

令和 3 年 5 月 29 日現在

機関番号：10101

研究種目：挑戦的研究(萌芽)

研究期間：2019～2020

課題番号：19K22586

研究課題名(和文) 老化誘導がん治療を実現する質量分析イメージング診断法の開発

研究課題名(英文) Development of a MS imaging-based diagnosis for novel cancer senotherapy

研究代表者

安井 博宣 (Yasui, Hironobu)

北海道大学・獣医学研究院・准教授

研究者番号：10570228

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,900,000円

研究成果の概要(和文)：無限増殖能を有するがん細胞に対して、永続的に細胞周期を停止させる、すなわち老化させることは有効な治療戦略と考えられる。本研究では細胞老化を標的とした新規治療法を開発しそれを診断できる手法を樹立することを目的とした。まず老化誘導因子として知られるId-1の発現抑制と放射線との併用によって、in vitroおよびin vivoにおいて、ヒト由来がん細胞およびマウス由来がん細胞に効率的に老化を誘導できることを明らかにした。このモデルにおいて質量分析解析が老化誘導の程度を判定することはできなかったが、老化を検出できる手法として18F-FLTのPETイメージングが有効である可能性を明らかにした。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究において得られた成果は、放射線と薬剤により無限増殖能を有するがん細胞に細胞老化を引き起こすことで抗腫瘍効果を高めることができ、これまでになかった治療法の開発に道筋をつけたことである。また細胞老化と深く関連する代謝に着目したイメージング手法によって老化細胞の検出が一部可能となったことは、老化誘導治療の実用化に向けた大きな前進であったと考えられる。

研究成果の概要(英文)： Permanently stopping the cell cycle, that is, senescence, is considered to be an effective therapeutic strategy for cancer cells having infinite proliferation ability. The purpose of this study was to develop a new therapeutic method targeting cellular senescence and to establish a method that can diagnose it. First, it was clarified that senescence can be efficiently induced by the combination with radiation and Id-1 inhibition, which is known as a senescence-inducing factor in human-derived cancer cells and mouse-derived cancer cells both in vitro and in vivo. Although mass spectrometry could not determine the degree of senescence induction in this model, it revealed that 18F-FLT PET imaging may be effective as a method for detecting senescence.

研究分野：放射線腫瘍学

キーワード：細胞老化 放射線 がん治療

### 1. 研究開始当初の背景

無限増殖能を有するがん細胞に対して、永続的に細胞周期を停止させる、すなわち老化させることは非常に魅力的な治療戦略と考えられる。一方で、周囲の間質やがん細胞に対して、老化細胞はがん化や増殖刺激を与えるようなサイトカインや増殖因子を産生・放出するという老化関連分泌現象 (**SASP**) が起こることも分かっており、再発や転移の引き金となる危険性を秘めている。従って、老化誘導をがん治療戦略にするには、事前に対象となるがんの治療感受性や、治療開始後の早期の応答予測を可能にすることが非常に重要になる。しかし、細胞老化誘導を放射線治療効果の根幹となるメカニズムに据えてより効率的な治療戦略を考える上で、老化細胞を可視化し評価できる技術が不可欠であるが、現在までのところ、老化細胞を非侵襲的に可視化でき、かつ臨床応用可能な技術についての報告はほとんどない。

### 2. 研究の目的

細胞は分裂限界に達するか種々のストレスに曝された場合、永続的に細胞周期が停止する細胞老化が誘導される。がん細胞に **X** 線照射を行うと、一部の細胞で **p21** 経路の活性化を介する細胞老化が誘導されることが知られている。そこで、**X** 線と **p21** 経路の活性化を増強する薬剤を併用することでより多くのがん細胞を細胞老化誘導できれば、がん細胞の増殖を抑制できると考え、本研究では、**p21** 経路の活性化を増強する薬剤として、**USP1** 阻害剤である **Pimozide** を用いた。がん細胞では **p21** の働きを抑制する転写調整因子である **Id1** の異常増加が認められ、細胞老化の回避に関与すると考えられている。**Id1** はユビキチン化された場合、ユビキチン-プロテアソーム系により分解されるが、脱ユビキチン化酵素 **USP1** が活性化場合には、**Id1** は脱ユビキチン化され安定化する。**USP1** 阻害剤を用いた場合、ユビキチン化を通して **Id1** の不安定化が起こり、**Id1** 発現量を抑制できる可能性がある。そこで本研究では、**Pimozide** と **X** 線の併用処理を行い、がん細胞の増殖能に与える影響を検討した。

