

令和 3 年 5 月 18 日現在

機関番号：12301

研究種目：基盤研究(C)（一般）

研究期間：2018～2020

課題番号：18K07665

研究課題名（和文）最小酸素ナノバブルを利用した副作用を伴わない放射線増感効果の誘導を目指して

研究課題名（英文）Regulation of radiation sensitivity using ultrafine nanobubble oxygen

研究代表者

横堀 武彦（Yokobori, Takehiko）

群馬大学・未来先端研究機構・准教授

研究者番号：60420098

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,400,000円

研究成果の概要（和文）：本研究では、さまざまながん細胞株において我々の開発した世界最小レベルの酸素ナノバブル水ががん細胞株のhypoxia inducible factor alpha subunit (HIF1A)発現、放射線抵抗性に与える影響を検討した。さらに、免疫不全マウスに移植した皮下腫瘍 に対して酸素ナノバブル水と放射線照射を併用する意義を検討することとした結果、放射線照射と酸素ナノバブルを併用した群はコントロール群、酸素ナノバブル単独群、放射線照射単独群と比較して有意な腫瘍サイズの縮小が観察された。また本研究で酸素ナノバブルの安全性も検証することができた。

研究成果の学術的意義や社会的意義

放射線治療が癌診療における非常に重要な治療ツールとして認知されているが、抵抗性を示す腫瘍は臨床上問題である。一方で、この治療抵抗性を克服すべき様々な試みがこれまでなされてきたが、多くの場合不十分な治療効果や強い副作用のため、より効果が高く、副作用の少ない放射線増感剤の開発が切望されていた。本研究では世界最小レベルの酸素ナノバブル水が細胞実験、動物実験において有意な増感効果を誘導することを明らかにすることが出来た。今後、この酸素ナノバブル水による増感効果を実臨床で証明することができれば抗がん剤や手術など高侵襲治療に耐えられない高齢者、合併症併存患者にとって大きな希望となることが期待される。

研究成果の概要（英文）：This study investigated the effects of the smallest level of oxygen nanobubble water developed by us against various cancer cell lines. The nanobubble water treatment altered the expression of hypoxia inducible factor alpha subunit (HIF1A) and radiation resistance of cancer cell lines. Furthermore, we evaluated the combined effect of oxygen nanobubble water with irradiation against subcutaneous xenografted tumors in tumor-bearing mice models. As a result, the anti-tumor effect by the combination group was significantly higher than that of the control group, nanobubble alone group, and radiation alone group. In addition, the safety of oxygen nanobubbles water could be verified in this study.

