

平成 30 年 6 月 7 日現在

機関番号：14301

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2015～2017

課題番号：15K15454

研究課題名(和文)放射線と併用し増感作用を呈する薬剤の検討とその微小環境への影響の検証

研究課題名(英文) Assessment of the relationship of the radiation sensitizing agents and tumor microenvironments

研究代表者

吉村 通央 (Yoshimura, Michio)

京都大学・医学研究科・講師

研究者番号：40597936

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,800,000円

研究成果の概要(和文)：膵癌においてヘッジホッグ阻害が、SHHの精製タンパク質による細胞増殖を濃度依存的に部分的に抑制していることを確認し、SHHタンパク質が、線維芽細胞の増殖をソニックヘッジホッグ経路依存的に促進していることが示唆された。RAS/RAF/MEK/ERK経路は、様々な癌腫において過剰発現しており、MEK阻害剤は抗がん作用をもつ新規分子標的薬として注目されている薬剤の一つである。今回、対象として膵癌由来の細胞に注目し、膵癌細胞MIA PACA-2に対し、放射線照射にMEK阻害を行うことにより、放射線照射単独と比して、細胞の生存はさらに抑制されることが示唆された。

研究成果の概要(英文)：Hypoxic and stroma-rich microenvironments, characteristic features of pancreatic cancers, are associated with a poor prognosis. We found that pancreatic cancer cells secreted more Sonic hedgehog protein (SHH) under hypoxia. The SHH protein secreted from pancreatic cancer cells under hypoxic conditions promoted the growth of fibroblasts by stimulating their Sonic hedgehog signaling pathway. These results suggest that the increased SHH is potentially responsible for the formation of stroma-rich microenvironments in pancreatic cancers, therefore providing a rational basis to target it. RAS/RAF/MEK/ERK pathway is overexpressed in a variety of cancer, and targeting this pathway is considered to be one of the most promising anticancer agents. We found that MEK inhibition showed radiosensitizing effect on a pancreatic cancer cell, MIA PACA-2. MEK inhibition could be a target of radiosensitizing anticancer agents.

研究分野：Radiation Oncology

キーワード：radiation sensitizer tumor microenvironment

### 1. 研究開始当初の背景

放射線治療は、現在の癌治療において必要不可欠な治療の選択肢の一つである。近年放射線治療は、放射線治療単独治療ではなく、化学療法と併用することが多くなっている。さらに分子標的薬との併用も、抗癌剤併用と比して同等の効果もしくは高い効果を保ちながら、副作用低減させることが報告されるようになっており、Bio-radiotherapy として期待が高まっている。一例としては、セツキシマブと放射線治療の併用療法は放射線治療単独と比べ、局所進行頭頸部癌の患者の生存期間を延長することが分かっている<sup>1,2</sup>。従来使用されてきた抗癌剤と比して、腎障害、神経障害などの副作用の低減が図れるため、保険適応となった 2013 年以降日本でも使用されるようになってきている。しかし、現在のところ放射線治療と増感作用のある分子標的薬として認可されているものはセツキシマブのみであり、近年次々と開発されている分子標的薬の放射線増感作用については検証されていないものも多く、これらの放射線増感作用を検証することは今後の癌治療にとって非常に重要な鍵となると思われる。

### 2. 研究の目的

本研究の目的は、放射線と併用することにより放射線増感作用を呈するような分子標的薬のスクリーニング、ならびにその機能や抗腫瘍効果のメカニズム解析をすることである。また各種分子イメージング技術を使い、その分子標的薬が細胞内の微小環境にもたらす効果について検証し、放射線にどのようなタイミングでその薬剤を追加することが最大限の抗腫瘍効果を示すかどうかについても解析することができる。将来的にはこれらの実験によって得られた結果により、今後の高精度放射線治療を組み合わせた分子標的薬併用放射線治療のターゲットを時空間的に最適化することも目的の一つである。

### 3. 研究の方法

本申請の研究は、“分子標的薬の放射線増感作用”と“分子標的併用放射線治療後の微小環境の局在変化”について解明するものである。まず、培養腫瘍細胞を用いた *in vitro* の実験で、分子標的薬が放射線増感作用をもつかどうか、またその最適な濃度、タイミングを検証する。またその分子標的薬の、培養正常細胞への影響も検討し、将来臨床の場で応用した際の正常組織への有害事象も予測する。また、分子標的薬ならびに放射線を加えた際の腫瘍細胞内における低酸素、細胞周期、DNA 損傷、血管新生の状態を検証する。その後、担癌マウスを使った *in vivo* の実験で、分子標的併用放射線治療の腫瘍縮小効果を検証する。

