

**科学研究費助成事業 研究成果報告書**

平成 29 年 5 月 9 日現在

機関番号：12601

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2014～2016

課題番号：26462005

研究課題名(和文) CPT-11によるHIF-1 の抑制 - 大腸癌放射線療法に対する増感作用の解明

研究課題名(英文) SN-38 as a radio-sensitizer for colorectal cancer by suppressing radiation-induced HIF-1a overexpression

研究代表者

川合 一茂 (Kawai, Kazushige)

東京大学・医学部附属病院・講師

研究者番号：80571942

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,200,000円

研究成果の概要(和文)：HIF-1 は虚血などの低酸素環境により誘導されるKey moleculeであり、種々の経路を通じ細胞や組織を保護することが知られる。大腸癌に対しては放射線療法が広く行われているが、我々はこの放射線照射が大腸癌細胞にHIF-1 を発現し、放射線照射に対する抵抗性の原因となっていることを見いだした。また臨床で大腸癌に対して広く用いられているSN-38 (CPT-11) がこの放射線により誘導されたHIF-1 の発現を抑制し、強い放射線感受性増強効果を有することを見いだした。

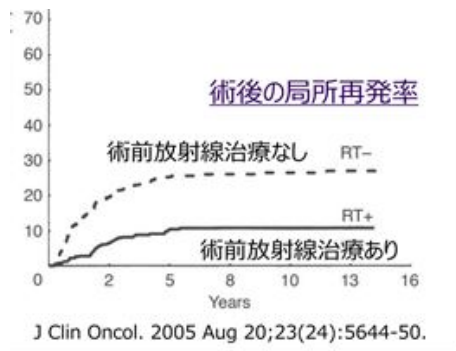
研究成果の概要(英文)：HIF-1a is the key molecule induced by hypoxia. It activates various pathways protecting cell and tissue from hypoxic stress. Radiotherapy is one of the standard therapy for colorectal cancer, and we found that radiation induced HIF-1a in colorectal cancer cells. We also found that SN-38, which is widely used as an anti-cancer drug for colorectal cancer, effectively suppressed HIF-1a induced by radiation. SN-38 was demonstrated to be a promising radio-sensitizer for colorectal cancer.

研究分野：腫瘍外科

キーワード：放射線療法 SN-38 HIF-1

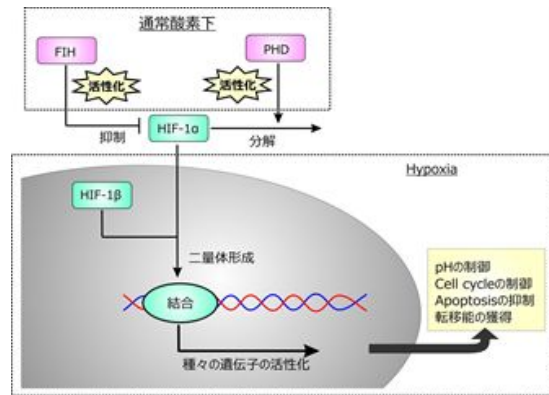
1. 研究開始当初の背景

直腸癌に対する術前化学放射線療法(CRT)  
 下部直腸癌に対する CRT は側方リンパ節への転移を制御し局所再発率の低下に寄与することが知られ、欧米では標準治療となっている(下図)。本邦では CRT の代わりに側方リンパ節郭清を行う施設が多いが、側方リンパ節郭清は CRT と比べ、術後の排尿障害などの神経合併症の頻度が高い。そこで当科では 1985 年より直腸癌に対する術前放射線療法を取り入れ、さらに 2003 年からは放射線療法にテガフル・ウラシルとロイコボリンを併用する CRT を行いこれまで良好な成績を報告してきた(Int J Colorectal Dis. 2011 Jan;26(1):45-51)。また 2011 年からはさらなる治療成績の向上のため、テガフル・ウラシル・ロイコボリンに加え CPT-11 を点滴静注するレジメを臨床試験として開始した。従来のレジメでは治療効果 grade2/3(癌の 2/3 以上が壊死・消失)の割合が 39.2%であったが、CPT-11 を加えたレジメでこれまで 20 症例の治療を行い、grade2/3 が 50.0%と治療成績の大幅な向上が得られている。



