 の異常ながん細胞をもつ多くの患者さんの治療効果の向上を目指すこととした。

難治がんは未だ有効な治療法は確立されておらず、その治療法の開発と確立は社会的に強く望まれている。BNCT は重粒子線治療と同様に遺伝的背景にあまり影響を受けずに、細胞死をもたらすことから、難治がんにおいて治療効果の向上が期待される。しかしながら、BNCT は承認されたがん治療としては確立されておらず、臨床研究の段階であり、多くのがん患者さんがこの装置の恩恵を受けることは困難であった。そこで、本研究の遂行により、BNCT による p53 の異常な癌細胞の生と死のシグナルの制御機構を明らかにすることができれば、これらの鍵になる遺伝子の転写、翻訳、翻訳後修飾を調節することで、高 LET 放射線治療以外の治療法に活用できることが期待でき、他の治療法の治療効果の向上につながることで、さらに高 LET 放射線治療に匹敵する効率の良い治療法の開発が期待でき、多くの患者さんの治療効果の向上につながることを可能と考えられた。

3. 研究の方法

・使用細胞:

変異型 p53 (codon 248 [Arg (CGG) Trp (TGG)]) 保有ヒト歯肉扁平上皮がん細胞 (Ca9-22)。

・BNCT

：薬剤処理

中性子照射前、37 °C で 2 時間、培地に 10B 濃度 25 ppm のホウ素化合物 (BPA) を添加し、培養。

：照射方法

エッペンドルフチューブに細胞を 25ppm の培地中に懸濁して重水レール装置によって中性子線照射を行う。照射は京都大原子炉実験所の照射装置を使用する。

・BNCT 後と低 LET 放射線照射後の生存率を指標に、生物学的効果比 (RBE) を算出する。
生存率はコロニー形成法にて解析する。

・BNCT 後と低 LET 放射線照射後のアポトーシスの出現頻度を明らかにする。
10%生存率相当の BNCT、および同線量の低 LET 放射線、10%生存率相当の低 LET 放射線を照射。照射後 48 時間で細胞を採取し、Hoechst33342 染色を用いてアポトーシス出現頻度を観察する。

・BNCT により活性化されるミトコンドリア /Caspase-9 アポトーシス経路に關与する因子を同定し、BNCT によるアポトーシスの経路を明らかにする。
BNCT 後、経時的にサンプルを回収し、タンパク質を抽出する。SDS-PAGE ECL Western blot 法にて Nur77, Bad, Bid, Bax, Bcl-2 タンパク質等の細胞内蓄積量を解析する。

・BNCT による生存シグナル関連タンパク質の細胞内蓄積量および活性化を解析する。
BNCT 後、経時的にサンプルを回収し、タンパク質を抽出する。SDS-PAGE ECL Western blot 法にて Akt, phospho-Akt (Ser473), mTOR, phospho-mTOR (Ser2448), p70S6K, phospho-p70S6K (Ser240/244), IKK / , phospho-IKK / (Ser176/180), I B, phospho-I B (Ser32/36), NF- B, phospho-NF- B (Ser933) タンパク質の細胞内蓄積量を解析する。

さらに、BNCT および低 LET 放射線照射後、経時的にサンプルを回収し、Akt 活性測定キットおよび mTOR 活性測定キットを用いて解析する。

・BNCT による Akt 生存シグナルの標的の解析を行い、BNCT による生存シグナル経路を明らかにする。
Nur77, Bad, Caspase-9 siRNA によるノックダウンによって、重粒子線誘導アポトーシスが阻害されるのはどれかを調べ、Akt の標的を解析する。siRNA の細胞内への導入は、リポフェタミン法を用い、変異型 p53 保有ヒト歯肉扁平上皮がん細胞 (Ca9-22) に、Nur77, Bad, Caspase-9 siRNA を導入し、重粒子線を照射し、ヘキスト染色にてアポトーシス出現頻度を検討する。

・BNCT によるアポトーシス以外の細胞死 (オートファジー) のメカニズムの解明。
照射後のサンプルを回収し、オートファジー進行に必要とされる LC3 タンパク質の変動を Western blot 法にて確認し、LC3 抗体の蛍光染色により細胞内の LC3 タンパク質局在について確認する。さらに、アクリジンオレンジで染色しフローサイトメトリー法にて染色度合いを確認し、オートファゴソームがライソソームと融解し、オートファゴリソゾーム

ムに成熟しているかどうかを検討する。

4. 研究成果

低 LET 放射線の放射線感受性の確認では 10%生存率になる線量は 7Gy であることが明らかとなった。アポトーシスの出現頻度をヘキスト 33342 染色経口顕微鏡観察法にて確認したところ 10%生存率となる線量 (7Gy) ではアポトーシスの出現頻度は約 10%であり、2Gy では約 2%であったことから、線量が上がるとアポトーシスの出現頻度も上昇していた。また、低 LET 放射線でも caspase3 と PARP の活性が上がることを western blot 法にて確認。また、Caspase3 の活性は放射線の線量が上がるにしたがって上昇することをフローサイトメトリー法にて確認した。

低 LET 放射線では p53 変異型の遺伝子を有する癌細胞においては、10%生存率となる線量では、約 10%のアポトーシスによる細胞死を誘導することが示唆され、線量依存的にアポトーシスの誘導量は上昇することが示唆された。

また、研究期間中、京都大学原子炉実験所での研究課題としては採択されていたが、東日本大震災以降は原子炉が稼働していなかったため、低 LET 放射線による研究のみとなった。

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 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)

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

山川 延宏 (YAMAKAWA, Nobuhiro)

奈良県立医科大学・医学部・助教

研究者番号: 00526709

研究者番号:
526709

(2) 研究分担者

()

研究者番号:

(3) 連携研究者

()

研究者番号:

(4) 研究協力者

()