当研究において、特に重点的に検証する分子標的経路として、ヘッジホッグ経路と

RAS/RAF/MEK/ERK 経路に注目した。低酸素細胞は放射線の感受性が低いことは一般的に知られている。膵癌など間質が豊富な癌組織の発生には、ヘッジホッグ経路が関わっている事が報告されており、この経路を阻害し、間質の密度を下げる事ができれば、血流が改善し、腫瘍内の低酸素細胞の割合を低減することができ、放射線増感作用が得られるのではないかと考えている。

また、RAS/RAF/MEK/ERK 経路は、BRAF, RAS mutation を含む様々な癌腫において過剰発現しており、同経路は放射線増感効果の報告もあり、がん治療において、注目されている経路の一つであり、検討を行うこととした。

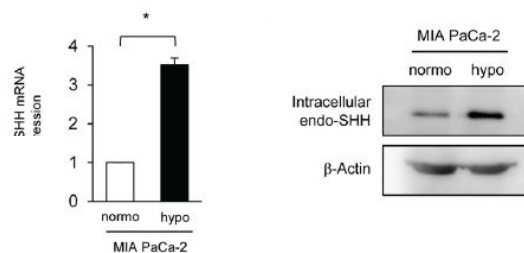
### 4. 研究成果

共同研究チームと協議し、放射線と相乗効果を持つ標的とする経路として、ヘッジホッグ経路、MEK 経路について着目した。

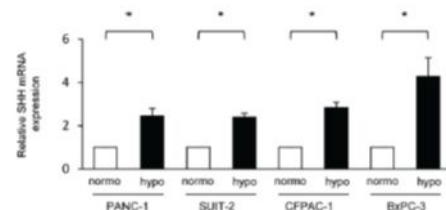
#### ヘッジホッグ阻害剤

がんの間質繊維芽細胞の増殖をソニックヘッジホッグ経路が促進することが最近注目されている。膵臓癌は、化学放射線治療に抵抗性の難治性の癌であり、がん間質繊維芽細胞に富むことが注目されている。豊富な間質繊維芽細胞は放射線抵抗性に関わることが分かっている。そこで、膵臓癌においてヘッジホッグ経路が間質豊富な微小環境にどのような影響を与えるのかについて明らかにすることを目的とした。

まずは、低酸素環境下で SHH の分泌量が増加するメカニズムに、SHH の細胞内の発現量の上昇が寄与するか否かを調べた。最初に、膵臓がん細胞内の SHH の発現量を qRT-PCR 法とウェスタンブロット法を用いて評価した。低酸素環境下で mRNA レベルとたんぱく質レベルで SHH の発現量が増加していることが示された。

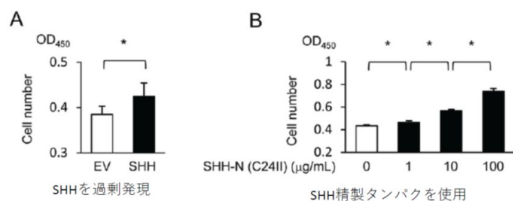


また、MIA PaCa-2 以外の他の膵臓がん細胞株でも同様の結果を得た。

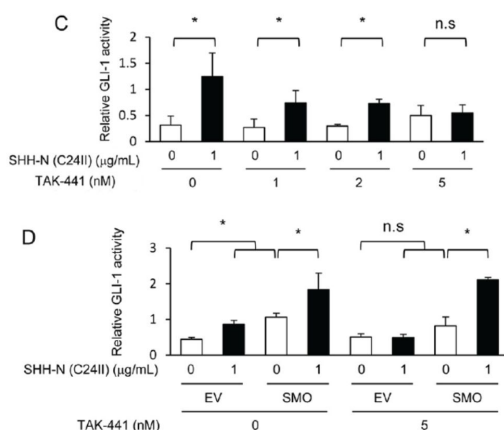


以上の結果から、低酸素環境下で SHH の発現量の増加が SHH の分泌量の増加の一因となることが示唆された。

また、ソニックヘッジホッグ経路の活性化が線維芽細胞の増殖に与える影響を調べた。膵臓がん細胞には SHH を過剰発現させた後に、膵臓がん細胞の培養液を回収し、線維芽細胞にその培養液を投与し、細胞増殖アッセイで評価した結果、膵臓がん細胞が分泌する SHH タンパクにより線維芽細胞の増殖が促進されていることが確認された (図 A)。また、SHH の精製タンパク質を用いた実験でも、濃度依存的に線維芽細胞の増殖を促進していることが示された (図 B)。