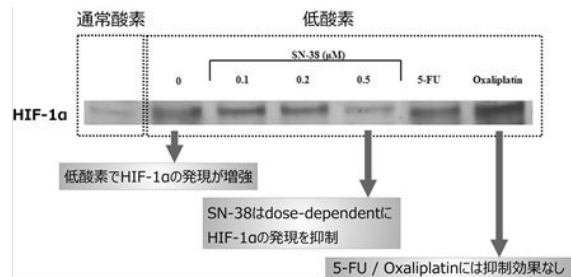
(2) 癌と Hypoxia Induced Factor (HIF)-1

固形癌では腫瘍径の増大に伴い血管新生の誘導が追いつかず、腫瘍内部の酸素分圧が低下する。このいわゆる hypoxia と呼ばれる環境では腫瘍細胞の放射線治療や抗癌剤に対する感受性が大きく低下することが知られている。Hypoxia は癌細胞に種々の表面抗原発現や形質の変化を誘導するが、これらの治療抵抗性においては HIF-1 蛋白が中心的な役割を担っていると考えられている。HIF-1 は通常酸素環境ではすみやかに分解されるが、低酸素環境では分解されず HIF-1 と二量体を形成する。これが核にて遺伝子の promoter 領域に結合し、転写因子として 200 以上の遺伝子の活性化を誘導し、その結果 Cell cycle の制御や apoptosis の抑制など低酸素下での癌細胞の生存に有利な変化が起きるとされる。近年我々はこの hypoxia による HIF-1 の発現が癌細胞に Epithelial-mesenchymal transition (EMT)を引き起こし、integrin などの接着因子や CXCR4 などの遊走に関わる因子を増強、癌細胞の転移能を高めることを報告した(J Surg Res. 2012 Aug 31.)。



(3) HIF-1 と CPT-11

CPT-11 は投与されると速やかに SN-38 に代謝され抗腫瘍効果を発揮する。我々は Hypoxia における癌の抗癌剤耐性のメカニズムを解明するため、大腸癌に対する代表的な抗癌剤である 5-FU、Oxaliplatin、及び SN-38 の作用が hypoxia によりどう影響を受けるかを検討した。その結果 5-FU・Oxaliplatin の抗腫瘍効果は従来の報告通り hypoxia において大きく減弱したが、SN-38 は hypoxia の影響をほとんど受けなかった。さらにそのメカニズムとして下図の如く hypoxia により誘導された HIF-1 を SN-38 が抑制することを解明し報告した (Anticancer Res. 2012 Mar;32(3):865-72.)。この SN-38 による HIF-1 の抑制は、抗腫瘍効果を期待して使用される濃度よりもはるかに低い濃度で発揮されることが特徴的である。



(4) 放射線照射と HIF-1

さらに近年ではいくつかの固形腫瘍において、放射線照射が HIF-1 の発現を増加させることが報告されている。具体的には乳癌細胞や前立腺癌細胞、子宮頸癌細胞や肺小細胞癌細胞における報告がある。しかしこれまで、大腸癌細胞における放射線照射と HIF-1 の発現についての関係は明らかになっていない。

2. 研究の目的

以上より、直腸癌に対しては、腫瘍内部の低酸素状態や、腫瘍に対する放射線照射 HIF-1 の発現増強 放射線照射への耐性という機序が考えられる。これに対して SN-38 を放射線照射に併用 HIF-1 発現を抑制 放射線療法の効果増強が期待され、前述のように実臨床

において CPT-11 を加えることが CRT の効果を増強することもすでに確認されている。そこで本研究では以下のような検討を行う。

ヒト大腸癌細胞株に放射線を照射し HIF-1 の発現変化や apoptosis・cell cycle を検討し、放射線照射により誘導される放射線抵抗性の獲得の機序を解明する。

この系に低濃度の SN-38 を加え HIF-1 を抑制することで、Cell line が獲得した放射線耐性が拮抗され得るかにつき検討する。

マウス大腸癌細胞株をマウスに皮下移植し、皮下腫瘍モデルを作製する。これに放射線照射を行い、CPT-11 の有無による腫瘍縮小効果の差を検討する。さらに照射後の腫瘍を切除し HIF-1 発現を免疫染色などにて検討する。

臨床の CRT 症例を CPT-11 併用の有無により群分けし、切除検体の HIF-1 の発現を免疫染色などにて検討する。

### 3. 研究の方法

#### ・in vitro での検討

ヒト大腸癌培養細胞株 (HT-29・SW480) を培養する。培養時に放射線を 0~8Gy 単回照射し、同時に SN-38 を 0~4 μM の濃度で添加する。SN-38 を添加することによる放射線の効果への影響を下記の Assay にて検討する。放射線照射より 24 時間後・48 時間後・72 時間後に測定し、経時的な変化についても検討する。

HIF-1 の発現の検討: Flow-cytometry 及び Western Blotting を用いて発現の変化を検討する。

HIF-1 関連タンパクの検討: HIF-1 により誘導される血管内皮細胞増殖因子 (Vascular Endothelial Growth Factor, VEGF) の変化を Western blotting を用いて検討する

細胞増殖能の検討: calcein assay を用いて検討する。

Apoptosis / Cell viability の検討: AnnexinV-PI の 2 重染色による Flow-cytometry を用いた Apoptosis の検出・trypan blue を用いた検討などを行う。

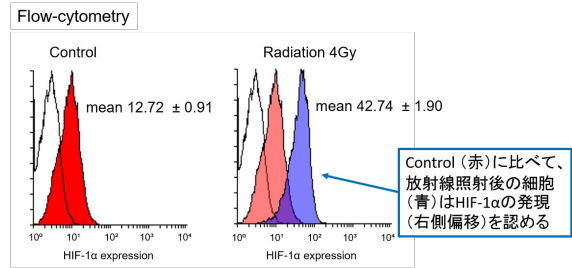
Cell cycle の検討: Cell cycle detection kit による Flow-cytemetry を用いた Cell cycle の変化を検討する。