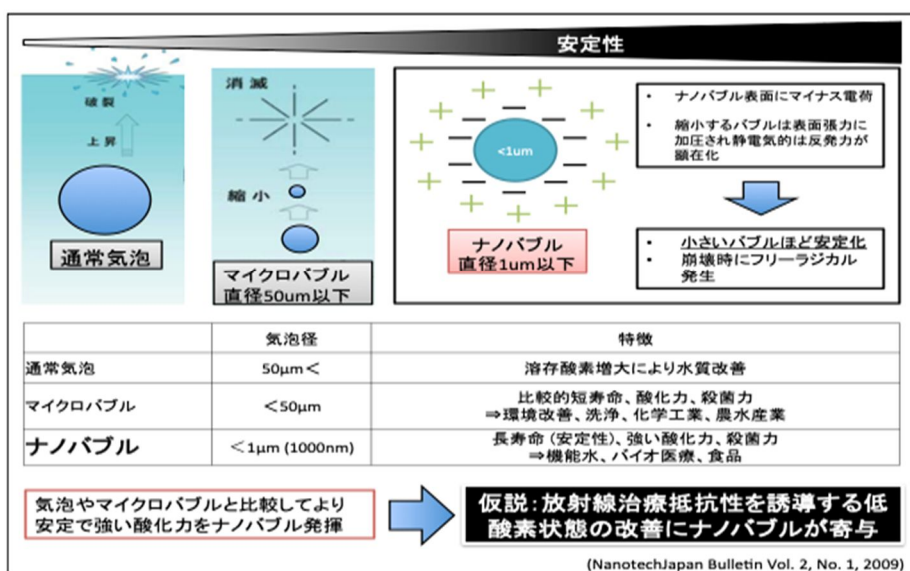
研究分野：癌研究

キーワード：低酸素 酸素ナノバブル 放射線 治療抵抗性

1. 研究開始当初の背景

癌の治療法として手術、化学療法、放射線治療は重要な地位を占めている。これまで放射線治療抵抗性を克服するべく、そのメカニズム解明が進められてきたが、腫瘍が増大し組織内に低酸素領域を持つ腫瘍は Hypoxia Inducible Factor 1 Alpha Subunit (HIF-1) タンパクが蓄積することで放射線抵抗性が誘導されることが明らかとなってきた。しかし、この低酸素誘導性 HIF-1 蓄積を標的とした放射線抵抗性克服の様々な試みがなされているが実臨床への展開はなされていない。そこで本研究では組織内の酸素化改善により低酸素誘導性 HIF-1 蓄積を阻害するために通常の気泡や従来放射線増感効果を誘導するツールとして注目されてきたマイクロバブルよりもさらに安定的で活性の強いナノバブルという 1 μm (1000nm)以下の小型の泡に着目した(図1)。これまでに酸素を内包した酸素ナノバブルを用いて腫瘍細胞の HIF-1 抑制が誘導されることが報告されている(PLoS One. 2016 Dec 30;11(12):e0168088)。これらの知見からわれわれは「放射線治療抵抗性を誘導する低酸素誘導性 HIF-1 蓄積を標的とする治療ツールとして酸素ナノバブルが有効では？」と仮説を立てた。

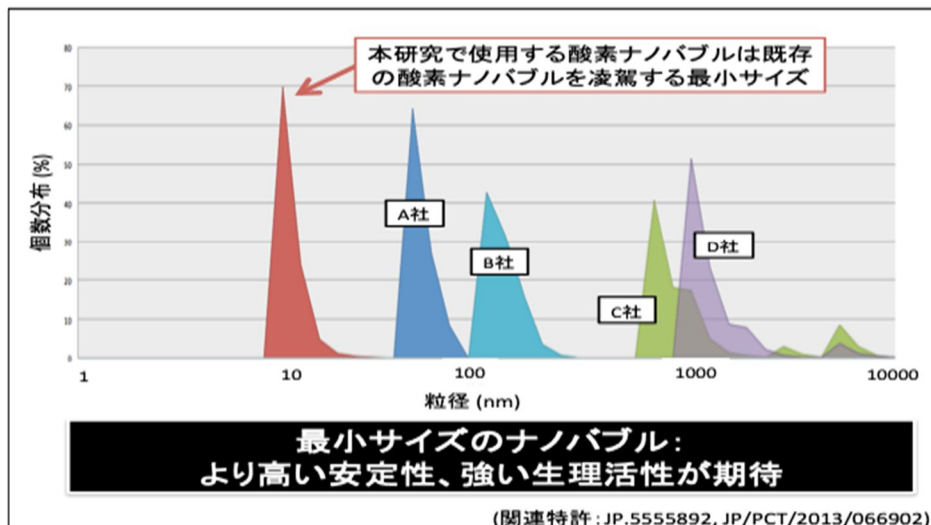
図1. 従来のマイクロバブルとナノバブルの特徴



2. 研究の目的

われわれの使用する酸素ナノバブルはウイスコンシン大学血管外科の山之内大 博士の協力のもと従来報告されてきたナノバブルや現在コマーシャルベースで入手可能な他社のナノバブルを凌駕する世界最小レベルの粒径 (10nm 以下)を持つ酸素ナノバブルを使用することが最大の特徴と言える(図2)。