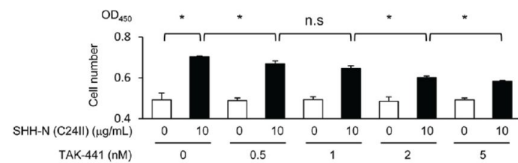
次に、ソニックヘッジホッグ経路依存的に細胞増殖が起きるかどうかを調べるために、Smo の特異的な阻害剤として知られている TAK-441 を使用した。Smo は、ソニックヘッジホッグ経路を構成する因子で、SHH が受容体に結合すると、Smo の抑制が解除され、ソニックヘッジホッグ経路の活性が促進される。その阻害の活性を調べるために、SHH の精製タンパク質と TAK-441 を用いてルシフェラーゼアッセイを行ったところ、TAK-441 は、ソニックヘッジホッグ経路の活性を濃度依存的に阻害していることがわかった (図 C)。また、Smo を過剰発現することにより、その阻害をキャンセルできることも示すことができた。以上の結果より、TAK-441 は Smo 特異的なソニックヘッジホッグ経路の阻害剤であることを確認できた (図 D)。



次にこの TAK-441 を用いて、細胞増殖がソニックヘッジホッグ経路を介するかどうかを評価し、SHH の精製タンパク質による細胞増殖を、TAK-441 が濃度依存的に部分的に抑制していることが確認できた。

以上の結果から、SHH タンパク質が、線維芽細胞の増殖を、ソニックヘッジホッグ経路

依存的に促進していることを示すことができた。



このように、SHH 経路を阻害することによって、線維芽細胞の増殖を抑制し、間質の密度を下げることであれば、血流が改善を促し、腫瘍内の低酸素細胞の割合を低減することができ、放射線治療の効果を高めることができる可能性が示唆される。

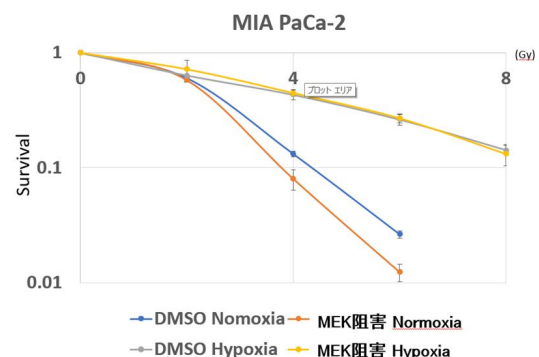
今後は、今回は in vitro でしか検証できなかった実験を in vitro で行い、この仮説を実証し、最終的には臨床の現場で応用可能な分子標的の候補として提案できるようにしたい。

### MEK 阻害剤

RAS/RAF/MEK/ERK 経路は、BRAF, RAS mutation を含む様々な癌腫において過剰発現しており、MEK 阻害剤は抗がん作用をもつ新規分子標的薬として注目されている薬剤の一つである。臨床上放射線治療と併用する可能性がある種々癌腫由来の cell line における MEK 発現について data base, 各種論文などから検討し、実験に使用するいくつかの候補を抽出した。

まずは Clonogenic assay として適する細胞種かどうかを判別するために、plating efficiency を測定し、極度に plating efficiency が低い細胞腫は除外し、今回、対象として膵癌由来の細胞に注目した。膵癌細胞 MIA PACA-2 に対し、放射線照射に MEK 阻害剤 A を加えることにより、放射線照射単独と比して、細胞の生存はさらに抑制されることが分かった。しかしながら、低酸素下の条件においては、放射線照射に MEK 経路を阻害することで、放射線の増感効果を呈しなくなった。現在このような現象が起こった原因について検討中である。

また、その他、MAPK 関連遺伝子に mutation のある細胞株 H441, MDA-MB-231, SK-MEL-28, HCT116+/+, HCT116-/-, A549 において、増感効果は見られなかった。



