

**科学研究費助成事業 研究成果報告書**

平成 28 年 10 月 24 日現在

機関番号：81603

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2014～2015

課題番号：26860967

研究課題名(和文)放射線治療増感を実現する癌幹細胞標的薬剤輸送システムの開発

研究課題名(英文) Investigation of cancer stem cell-targeting drug delivery system for achieving radiosensitization of cancer

研究代表者

廣瀬 勝己(Hirose, Katsumi)

一般財団法人脳神経疾患研究所・その他部局等・その他

研究者番号：60623767

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,900,000円

研究成果の概要(和文)：癌の放射線抵抗性はCD133細胞表面分子を高発現する癌幹細胞というサブグループの存在と深く関わる。本研究では、放射線増感のための戦略として、癌幹細胞標的薬剤輸送系および癌幹細胞特性を元にした増感方法について検討した。まず癌幹細胞標的薬剤輸送システム候補として放射線可溶型マイクロカプセルを精製した。癌幹細胞標的輸送を可能とする表面抗体付加カプセルの精製を試みたが十分な精製条件は見いだせなかった。一方CD133陽性細胞分画は低酸素環境によって有意に増加し、低酸素下におけるX線照射でさらなる誘導を生じた。この照射の誘導効果は1回大線量照射においては抑制され、線量依存性を有することが明らかとなった。

研究成果の概要(英文)：Radioresistance in human cancer has been linked in part to a subset of cells termed cancer stem cells (CSCs). The prominin 1 (CD133) cell surface protein is proposed to be a marker enriching for CSCs. In this study, we could not find the condition of production of microcapsule with cancer stem cell-specific antibody on outer lumen. On the other hand, the proportion of CD133 positive cells increased by incubation under hypoxia. For synergistic effect, X-irradiation combined with hypoxia enhanced the induction of CD133 positive fraction. In contrast, treatment with larger fraction dose revealed no additional effect on induction of CD133 positive fraction. This study suggests that the synergistic effect of X-irradiation on modulation of hypoxia-induced CD133+ population depends on the irradiated dose. Radiotherapy with an appropriate large fraction dose such as stereotactic radiotherapy has the possibility of maximized suppressive effect on CSCs induced by cancer treatment itself.

研究分野：放射線生物学

キーワード：癌幹細胞 CD133 低酸素 放射線増感 マイクロカプセル 定位放射線治療

## 1. 研究開始当初の背景

増大した腫瘍組織では腫瘍血管から離れたペナンプラ領域で低酸素状態に陥っている。腫瘍細胞は、低酸素細胞内に発現する Hypoxia-inducible factor-1 $\alpha$  (HIF-1 $\alpha$ ) によって、血管新生、細胞増殖、糖代謝に関連する遺伝子発現を変調し、放射線抵抗性を獲得する。近年、種々の固形癌において無制限に自己複製を繰り返しながら癌構成細胞を供給する癌幹細胞の存在が同定されており、化学療法や放射線療法後のごく微小な癌幹細胞の残存が遅発性再発や転移を誘発し患者の生存率に強く影響することが明らかとなってきた(Cancer Res. 71; 5346-56, 2011)。そして、この癌幹細胞の幹細胞能の維持・獲得には高発現の HIF-1 $\alpha$ が必要とされることが明らかとなってきた(Br. J. Cancer. 102(5);789-95, 2010)。我々の研究グループは、放射線照射が照射後に残存した腫瘍細胞内の HIF-1 $\alpha$ 発現を増強させ、再酸素化後もその発現レベルが長時間に亘り維持されていること、さらに低酸素では相乗的に著明に発現が増強するという、極めて重要な研究成果を得ている。つまり放射線照射後に残存した治療抵抗性の低酸素細胞集団では、照射がトリガーとなり幹細胞能の獲得・維持や、癌幹細胞から新たな癌構成細胞の増殖編成を加速しうる。したがって、放射線照射と同時にもしくはその直後に癌幹細胞能を抑制する薬剤を併用することが今後の放射線治療のストラテジーの1つとなると考えられる。近年癌幹細胞能の阻害に働く HIF-1 $\alpha$ 阻害剤や、癌幹細胞を選択的にアポトーシスに誘導する薬剤が実験レベルで報告されつつある(Sci. Rep. 2; 362, 2012)。生体において癌幹細胞にこれらの薬剤を高濃度で投与することができれば、放射線治療成績を劇的に改善させることができる。そのためには、薬剤を癌幹細胞特異的に限局化して作用させる手法などなんらかの方策が必要である。

## 2. 研究の目的

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。無制限に癌構成細胞を供給する癌幹細胞は低酸素および放射線照射後に産生蓄積された Hypoxia-inducible factor-1 $\alpha$  (HIF-1 $\alpha$ ) を介して幹細胞能を維持・獲得し、さらに新たな癌構成細胞の増殖編成を加速することで再発・転移を促進させている。そこで本研究では、2段階の抗原抗体反応により効果を増幅する放射線可溶型マイクロカプセルを利用し、これまで実現できなかった高濃度で HIF-1 $\alpha$ 阻害薬を生体内の癌幹細胞に特異的に導入することを可能にし、癌幹細胞を制御することによって、放射線治療効果の向上を狙うことを目的とした。さらにこれに限らず癌幹細胞の環境誘導・治療による誘導特性を明らかにし、これをもとに癌幹細胞を制御す

