

令和 2 年 6 月 6 日現在

機関番号：32620

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2016～2019

課題番号：16K10402

研究課題名(和文)低酸素環境下のがん幹細胞をターゲットとした放射線増感研究

研究課題名(英文) Radiosensitization of cancer stem-like cells that thrive under hypoxic conditions

研究代表者

笹井 啓資 (Sasai, Keisuke)

順天堂大学・医学部・教授

研究者番号：20225858

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,600,000円

研究成果の概要(和文)：腫瘍幹細胞は腫瘍内低酸素環境に存在し、放射線抵抗性である。本研究では低酸素細胞に対する放射線感受性を増強する薬剤の検討を行った。本研究で潰瘍性大腸炎治療薬サルファラジンSSZの低酸素増感効果が明らかになり、そのメカニズムは細胞内還元型グルタチオンの濃度低下によることを明らかにした。ヒートショックタンパクHsp90阻害剤17-DMAGが、HeLa および HT1080細胞で高い低酸素放射線増感効果を示した。低酸素抵抗性の原因の一つであるHIF-1をHsp90阻害することで抑制できたことが原因と考えられた。以上SSZおよび17-DMAGの低酸素細胞増感作用を明らかにした。

研究成果の学術的意義や社会的意義

腫瘍内の存在するがん幹細胞は治療抵抗性であり、がん治療後の再発原因と考えられている。とくに、がん幹細胞は低酸素ニッチェに存在するため、放射線感受性が低いと考えられる。本研究では、この放射線抵抗性を克服することを目的とした。

がん幹細胞に発現するCD44vにより安定化することで細胞内のGSH濃度を増加させる×CTを潰瘍性大腸炎に長らく使用されてきたサルファサラジンが抑制することに注目して、本薬剤の低酸素細胞増感効果を明らかにした。サルファサラジンはこれまで臨床経験のある薬剤であり、臨床研究へつなげられる成果である。

研究成果の概要(英文)：Cancer stem-like cells are found in tumor niches and thrive under hypoxia. Hypoxic cells are radioresistant. This study tested the hypoxic cell radiosensitizing effects of sulfasalazine (SSZ) and 17-DMAG using a colony-formation assay and investigated their effects on protein expression, the cell cycle, and intracellular glutathione (GSH) concentrations. One mM SSZ significantly enhanced the radiosensitivity of hypoxic U251 MG and HSC-2 cells, but not normoxic cells. The treatment decreased intracellular GSH under both normoxia and hypoxia.

Treatment with 100 nM 17-DMAG for 24 h had weak or no radiosensitizing effects under normoxia, but significantly enhanced the radiosensitivity of both cell lines under hypoxia. 17-DMAG did not influence the cell cycle, but significantly increased the expression of Hsp70, a marker of Hsp90 inhibition, and inhibited the expression of HIF-1.

SSZ and 17-DMAG are potential radiosensitizers, although the detailed mechanism requires further study.

研究分野：放射線科学

キーワード：放射線増感 低酸素細胞 がん幹細胞 ヒートショックプロテイン

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

腫瘍内に特異的に存在する低酸素細胞は放射線に抵抗性で、常酸素状態の細胞と比較して同一の効果を得るために約3倍の放射線を照射する必要がある。このため、低酸素細胞が放射線治療後の再発要因と考えられ、この克服が重要な課題となっている。

通常の放射線治療に用いるX線、電子線は低LETであり、放射線が直接DNAを障害するのではなく、水分子を電離、励起しOHラジカルなどのイオン、ラジカル類に変換する。このラジカルとDNAの反応により生成されるDNAラジカルがDNA障害の主体であることが知られている。DNAラジカルはさらに酸素と結合することでDNA障害が固定されると考えられている。この過程で還元型グルタチオン(GSH)と酸素が競合的に作用し、酸素が多ければDNA障害へ、GSHが多ければDNAラジカルは安定したDNAに還元される。

腫瘍内にはがん幹細胞とよばれる自己増殖能と腫瘍原性の高い細胞が含まれている。がん幹細胞が存在するがん幹細胞ニッチは低酸素環境であることが種々の研究から明らかになっている。がん幹細胞にはCD44、CD133など種々の特異的タンパクが発現することが知られ、CD44は細胞増殖、浸潤、転移に関与している。CD44にはバリエーション(CD44v)が多く存在する。CD44vは細胞膜表面においてシスチントランスポーターxCTと結合して安定化させることで細胞外シスチンの取り込みを増加させることが明らかにされている。取り込まれたシスチンは、GSHの原材料となる。古くから潰瘍性大腸炎の治療薬として使用されてきたSulfasalazine (SSZ)はxCTに直接作用しその機能を抑制し、細胞内のGSH合成を抑制することが明らかにされている。