図2. 本研究で使用する世界最小クラスの酸素ナノバブルと他社の粒径比較



ナノバブルな粒径が小さいほど安定でありこの利点は特に *in vivo* での生体内分布、その生理活

性増強(フリーラジカル発生)の点で非常に大きい利点である。この最小酸素ナノバブルと放射線感受性の関係(意義)を明らかにすることそれ自体が特徴的であり創造性の高いことと考えている。また基本的には微小な泡が混在した単なる水であり正常細胞に与える 2 次的な悪影響は極めて低い事が予想された。このことから本研究では世界最小レベルの酸素ナノバブルを用いることで癌細胞株の低酸素に関連した放射線抵抗性を克服することが可能かを明らかにすることを研究目的とした。

3. 研究の方法

in vitro 解析

1) 癌細胞に対する酸素ナノバブル水を投与し、低酸素関連放射線抵抗性の腫瘍は制御因子である HIF1A 発現に与える酸素ナノバブル水の影響を Western blot 法で評価。

in vivo 解析

1) Balb/c マウスに滅菌水 (n=7)、酸素ナノバブル水 (n=10)を 28 日間自由飲水で与え、体重、外観、顕微鏡的な臓器観察、血液生化学的データ (TP, ALB, BUN, CRE, Na, K, Cl, Ca, IP, AST, ALT, LDH, AMY, T-Chol, TG, HDL-C, T-Bil, GLU)を比較。

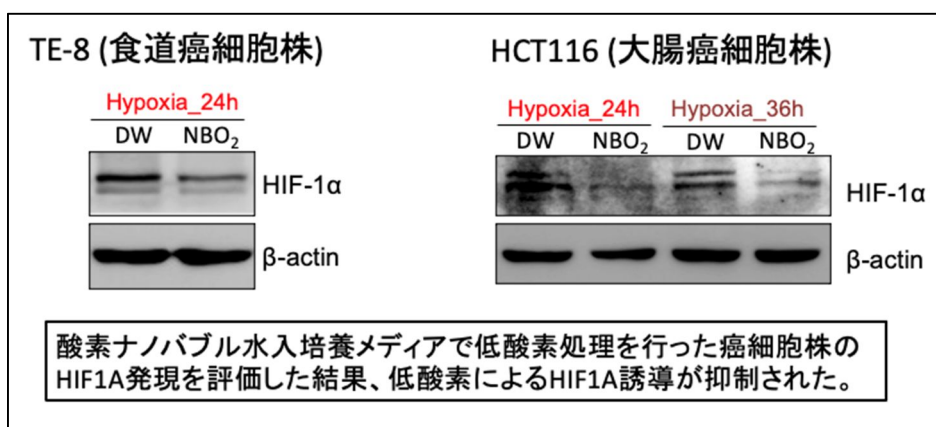
2) EBC1 細胞株を免疫不全マウス (Balb/c ヌードマウス)の皮下に移植し担癌モデルマウスを作成し、滅菌水群、酸素ナノバブル群、滅菌水+放射線照射群、酸素ナノバブル+放射線照射群で腫瘍径の変化を比較。

3) 担癌モデルマウスの治療後腫瘍を回収しタンパク質を抽出、その後 Western blot 法にて HIF1A 発現を評価。

4. 研究成果

in vitro 解析

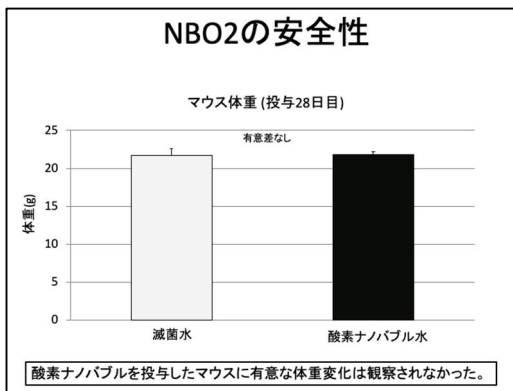
1) 癌細胞に対する酸素ナノバブル水の影響



われわれの先行研究において、すでに肺がん細胞株、乳がん細胞株に対する低酸素による HIF1A 誘導が酸素ナノバブル水により抑制されることは報告している (Yokobori T et al, Int J Oncol. 2018 Mar;52(3):679-686.). 本研究では消化器固形癌細胞株として TE8, HCT116 細胞株を用いて酸素ナノバブル水による HIF1A 抑制効果を検証した。その結果、酸素ナノバブル水により低酸素で誘導された HIF1A 発現は抑制され、先行研究データと同様の酸素ナノバブル水の効果を検証することができた。