る方法を検討することを目的とした。

## 3. 研究の方法

### 1. マイクロカプセルの精製

1) 放射線可溶型カプセルの精製;  
高重合度のヒアルロン酸ナトリウム 0.1%を添加した 0.2%アルギン酸ナトリウム溶液をマイクロアトマイザーを用いて 1-3  $\mu\text{m}$  の微粒子として噴霧し、0.3 M 塩化カルシウム溶液中を通過させた。通過後に生成した大小不均一な放射線可溶型カプセルをマイクロフィルターを用いて均一の径に精製した。カプセル表面に抗体を露出させる場合は、塩化カルシウム溶液中に抗体を添加し、マイクロカプセルを精製した。

### II. 癌幹細胞の同定

#### 1) SP 細胞分画の同定;

培養したヒト非小細胞肺癌細胞株 A549 を用い、まず通常酸素下において、10%FBS および Penicillin/streptomycin 添加した DMEM 2 mL を培地として培養細胞を 35 mm dish に播種し、37  $^{\circ}\text{C}$ 、5%  $\text{CO}_2$  の条件下で培養した。細胞が定着後に X 線 10 Gy を照射した。48 時間培養後に細胞を 0.1%トリプシンで回収し PBS で 2 回洗った後に Hoechst33342 を終濃度 5 ng/mL で添加した 2%FBS を添加した HBSS で 90 分間インキュベートした。このとき SP 分画の細胞は Hoechst33342 色素を ABC ファミリーのポンプによって細胞外へ排出するので、これを阻害するベラパミルを終濃度 50  $\mu\text{M}$  で添加した HBSS で 90 分間インキュベートしたものをコントロールとして用意した。その後 2 回洗いを加えたあと、HBSS に再懸濁し死細胞除去のために PI を終濃度 2  $\mu\text{g}/\text{mL}$  で添加した。10 分後にフローサイトメトリー Beckman coulter Cell Lab Quanta SC $^{\circ}$  を用いて解析した。UV による励起光の波長は 355 nm、Ar レーザーによる励起光の波長は 488 nm とし、PI で染色された細胞は 670 nm のフィルターで検出され、これを Gate から除去した後に、465 nm および 575 nm の波長域のシグナルを展開して SP 細胞分画を検出した。

#### 2) CD133 陽性細胞分画の同定;

培養したヒト非小細胞肺癌細胞株 A549 を用い、まず通常酸素下において、10%FBS および Penicillin/streptomycin 添加した DMEM 2 mL を培地として培養細胞を 35mm dish に播種し、37  $^{\circ}\text{C}$ 、5%  $\text{CO}_2$  の条件下で培養した。48 時間培養後に細胞を 0.1%トリプシンで回収し PBS で 2 回洗った後に FITC 結合抗 CD133 抗体 (biorbyt) を終濃度 10  $\mu\text{g}/\text{mL}$  で添加した 2%FBS を添加した HBSS で 30 分間インキュベートした。その後 2 回洗いを加えたあと、HBSS に再懸濁し死細胞除去のために 7-AAD を終濃度 2  $\mu\text{g}/\text{mL}$  で添加した。10 分後にフローサイトメトリー Beckman coulter Cell Lab Quanta SC $^{\circ}$  を用いて解析

した。励起光の波長は 488 nm とし、CD133-FITC のシグナルは 525 nm で、7-AAD のシグナルは 670 nm の波長域で検出され、これらを展開して CD133 陽性かつ生細胞の分画を同定し、その存在比を計測した。

### 3) 低酸素状態による CD133 陽性細胞分画の誘導；

同条件で定着させた A549 細胞を 1% 低酸素条件下で 48 時間もしくは 96 時間まで培養した。1% 低酸素条件は、低酸素チャンバーを用いて、95%N<sub>2</sub> / 5%CO<sub>2</sub> の混合ガスを一定時間通気後に低酸素モニターを用いて、チャンバー内が 1±0.05% となることを確認した。低酸素培養後に細胞を回収し、上記と同様にして CD133-FITC および 7-AAD で細胞を染色後にフローサイトメトリーで解析した。

### 4) 低酸素による CD133 陽性細胞分画の誘導に対する X 線照射の影響；

同条件で定着させた A549 細胞を 1% 低酸素条件下で 48 時間培養した。低酸素の条件を維持したまま、X 線 5 Gy または 10 Gy を照射後、そのままさらに 48 時間 1% 低酸素条件下で培養した。低酸素培養後に細胞を回収し、上記と同様にして CD133-FITC および 7-AAD で細胞を染色後にフローサイトメトリーで解析した。