また現在、老化細胞を非侵襲的に可視化する臨床応用可能な技術は存在しない。当初の研究計画では老化イメージング手法として質量分析イメージングを予定していた。しかし、**in vivo** モデルにおいて、放射線と **Id-1** 阻害の併用による老化誘導の程度が低いことから(図 5 参照)、はっきりとした代謝物変化が認められず、より顕著な変化を伴うモデルの作成および分析条件の修正が課題として残った。その代替法として、細胞老化誘導の効果判定を非侵襲的に行う手法を確立することを見据え、陽電子放射断層撮影法 (**PET** イメージング) で用いられるイメージング剤を用いて検討を行った。本研究では、老化細胞が永続的に分裂を停止することから細胞増殖を反映する [**<sup>18</sup>F]**FLT** を選択した。また、細胞老化が誘導されたがん細胞では糖代謝が亢進するという報告があることから、糖代謝能を反映する [**<sup>18</sup>F]**FDG** を用いた検討も行った。****

### 3. 研究の方法

#### **In Vitro**

マウス乳がん細胞 **EMT6** 播種 6 時間後に **Pimozide**(10  $\mu$ M)を添加した。その 24 時間後に **X** 線照射を行った。コロニー形成法による放射線増感効果の検討は **X** 線照射 7 日後に行った。また、老化細胞マーカーとして知られる **SA- $\beta$ -gal** (**Senescence associated- $\beta$ -galactosidase**)染色による細胞老化誘導効果の検討および [**<sup>18</sup>F]**FDG**, [**<sup>18</sup>F]**FLT** 取込能評価は **X** 線照射 48, 72, 96 時間後に行った。****

#### **In Vivo**

**EMT6** 細胞( $1 \times 10^5$  個)を雌性 **BALB/C** マウスに移植した。2 週間後に **Pimozide** (30mg/kg) を 12 時間間隔で 2 回腹腔内投与し、12 時間後に **X** 線照射(10 Gy)を行った。さらに 96 時間後に [**<sup>18</sup>F]**FLT** もしくは [**<sup>18</sup>F]**FDG** を尾静脈投与した後、腫瘍の凍結切片を作成し、**SA- $\beta$ -gal** 染色およびオートラジオグラフィ(**ARG**)による解析を行った。****

### 4. 研究成果

#### 1. **Pimozide** と **X** 線の併用処理による放射線増感効果の検討

まず、**X** 線単独処理と **Pimozide** と **X** 線の併用処理を比較し、がん細胞の増殖能に与える影響を検討した。細胞増殖能を反映する指標であるコロニー形成率を比較した結果、**Pimozide** と **X** 線の併用処理では **X** 線単独処理に比べてコロニー形成率が低下しており(図 1)、がん細胞の増殖能を抑制する効果があることが示唆された。

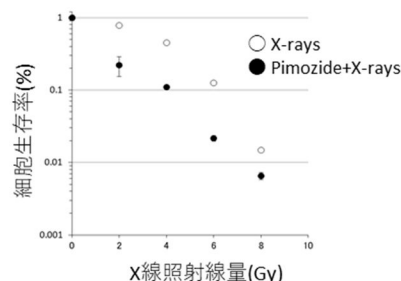


図 1 放射線増感効果

## 2. Pimozide と X 線の併用処理による細胞老化誘導効果の検討

次に **Pimozide** と X 線の併用処理によるがん細胞の増殖抑制効果が、老化誘導を介するものであるかを検討した。**SA-β-gal** 染色を行った結果、X 線照射 72, 96 時間後では、**Pimozide** と X 線の併用処理は X 線単独処理に比べ、**SA-β-gal** 染色陽性細胞割合が優位に増加しており (図 2)、細胞老化誘導効果が強いことが示された。よって、**Pimozide** と X 線の併用処理によるがん細胞の増殖能抑制効果は、細胞老化誘導を介するものであると考えられる。