### 4. 研究成果

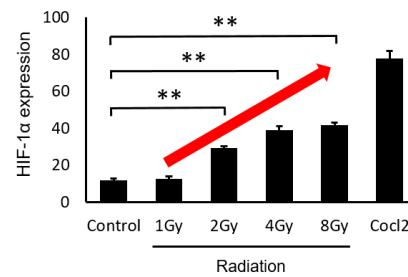
#### ・in vitro での検討

放射線照射による HIF-1 の発現 HT-29・SW480 に対して放射線単回照射 (0~8Gy) を施行し、48 時間後に HIF-1 の発現を flow-cytometry・western blotting にて測定した。Flow-cytometry・western blotting とともに、放射線照射が大腸癌細胞内の HIF-1 の発現量を増加させた。放射線照射により増強した HIF-1

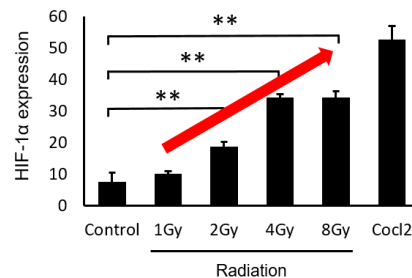
の発現は線量依存性であり、2Gy から増加し 4Gy でピークとなった(下図、赤矢印)。



#### HT29



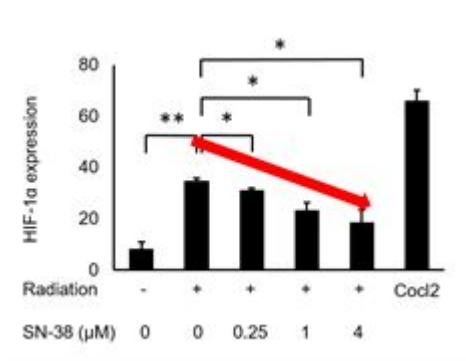
#### SW480



さらに照射後の時間経過について検討を行った。4Gyの放射線照射後 12 時間から HIF-1 の発現増加を認め、24 48 時間で発現量はピークとなった。その後 HIF-1 の発現は減少し、放射線照射の 72 時間後以降は元のレベルとほぼ同等に戻った。

#### 放射線照射により発現した HIF-1 の SN-38 による抑制

大腸癌細胞株 HT-29 及び SW480 に対し放射線照射 (4Gy) を行うと同時に SN-38 (0~4 μM) を投与し、48 時間後に HIF-1 の発現量を flow-cytometry・western blotting にて測定した。下図 (赤矢印) の通り、SN-38 は濃度依存性に、放射線照射により増強した HIF-1 の発現を抑制した。また、5-FU, oxaliplatin も放射線照射と同時に投与し同様の検討を行ったが、これらの抗がん剤では HIF-1 の発現は抑制されなかった。



### SN-38 による放射線照射の効果の増強

放射線照射(4Gy)の後 SN-38(1 μM)の存在下に大腸癌細胞株を 48 時間培養、その後細胞数を calcein assay にて測定比較した。放射線照射単独では No treatment の群と細胞数に差を認めないが、SN-38 と併用することにより細胞数が大きく減少した。SN-38 の併用により放射線照射の効果が増強されたものと考えられた。

本研究により、大腸癌細胞においても、放射線照射により HIF-1 が発現することが初めて証明された。さらに SN-38 が発現した HIF-1 を抑制することで放射線照射の効果を増強し、放射線増感剤として作用することを in vitro で初めて証明した研究である。

CPT-11 は直腸癌化学放射線療法の有望なレジメンとして、世界中で臨床研究が行われているが、それを基礎レベルにて支持する初めての研究成果である。

### 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)

Kazushige Kawai, SN-38 as a radio-sensitizer for colorectal cancer by suppressing radiation-induced HIF-1 overexpression, 5th Japan-Korea Colorectal Summit, April 8, 2017, The University of Tokyo (Tokyo, Japan)

(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 件)

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

の  
(その他)  
ホームページ等

### 6. 研究組織

#### (1)研究代表者

川合 一茂(KAWAI, Kazushige)  
東京大学・医学部附属病院・講師  
研究者番号:80571942

#### (2)研究分担者

石原 聡一郎(ISHIHARA Soichiro)  
東京大学・医学部附属病院・講師  
研究者番号: 00376443

山口 博紀 (YAMAGUCHI Hironori)  
東京大学・医学部附属病院・客員研究員  
研究者番号: 20376445

津野 寛和 (TSUNO Hirokazu)  
東京大学・医学部附属病院・客員研究員  
研究者番号: 50282637

須並 英二 (SUNAMI Eiji)  
東京大学・医学部附属病院・登録研究員  
研究者番号: 70345205

渡邊 聡明 (WATANABE Toshiaki)  
東京大学・医学部附属病院・教授  
研究者番号: 80210920

#### (3)連携研究者

なし

#### (4)研究協力者

なし