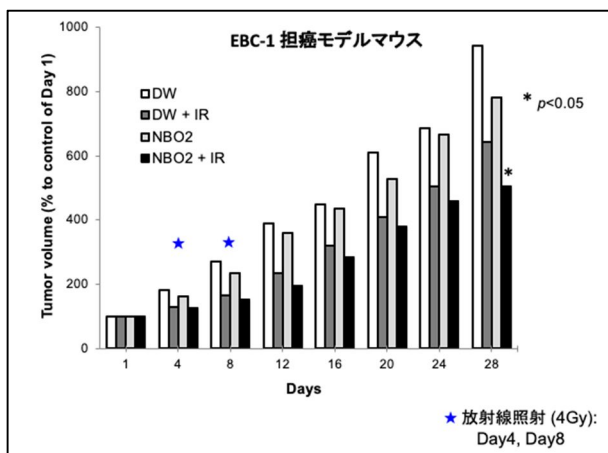
in vivo 解析

1) Balb/c マウスに対する酸素ナノバブル水の安全性試験



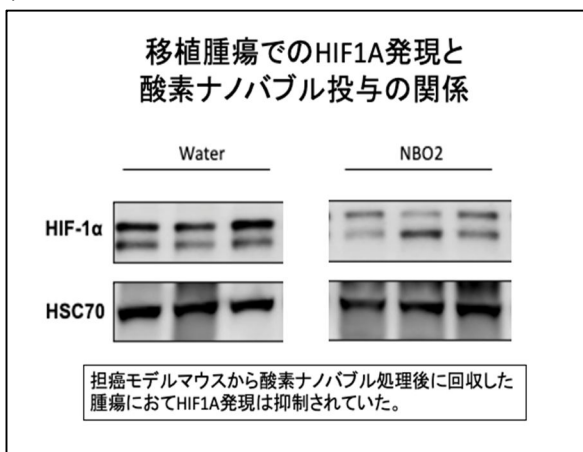
動物実験で安全性を検証した結果、マウスの体重、マウスの外観、臓器の肉眼的検討、病理学的検討において酸素ナノバブル投与が原因と考えられる顕著な差異、異常は認めず、酸素ナノバブル水の有効性、安全性を動物実験レベルで検証することができた (上図)。また、同時に測定した血液生化学的検討でも酸素ナノバブル投与による障害は観察されなかった。

2) 担癌モデルマウスにおける酸素ナノバブルと放射線の併用効果の検証



免疫不全マウスに移植した皮下腫瘍 (肺癌細胞株 EBC1) に対して酸素ナノバブル水と放射線照射を併用する意義を検討することとした。その結果、放射線照射と酸素ナノバブルを併用した群はコントロール群、酸素ナノバブル単独群、放射線照射単独群と比較して有意な腫瘍サイズの縮小が観察された (上図)。

3) 担癌モデルマウスの治療後腫瘍における HIF1A 発現。



治療後に採取された移植腫瘍の HIF1A 蛋白発現解析を Western blot 法で実施した結果、酸素ナノバブル投与により有意に HIF1A 抑制効果が誘導されることを動物実験でも検証することができた (上図)。

今後の計画と展望

EBC1 細胞での動物実験の再現性検証はすでに終了しており、現在、他の癌細胞株での動物実験

データの再現性を検証した上で論文作成を計画している。将来的には本研究で安全性を確認した世界最小レベルの酸素ナノバブル水を使用して臨床がん患者における放射線増感効果の検証を実施できればと考えている。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計5件（うち査読付論文 3件/うち国際共著 1件/うちオープンアクセス 2件）