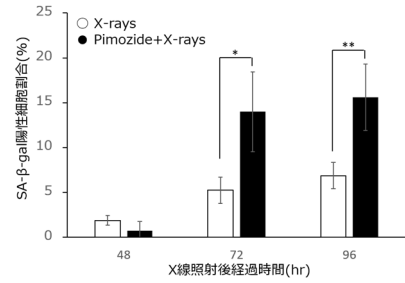


図 2 老化細胞割合の変化

## 3. <sup>18</sup>F]FLT、<sup>18</sup>F]FDG 取込能の検討

次に、この細胞老化誘導効果の効果判定に **PET** イメージング剤が有用であるかを検討を行った。<sup>18</sup>F]FDG 取込量は、X 線照射 72, 96 時間後では、X 線単独処理に比べ、**Pimozide** と X 線の併用処理によって増加していた (図 3)。細胞老化が誘導されたがん細胞では糖代謝能が亢進したために <sup>18</sup>F]FDG 取込量が増加したと考えられる。<sup>18</sup>F]FLT 取込量は、X 線照射 96 時間後では、X 線単独処理に比べ、**Pimozide** と X 線の併用処理で増加していた (図 4)。この結果は、老化細胞は分裂が永続的に停止した細胞であるため <sup>18</sup>F]FLT の取込量が減少するという予想に反した結果であった。X 線照射後に薬剤により細胞周期の再開が遅延した細胞では **TK1** 発現量と活性が亢進したという報告があり、今後 **TK1** 発現量・活性について検討していく必要がある。

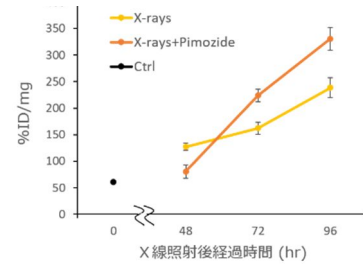


図 3 <sup>18</sup>F]FDG 取込量変化

これらの結果から、誘導された老化細胞数の違いによって <sup>18</sup>F]FDG および <sup>18</sup>F]FLT の取込量に差が見られたと考えた。そこで、酸素・栄養環境の違いや免疫細胞の浸潤といった、より複雑な腫瘍環境内においても **PET** プローブの取込が老化細胞と関連するかどうかを調べるために、**in vivo** 固形がん移植マウスモデルを用いて検討を行うこととした。

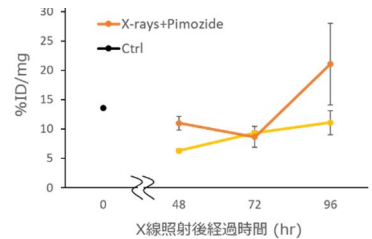


図 4 <sup>18</sup>F]FLT 取込量変化

## 4. マウスモデルにおける Pimozide と X 線の併用処理による細胞老化誘導効果の検討

培養細胞系で見られた細胞老化誘導効果が生体内においても見られるかを検討するため、腫瘍移植を行ったマウスモデルで検討を行った。腫瘍切片の **SA-β-gal** 染色を行った結果、コントロール群では **SA-β-gal** 陽性領域がほとんど見られなかったのに対し、**Pimozide** と X 線の併用群では陽性領域の増加が認められた。(図 5) よって、併用処理は動物モデルにおいても細胞老化誘導効果があることが示唆された。

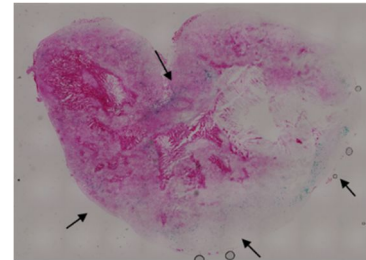


図 5 併用群の SA-β-gal 染色

## 5. マウスモデルにおける <sup>18</sup>F]FLT 取込能の検討

また、細胞老化誘導効果の判定に <sup>18</sup>F]FLT を用いた **ARG** が利用できるかを検討を行ったところ、**SA-β-gal** 陽性領域に <sup>18</sup>F]FLT の集積が見られる傾向が見られ (図 6 左) 集積領域に相関が見られた。(図 6 右) この結果から、老化細胞の指標として <sup>18</sup>F]FLT による **ARG** が有用である可能性が示唆された。