先に述べたように、放射線治療に用いる低LET放射線では酸素とGSHが競合的に作用することが知られている。従来GSHを減少させるために用いられたD, L-buthionine-S,R-sulfoximine (BSO)やdiethyl maleate (DEM)は毒性が強く、その後の十分な研究はなされなかった。がん幹細胞が低酸素環境に存在することにより、がん幹細胞が本質的に放射線治療抵抗性であることに加えて低酸素環境そのものが放射線治療の抵抗性を増強することとなっていると考えられる。がん幹細胞においてSSZによりGSHを抑制することで放射線増感が得られることが期待できる。

2. 研究の目的

本研究では低酸素環境に存在するがん幹細胞への放射線作用を増強することを主目的とし以下の研究を行う。

- 1 CD44v発現するがん幹細胞様を用いて、低酸素環境におけるSulfasalazine放射線増感作用の程度と、その分子メカニズムを明らかにする。
- 2 Hsp90阻害剤を用いて低酸素環境におけるがん幹細胞様細胞に対する増感効果を明らかにする

3. 研究の方法

使用した細胞はHT1080(ヒト線維肉腫; American Type Culture Collection ATCCより購入)、HSC-2(ヒト扁平上皮癌; Japanese Collection of Research Bioresources Cell Bank JCRBCBより購入)、U251MG(ヒト膠芽腫; JCRBCB)、およびHeLa(ヒト子宮癌; ATCC)をした。HSC-2はCD44vを、U251MGはCD44vを発現してはいないがxCTを発現していることが報告されている。実験は対数増殖期で行った。SSZ(東京化成工業)はDMSOに溶解し100mMで冷凍保存し、実験直前に溶解して用いた。2-Mercaptoethanol(2-ME 東京化成工業)は蒸留水で希釈した。Hsp90阻害剤である17-[2-(dimethylamino)ethyl]amino-17-desmethoxygeldanamycin(17-DMAG; LKT Laboratories)はDMSOに溶解して冷凍保存した。

放射線照射は医療用のリニアック4MV X線を用いた。低酸素状態はAnaeroPack-Anaero system(三菱ガス化学)を用いて4時間暴露して作成した。酸素濃度は0.1%である。細胞生存率はコロニー形成法で求めた。それぞれのタンパク発現はウエスタンブロット法を用いた。細胞内GSHはGSH-Glo Glutathione Assay kit(Promega社)を用いて求めた。細胞周期はFACSscan flow cytometerで求めた。

4. 研究成果

1 SSZによる低酸素細胞放射線増感効果

1mM SSZ 24時間暴露ではU251MG細胞増殖を遅延させたが、細胞生存率には影響しなかった。低酸素細胞増感を示したが、常酸素細胞への放射線増感効果は認めなかった。薬剤暴露時間4時間および24時間では増感効果に差異はなかった。SSZ 1mM SSZ 24時間暴露により低酸素HSC-2細胞でも著明な放射線増感効果が認められたが(図1)、HT1080細胞では増感効果は認められなかった。

次に2-MEによるSSZによる低酸素細胞増感効果の抑制効果を求めた。0.3mM 2-ME 24時

間暴露単独では常酸素および低酸素 U251MG 細胞へは効果はなかった。しかし、SSZ との併用で SSZ の低酸素細胞増感効果を抑制した。2-ME は SH 供給物質であるとともに、xCT を介さない経路 (leucine transporter) で cystine の取り込みを増加させる効果がある。1mM SSZ および 0.3mM 2-ME の U251 MG 細胞内 GSH 濃度への効果について求めた。1mM SSZ 24 時間処理で有意に常酸素および低酸素細胞内 GSH が低下したが、同時に 0.3mM 2-ME 処理により常酸素細胞では完全に、低酸素細胞では部分的に SSZ による GSH の低下が解消された。

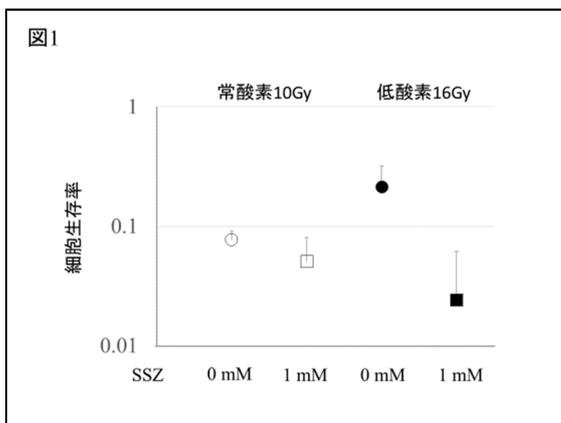
U251 MG 細胞の細胞周期への影響を見ると 4 時間低酸素処理で放射線抵抗性 S 期細胞が増加し、1mM SSZ によりこの S 期細胞の増加が抑制された。