以上より、MEK 阻害剤を放射線治療と組み合わせることで、放射線増感効果を呈する可能性が示唆されたが、どのような条件下、微小環境下において最大限の効果が得られるのか、今後の検討課題である。

#### <引用文献>

1. Bonner JA, Harari PM, Giralt J, et al. Radiotherapy plus cetuximab for squamous-cell carcinoma of the head and neck. *N Engl J Med* 2006;354:567-78.
2. Bonner JA, Harari PM, Giralt J, et al. Radiotherapy plus cetuximab for locoregionally advanced head and neck cancer: 5-year survival data from a phase 3 randomised trial, and relation between cetuximab-induced rash and survival. *Lancet Oncol* 2010;11:21-8.

#### 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)

HIF-1 maintains a functional relationship between pancreatic cancer cells and stromal fibroblasts by upregulating expression and secretion of Sonic hedgehog. Katagiri T, Kobayashi M, Yoshimura M, Morinibu A, Itasaka S, Hiraoka M, Harada H. *Oncotarget*.9:10525-35 2018.  
<https://doi.org/10.18632/oncotarget.24156>

PLK1 blockade enhances therapeutic effects of radiation by inducing cell cycle arrest at the mitotic phase. Inoue M, Yoshimura M, Kobayashi M, Morinibu A, Itasaka S, Hiraoka M, Harada H. *Scientific reports*.5:15666 2015.  
<http://doi.org/10.1038/srep15666>

#### 〔学会発表〕(計 5 件)

PLK1 blockade enhances therapeutic effect of radiation by inducing cell cycle arrest at mitotic phase  
Michio YOSHIMURA<sup>1</sup>, Minoru INOUE<sup>1,2</sup>, Minoru KOBAYASHI<sup>1,2</sup>, Satoshi ITASAKA<sup>1</sup>, Hiroshi HARADA<sup>1,2,3</sup>, Masahiro HIRAOKA, 15th International Congress of Radiation Research, ICRR 2015, 2015/5/25-29, Kyoto

「HIF-1 は Sonic Hedgehog の分泌を亢進し、間質細胞豊富な膵臓がん微小環境を形成す

る」

片桐幸大, 平岡真寛, 原田浩, ポスター、第 13 回がんとハイポキシア研究会, 2015/6/5-6、静岡県三島市谷田 1111、国立遺伝学研究所

「HIF-1-mediated Secretion of SHH Functions in the Formation of Stroma-rich Microenvironment of Pancreatic Cancers」  
Tomohiro Katagiri, Hiroshi Harada, Michio Yoshimura, Minoru Kobayashi, Masahiro Hiraoka, 口演、The 74th Annual Meeting of the Japanese Cancer Association, 2015/10/8-10  
愛知県名古屋市熱田区熱田西町 1-1、名古屋国際会議場

「HIF-1-mediated Secretion of SHH Functions in the Formation of Stroma-rich Microenvironment of Pancreatic Cancers」  
片桐幸大, 原田浩, 吉村通央, 平岡真寛、口演、第 28 回日本放射線腫瘍学会, 2015/11/19-21、ベイシア文化ホール(群馬県前橋市日吉町 1-10-1)・前橋商工会議所会館(群馬県前橋市日吉町 1-8-1)

「HIF-1 modulates a functional relationship between pancreatic cancer cells and stromal fibroblasts by upregulating expression and secretion of Sonic hedgehog」  
Tomohiro Katagiri, Minoru Kobayashi, Michio Yoshimura, Akiyo Morinibu, Satoshi Itasaka, Masahiro Hiraoka, Hiroshi Harada, 口演  
第 20 回 菅原・大西記念 癌治療増感シンポジウム、2018/2/3-4、奈良県文化会館(奈良県奈良市登大路町 6-2)

#### 〔図書〕(計 0 件)

なし

#### 〔産業財産権〕

出願状況(計 0 件)

なし

取得状況(計 0 件)

なし

〔その他〕  
ホームページ等

#### 6. 研究組織

(1)研究代表者

吉村 通央 (YOSHIMURA, Michio)  
京都大学大学院医学研究科 放射線腫瘍

学・画像応用治療学・講師  
研究者番号：40597936

(2)研究分担者  
なし

(3)連携研究者  
なし

(4)研究協力者  
なし