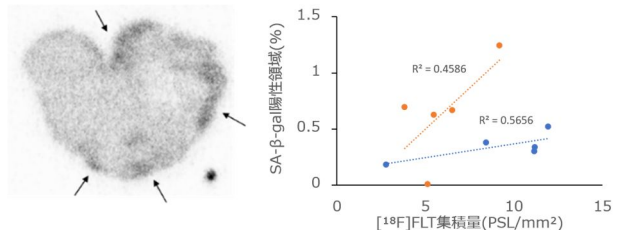


図 6 左: 併用群の <sup>18</sup>F]FLT の集積

右: 併用群の 2 個体における <sup>18</sup>F]FLT の集積と **SA-β-gal** 陽性領域の相関

以上の結果から、**pimozide** と X 線の併用処理により老化細胞が多く誘導された群において、<sup>18</sup>F]FDG、<sup>18</sup>F]FLT 取込量が増加することが **in vitro** において示された。また、**in vivo** 固形がん

ん移植マウスモデルにおいて老化細胞存在領域には $[^{18}\text{F}]\text{FLT}$  集積が見られることが示唆された。一方、すべての $[^{18}\text{F}]\text{FLT}$  集積領域が老化細胞存在領域ではないことが本研究の課題である。老化細胞と増殖細胞の $[^{18}\text{F}]\text{FLT}$  の取込機構の違いを解明することで、老化細胞特異的なイメージング手法の開発に繋がるのではないかと考える。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計3件（うち査読付論文 3件／うち国際共著 0件／うちオープンアクセス 1件）

1. 著者名 Yasui Hironobu, Iizuka Daisuke, Hiraoka Wakako, Kuwabara Mikinori, Matsuda Akira, Inanami Osamu	4. 巻 39
2. 論文標題 Nucleoside analogs as a radiosensitizer modulating DNA repair, cell cycle checkpoints, and apoptosis	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Nucleosides, Nucleotides and Nucleic Acids	6. 最初と最後の頁 439 ~ 452
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1080/15257770.2019.1670839	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 -

1. 著者名 Bo Tomoki, Yamamori Tohru, Yamamoto Kumiko, Fujimoto Masaki, Yasui Hironobu, Inanami Osamu	4. 巻 522
2. 論文標題 Mitochondrial fission promotes radiation-induced increase in intracellular Ca <sup>2+</sup> level leading to mitotic catastrophe in mouse breast cancer EMT6 cells	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Biochemical and Biophysical Research Communications	6. 最初と最後の頁 144 ~ 150
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.bbrc.2019.11.027	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 -

1. 著者名 Masaki Fujimoto, Tomoki Bo, Kumiko Yamamoto, Hironobu Yasui, Tohru Yamamori, Osamu Inanami	4. 巻 67
2. 論文標題 Radiation-induced abnormal centrosome amplification and mitotic catastrophe in human cervical tumor HeLa cells and murine mammary tumor EMT6 cells	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Journal of Clinical Biochemistry and Nutrition	6. 最初と最後の頁 240 ~ 247
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3164/jcbrn.19-80	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 -