## 4. 研究成果

### I. マイクロカプセルの精製

#### 1) 放射線可溶型カプセルの精製；

高重合度のヒアルロン酸ナトリウムを添加したアルギン酸ナトリウム溶液をマイクロアトマイザーで塩化カルシウム水溶液中に噴霧し、マイクロカプセルが精製された。これをメッシュフィルターに通し一定サイズのマイクロカプセルに精製した。次に、抗体を包含したマイクロカプセルの精製条件を検討した。抗体包含マイクロカプセルの抗体の局在をカプセル表面に制御することは困難であり、十分な抗体価を有するカプセルの精製条件は見出されなかった。

### II. 癌幹細胞の同定

#### 1) SP 細胞分画の同定；

培養したヒト非小細胞肺癌細胞株 A549 を用い、まず通常酸素下において、X 線 10 Gy 照射された細胞および非照射の細胞いずれにおいても、465 nm および 575 nm の波長域のシグナルを展開した際にこれまでに報告されているような適正な SP 細胞分画として同定できる分画は認められなかった。PI による蛍光の漏れ込みなどが原因として除外できなかったため、PI 染色を省いた状態で検討したが、それでも Hoechst33342 のシグナルを適正に展開できる条件は決定されなかった。

#### 2) CD133 陽性細胞分画の同定；

定常状態の CD133 細胞分画の同定を行った。CD133 陽性かつ生細胞の分画を同定し、その存在比を計測した。A549 における CD133 陽性細胞分画は定常状態で 0.36 ± 0.21% であった。

### 3) 低酸素状態による CD133 陽性細胞分画の誘導；

同条件で定着させた A549 細胞を 1% 低酸素条件下で 48 時間もしくは 96 時間まで培養した。低酸素培養後に細胞を回収し、CD133 細胞分画の同定を行った。CD133 陽性かつ生細胞の分画を同定し、その存在比を計測した。A549 における CD133 陽性細胞分画は 48 h 後には 0.76 ± 0.11%、96 h 後には 3.08 ± 0.86% まで誘導が増強されることが明らかとなった。

### 4) 低酸素による CD133 陽性細胞分画の誘導に対する X 線照射の影響；

同条件で定着させた A549 細胞を 1% 低酸素条件下で 48 時間培養した。低酸素の条件を維持したまま、X 線 5 Gy または 10 Gy を照射後、そのままさらに 48 時間 1% 低酸素条件下で培養した。低酸素培養後に細胞を回収し、CD133 細胞分画の同定を行った。CD133 陽性かつ生細胞の分画を同定し、その存在比を計測した。A549 における CD133 陽性細胞分画は 48 h で X 線 5 Gy 照射された際は 4.90 ± 0.29% と誘導が増強されたにもかかわらず、X 線 10 Gy 照射された際は 4.90 ± 0.57% と誘導に有意な変化は認められなかった。

### 結論)

本研究において当初の癌幹細胞を標的とする抗体特異的マイクロカプセルを精製する計画であったが、十分な精製条件を見出すことはできなかった。しかし一方で、一定よりも大きな 1 回線量を使用する定位照射や IMRT の手法を応用するなどして可能となる SIB と呼ばれる線量増加手法こそが簡易かつ容易な癌幹細胞誘導制御につながり、放射線治療抵抗性を改善する方法であることを示唆する重要な知見を得ることができた。今後、この知見を元にさらなる癌幹細胞の誘導制御機構に対する評価を進め、実臨床での使用に耐えうるデータの集積を行い、現場で応用可能なレベルで検討をすすめる予定である。本研究の成果は放射線治療成績の改善に直接寄与するものであり、非常に大きな社会的意義を有すると考えられる。

### 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)

Hirose K, Sato M, Aoki M, Kawaguchi H,

Akimoto H, Hatayama Y, Takai Y. How can we overcome radiation induced recruitment of cancer stem cells under chronic hypoxia: contribution of fraction dose size as a key factor. International Journal of Radiation Oncology\*Biology\*Physics. 査読有, 93(3):E526. 2015, doi: 10.1016/j.ijrobp. 2015.07.1919.

〔学会発表〕(計1件)

Hirose K, Sato M, Aoki M, Kawaguchi H, Akimoto H, Hatayama Y, Takai Y. How can we overcome radiation induced recruitment of cancer stem cells under chronic hypoxia: contribution of fraction dose size as a key factor. 57<sup>th</sup> ASTRO annual meeting

〔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

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

廣瀬 勝己 (HIROSE, Katsumi)

一般財団法人 脳神経疾患研究所

南東北 BNCT 研究センター・診療所長

研究者番号: 60623767

### (2) 研究分担者

なし

### (3) 連携研究者

なし

### (4) 研究協力者

高井 良尋 (TAKAI, Yoshihiro)

一般財団法人 脳神経疾患研究所

南東北 BNCT 研究センター・センター長

佐藤 まり子 (SATO, Mariko)

弘前大学大学院医学研究科・助教