1. 著者名 Nakazawa Nobuhiro, Yokobori Takehiko, Kaira Kyoichi, Turtoi Andrei, Kuwano Hiroyuki, Saeki Hiroshi, Shirabe Ken et al	4. 巻 27
2. 論文標題 High Stromal TGFBI in Lung Cancer and Intratumoral CD8-Positive T Cells were Associated with Poor Prognosis and Therapeutic Resistance to Immune Checkpoint Inhibitors	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Annals of Surgical Oncology	6. 最初と最後の頁 933 ~ 942
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1245/s10434-019-07878-8	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 該当する
1. 著者名 Togo Maria, Yokobori Takehiko, Shimizu Kimihiro, Handa Tadashi, Kaira Kyoichi, Sano Takaaki, Tsukagoshi Mariko, Higuchi Tetsuya, Yokoo Satoshi, Shirabe Ken, Oyama Tetsunari	4. 巻 2
2. 論文標題 Diagnostic value of 18F-FDG-PET to predict the tumour immune status defined by tumoural PD-L1 and CD8+tumour-infiltrating lymphocytes in oral squamous cell carcinoma	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 British Journal of Cancer	6. 最初と最後の頁 epub
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1038/s41416-020-0820-z	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -
1. 著者名 Yokobori Takehiko, Yazawa Shin, Asao Takayuki, Nakazawa Nobuhiro, Mogi Akira, Sano Rie, Kuwano Hiroyuki, Kaira Kyoichi, Shirabe Ken	4. 巻 9
2. 論文標題 Fucosylated 1-acid glycoprotein as a biomarker to predict prognosis following tumor immunotherapy of patients with lung cancer	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Scientific Reports	6. 最初と最後の頁 14503
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1038/s41598-019-51021-2	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -
1. 著者名 Handa Tadashi, Katayama Ayaka, Yokobori Takehiko, Yamane Arito, Fujii Takaaki, Obayashi Sayaka, Kurozumi Sasagu, Kawabata-Iwakawa Reika, Gombodorj Navchaa, Nishiyama Masahiko, Asao Takayuki, Shirabe Ken, Kuwano Hiroyuki, Oyama Tetsunari	4. 巻 Mar;54(3)
2. 論文標題 Carboxypeptidase A4 accumulation is associated with an aggressive phenotype and poor prognosis in triple-negative breast cancer	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 International Journal of Oncology	6. 最初と最後の頁 833-844
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3892/ijo.2019.4675	査読の有無 無
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Iijima Misaki, Yokobori Takehiko, Mogi Akira, Shimizu Kimihiro, Yajima Toshiki, Kosaka Takayuki, Ohtaki Yoichi, Obayashi Kai, Nakazawa Seshiru, Gombodorj Navchaa, Tsukagoshi Mariko, Shirabe Ken, Kuwano Hiroyuki	4. 巻 Mar
2. 論文標題 Genetic and Immunohistochemical Studies Investigating the Histogenesis of Neuroendocrine and Carcinomatous Components of Combined Neuroendocrine Carcinoma	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Annals of Surgical Oncology	6. 最初と最後の頁 epub
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1245/s10434-019-07268-0	査読の有無 無
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

〔学会発表〕 計2件 (うち招待講演 2件 / うち国際学会 2件)

1. 発表者名 Takehiko Yokobori
2. 発表標題 Single nanometer-sized ultrafine oxygen bubbles improve the hypoxia-induced resistance
3. 学会等名 The 8th International Symposium of Gunma University Initiative for Advanced Research (GIAR) satellite workshop (招待講演) (国際学会)
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 Takehiko Yokobori et al.
2. 発表標題 Development of a novel radiosensitizer against hypoxia-induced radiation resistance.
3. 学会等名 第77回日本癌学会学術総会 シンポジウム18 Radiation oncology in cancer research and treatment (招待講演) (国際学会)
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	緒方 杏一 (Ogata Kyoichi) (10448897)	群馬大学・医学部附属病院・講師 (12301)	

6. 研究組織（つづき）

	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	酒井 真 (Sakai Makoto) (70420099)	群馬大学・医学部附属病院・講師 (12301)	
研究分担者	宗田 真 (Sohda Makoto) (70507326)	群馬大学・医学部附属病院・准教授 (12301)	
研究分担者	桑野 博行 (Kuwano Hiroyuki) (90186560)	群馬大学・大学院医学系研究科・非常勤講師 (12301)	

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関