〔学会発表〕 計13件（うち招待講演 0件／うち国際学会 2件）

1. 発表者名 Bo Tomoki, Yamamori Tohru, Yamamoto Kumiko, Fujimoto Masaki, Yasui Hironobu, Inanami Osamu.
2. 発表標題 Inhibition of mitochondrial fission reduces radiation-induced mitotic catastrophe via Ca <sup>2+</sup> regulation
3. 学会等名 16th International Congress of Radiation Research (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Yamamoto Kumiko、Yasui Hironobu、Bo Tomoki、Fujimoto Masaki、Fukushima Yuichiro、Hiraoka Wakako、Inanami Osamu
2. 発表標題 X-Irradiation enhances energy metabolism derived from mitochondrial electron transport chain and glycolysis in cancer cells
3. 学会等名 16th International Congress of Radiation Research ( 国際学会 )
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 東山りつ子、安井博宣、房知輝、山本久美子、藤本政毅、稲波修
2. 発表標題 Glutamine代謝阻害がX線照射による早期細胞老化およびアポトーシスの誘導に与える影響の検討
3. 学会等名 第162 回日本獣医学会学術集会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 東山りつ子、安井博宣、房知輝、山本久美子、藤本政毅、稲波修
2. 発表標題 ヒト肺腺がん A549細胞におけるグルタミノリシス阻害は放射線誘導性細胞老化を増強する
3. 学会等名 日本放射線影響学会第62回大会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 房知輝、山盛徹、山本久美子、藤本政毅、安井博宣、稲波修
2. 発表標題 ミトコンドリア分裂はCa <sup>2+</sup> 制御を通じて放射線による分裂期崩壊誘導に寄与する
3. 学会等名 第162 回日本獣医学会学術集会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 藤本政毅, 房知輝, 山本久美子, 安井博宣, 稲波修
2. 発表標題 ヒト肺腺がん由来A549細胞におけるグルタミンノリシスを標的とする放射線増感効果
3. 学会等名 第162 回日本獣医学会学術集会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 房知輝, 山盛徹, 山本久美子, 藤本政毅, 安井博宣, 稲波修
2. 発表標題 ミトコンドリア分裂とその Ca <sup>2+</sup> 制御は照射後の分裂期崩壊に寄与する
3. 学会等名 日本放射線影響学会第62回大会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 藤本政毅, 房知輝, 山本久美子, 安井博宣, 稲波修
2. 発表標題 ヒト肺腺がん由来 A549細胞においてグルタミンノリシス依存性のエネルギー代謝の阻害は放射線の効果を増強する
3. 学会等名 日本放射線影響学会第62回大会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 房知輝, 山盛徹, 山本久美子, 藤本政毅, 安井博宣, 稲波修
2. 発表標題 ミトコンドリア形態制御機構を標的とした放射線感受性変化の検討とそのメカニズムの解析
3. 学会等名 第57回日本放射線腫瘍学会生物部会学術大会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 房知輝, 山盛徹, 山本久美子, 藤本政毅, 安井博宣, 稲波修
2. 発表標題 放射線誘発細胞死に対するミトコンドリア分裂の寄与メカニズムの検討
3. 学会等名 第72 回日本酸化ストレス学会学術集会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 藤本政毅, 房知輝, 山本久美子, 安井博宣, 稲波修
2. 発表標題 ヒト肺腺がん由来A549細胞のエネルギー代謝におけるグルタミノリシス依存性とその放射線応答
3. 学会等名 第72 回日本酸化ストレス学会学術集会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 藤本政毅, 山下晃矢, 安井博宣, 稲波修
2. 発表標題 ヒト肺腺がん由来A549細胞におけるグルタミノリシスが関与する細胞内レドックス調節と放射線感受性
3. 学会等名 第73 回日本酸化ストレス学会学術集会/第20回日本N0学会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 藤本政毅, 房知輝, 安井博宣, 山盛徹, 稲波修
2. 発表標題 放射線誘発性分裂期崩壊における中心体過剰複製の役割
3. 学会等名 日本放射線影響学会第63回大会
4. 発表年 2020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	稲波 修  (Inanami Osamu)  (10193559)	北海道大学・獣医学研究院・教授   (10101)	
研究分担者	東川 桂  (Higashikawa Kei)  (10756878)	北海道大学・アイソトープ総合センター・助教   (10101)	
研究分担者	孫 略  (Sun Lue)  (40757704)	国立研究開発法人産業技術総合研究所・生命工学領域・研究員   (82626)	
研究分担者	久下 裕司  (Kuge Yuji)  (70321958)	北海道大学・アイソトープ総合センター・教授   (10101)	

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
---------	---------