以上より SSZ は xCT を発現している低酸素細胞へ特異的に放射線増感効果を示し、これは細胞内 GSH の低下および細胞周期への影響が原因と考えられた。

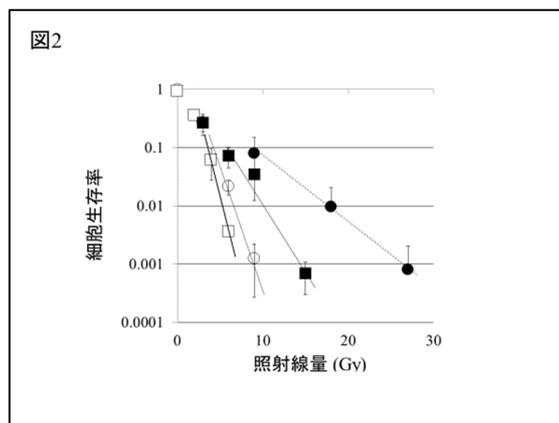
腫瘍幹細胞様細胞は CD44v を発現することが多く、また CD44v を発現しない神経膠芽腫細胞では EGFR を介して xCT が安定化していることが報告されている。これらの細胞は腫瘍内低酸素ニッチェに存在することが知られている。SSZ は xCT を特異的に抑制することで、これらの細胞に対して低酸素細胞放射線増感効果が期待できる。SSZ の放射線増感作用についての報告はあるが、主に常酸素細胞に関するものである。細胞内の GSH を低下させるという作用機序からも、本研究で明らかにしたように低酸素細胞にたいする効果がより期待できる。

SSZ はこれまでシスプラチンなどとの併用効果に関して臨床研究が行われてきたが、残念ながら有意な成績は達成できていない。抗がん剤としての薬剤動態に関するデータも報告されているが、単独投与では 12g/日までの投与可能であったと報告されている。抗炎症剤として長期投与される薬剤であり、安全性も担保されていることから低酸素放射線増感剤として新たな役割が期待できる。

HSC-2 に対する SSZ 1 mM の増感効果



HeLa に対する 17-DMAG 100nM の増感効果



常酸素 0mM SSZ	常酸素 1mM SSZ	常酸素 0nM DMAG	常酸素 100nM DMAG
低酸素 0mM SSZ	低酸素 1mM SSZ	低酸素 0nM DMAG	低酸素 100nM DMAG

2 Hsp90 阻害剤 17-DMAG の低酸素細胞放射線増感効果

HeLa 細胞では 50–400 nM 17-DMAG 24 時間暴露で僅かに細胞生存率が低下した。100 nM 17-DMAG 24 時間暴露により著明な低酸素細胞放射線増感効果を認めたと、常酸素細胞に対しては僅かな増感効果を認めたのみであった (図 2)。この低酸素細胞増感効果は 100nM 以上では変化なかった。HT1080 細胞に関しても同様の低酸素増感効果を認めたと、HSC-2 細胞に関しては増感効果を認めなかった。100 nM 17-DMAG 24 時間暴露で HT108 細胞では Hsp90 抑制の指標である Hsp70 の発現が増加し、HIF-1α の発現が有意に抑制された。この効果に関しては酸素濃度の影響はなかった。一方、低酸素細胞増感効果のなかった HSC-2 細胞では、100 nM 17-DMAG 24 時間暴露で HIF-1α の発現が増加した。100 nM 17-DMAG 24 時間暴露の細胞周期への影響は認めなかった。

以上より 17-DMAG の放射線増感効果は Hsp90 を阻害することで、HIF-1α の発現が抑制されることに由来すると考えられた。ただし、この効果は細胞毎に異なり、増感効果を示さない細胞も存在することが明らかになった。

Hsp90 は分子シャペロンとして種々の役割を担っている。特にがん細胞内では細胞周期、DNA 修復、アポトーシスの抑制など治療抵抗性に関与している。これまで Hsp90 阻害剤の放射線増感効果に関しては報告があるが、低酸素細胞放射線増感に関してはほとんど研究がなされていない。低酸素刺激により Hsp90 の活性が増加する可能性があり、17-DMAG による Hsp90 阻害効果により低酸素細胞で放射線増感効果が顕著であった可能性が示唆される。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計4件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 2件）

1. 発表者名 水野利恵 笹井啓資
2. 発表標題 潰瘍性大腸炎治療薬Sulfasalazineによる低酸素細胞放射線増感効果
3. 学会等名 第21回癌治療増感研究シンポジウム
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Keisuke Sasai, Rie Mizuno
2. 発表標題 Hypoxic radiosensitizing activity of Sulfasalazine, an inflammatory bowel disease medicine
3. 学会等名 61st Annual Meeting, the American Society for Radiation Oncology (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Rie Mizuno, Mayumi Nakashiro, Keisuke Sasai
2. 発表標題 Hypoxic radiosensitization by DMAG, an Hsp90 inhibitor
3. 学会等名 59th Annual Meeting of the American Society for Radiation Oncology (国際学会)
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 水野利恵 笹井啓資
2. 発表標題 低酸素細胞放射線増感に関する試み
3. 学会等名 第20回 菅原・大西記念 癌治療増感研究シンポジウム in 奈良
4. 発表年 2018年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
研究 分担者	田部 陽子 (Tabe Yoko) (70306968)	順天堂大学・医学(系)研究科(研究院)・特任教授 (32620)	
研究 協力者	水野 利恵 (Mizuno Rie)		