

令和 6 年 4 月 30 日現在

機関番号：82502

研究種目：若手研究

研究期間：2021～2023

課題番号：21K15490

研究課題名（和文）PDTを用いた放射線抵抗性がん治療法の検討

研究課題名（英文）Examination of radiation-resistant cancer treatment using photodynamic therapy

研究代表者

伊藤 紘（Ito, Hiromu）

国立研究開発法人量子科学技術研究開発機構・量子生命科学研究所・主任研究員

研究者番号：80793934

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,300,000円

研究成果の概要（和文）：光線力学療法（Photodynamic therapy: PDT）は、がん細胞特異的集積能力を有する光増感剤に特定波長の低エネルギーレーザー照射を行うことによって活性酸素産生を誘導し、がん細胞死を誘発するがん治療法である。本研究では、放射線照射によって放射線抵抗性を獲得したがん細胞に対して、PDTが有効な治療法となり得ることを明らかにした。

研究成果の学術的意義や社会的意義

放射線治療はがん治療における主要な治療法の一つであるが、治療過程において放射線抵抗性を獲得するがん細胞が存在し、予後不良因子となり得る。従って、そのような放射線感受性が低下したがん細胞に対する別の治療法が必要である。PDTは患者に対する侵襲性が低く副作用も少ないことから、放射線抵抗性がん細胞治療に利用できれば治療成績の向上に貢献できると期待される。

研究成果の概要（英文）：Photodynamic therapy (PDT) is a cancer treatment using reactive oxygen species induced by the irradiation of low-powered laser to photosensitizers possessing an ability to accumulate in cancer cells. In this study, a possibility of applying PDT to the treatment of radiation-induced radiation-resistant cancer cells has been investigated.

研究分野：腫瘍生物学

キーワード：X線 放射線抵抗性がん 活性酸素種 光線力学療法 ポルフィリン

1. 研究開始当初の背景

がん治療において放射線は大きな武器であり、多くの症例に対して幅広く利用されている。放射線治療の最大のメリットは体を切らずに治療を行うことができるため、患者に対する負担を軽減することができる点である。一方、デメリットとして放射線障害による副作用が挙げられるが、近年ではコンピューター制御で正常組織への副作用を限りなく減少させている。ところが、がん細胞の中には放射線治療の過程において抵抗性を獲得するものが存在している。がん細胞の放射線抵抗性獲得のメカニズムは完全には解明されておらず、重大な予後不良因子である。従って、放射線抵抗性がん細胞に対する新たな治療方法の開発が急務である。

光線力学療法 (Photodynamic Therapy: PDT) は、腫瘍特異的集積能力を有する光増感剤を患者に投与し、腫瘍部へのレーザー照射によって活性酸素の一種である一重項酸素を発生させ、腫瘍細胞を死滅させるがん治療法である。PDT 用光増感剤としてポルフィリン化合物が従来使用されてきた。ポルフィリンは腫瘍細胞優位に集積することから、正常組織に対する侵襲性を低減することができる。従って、高齢者などの手術不適合患者に対しても適応可能であり、既に肺癌、食道癌、胃癌、子宮頸癌などに広く利用されている。しかし、ポルフィリンの腫瘍集積性についてのメカニズムは長年不明であった。申請者は血液中の酸素運搬を担うヘムを輸送するタンパクである Heme Carrier Protein 1 (HCP1) というタンパクに着目し、ヘムとポルフィリンはその構造が非常に似通っていることから、HCP1 によってヘムだけではなくポルフィリンも輸送されることを予想した。実際に HCP1 の高発現細胞株ではポルフィリンの細胞内取り込み量が増加し、一方で HCP1 のノックダウンによって取り込み量が減少したことから、ポルフィリンが HCP1 によってがん細胞内へ輸送されることが明らかとなった¹。さらに、HCP1 はがん細胞における高濃度のミトコンドリアから産生される活性酸素種 (mitochondrial reactive oxygen species: mitROS) によってその発現が増強されることも見出されてきた²。つまり、がん細胞内における mitROS の産生増大は、HCP1 の発現増強を介してポルフィリンの細胞内集積をさらに高め、PDT によるがん治療を効率化させることが考えられる。さらに、放射線を細胞へ照射することによってミトコンドリアからの活性酸素の産生が増大することが報告されている³。従って、治療過程において抵抗性を示すまで複数回にわたって放射線を照射された細胞では mitROS の産生が大きく増大していることが予想される。このような放射線照射によって放射線抵抗性を獲得したがん細胞に対しては、PDT が効果的な作用を示すことが考えられる。

2. 研究の目的

本研究では、放射線照射によって放射線抵抗性を獲得したがん細胞に対する治療法として PDT が有効であるかを検討するとともに、その分子生物学的メカニズムの解明を試みた(図1)。

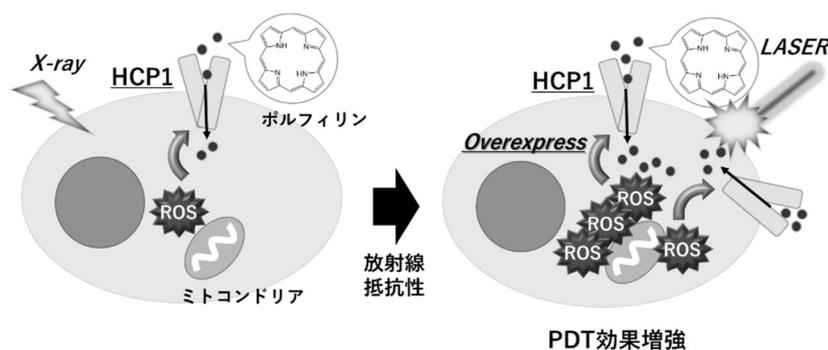


図1 放射線抵抗性細胞に対する PDT

放射線は極めて有用ながん治療法の一つであるが、課題面も多く存在している。特に、放射線に抵抗性を持つがんに対しては主要な治療法の一つを失うことから、患者に対する影響は大きい。加えて、がん細胞が抵抗性を獲得するメカニズムは解明されていない。従って、放射線抵抗性のがんに対する新たな治療法が求められている。本研究は、申請者がこれまで取り組んできた mitROS による PDT 増感作用機構を放射線照射細胞に応用するものである。また、本検討によって放射線抵抗性がん細胞への新たな対抗策を創造することができ、PDT の適応症例の拡大が期待される。放射線治療と PDT はともに認可されたがん治療法であるため、迅速な実臨床への応用が期待される。

3. 研究の方法

(1) 放射線抵抗性細胞の作製および characterization

放射線抵抗性細胞株を作製し、その形態的特徴について親株との比較を行った。本検討では、胃癌細胞株 RGK1 を用いた。RGK1 は放射線抵抗性を示す傾向がある胃癌の細胞株であり、申請者が長年使用してきた経緯からその基本的特徴を熟知している。さらに、胃癌に対する PDT は既に実臨床において承認されていることから、本研究の臨床応用に対するハードルが低くなるという点から今回使用した。RGK1 に実際の X 線治療と同様に、2 Gy/day×30 回の X 線照射を行い、生存細胞を放射線抵抗性細胞として回収した。回収した細胞について、ROS 産生量、HCP1 発現量、細胞内ポルフィリン集積量を放射線未照射群と比較した。

(2) PDT 増感効果の検討 (in vitro)

(1) で作製した放射線抵抗性細胞に対する PDT 効果を検討した。ポルフィリンを集積させた細胞にレーザーを照射し、細胞生存率を Cell Counting Kit-8 (同仁化学株式会社) によって算出した。

(3) PDT 増感におけるメカニズム解明

PDT 増感効果について、分子生物学的メカニズム解明を行った。放射線照射を生き延びた細胞は低酸素誘導因子 HIF-1 の活性を獲得することで腫瘍内血管へ移動することが報告されている⁴。一方、HIF-1 は HCP1 の転写因子としても働くことから、抵抗性細胞は HIF-1 を介した HCP1 誘導を行い、PDT 効果を促進することが考えられる。従って、放射線抵抗性細胞の HIF-1 の発現量をウエスタンブロッティング (WB) によって非照射群と比較した。

(4) モデル動物に対する効果検討

放射線抵抗性細胞に対する PDT の治療効果について in vivo で検討を行った。免疫不全マウス右足部に放射線抵抗性細胞もしくは放射線未照射のコントロール細胞を担持したモデルマウスを作製した。担癌モデルマウスへのポルフィリン投与後に腫瘍部へのレーザー照射を行い、腫瘍径を経時的に測定することで PDT による治療効果を検討した。

4. 研究成果

X 線照射を複数回行った胃癌細胞株 RGK1 と照射を実施していない細胞株それぞれに X 線照射を行い、X 線に対する細胞生存率をコロニー形成法によって比較した。X 線を照射された細胞は非照射細胞に比べて X 線照射に対する細胞生存率が有意に向上していたことから、X 線抵抗性の癌細胞を樹立できたと考えられる。放射線抵抗性細胞における ROS 産生量を蛍光色素の hydroxyphenyl fluorescein (HPF) および MitoSOX™ を用いてコントロール細胞と比較検討した。いずれの蛍光色素を用いた場合においても、放射線抵抗性細胞の方がコントロールの放射線非照射細胞に比べて蛍光量が有意に増加していた。従って、放射線照射によって放射線抵抗性を獲得した細胞では細胞内活性酸素の産生量が増加していたことが示唆された。また、ポルフィリン取り込みタンパクである HCP1 の発現量をウエスタンブロッティングによって検討した。HCP1 の発現は放射線抵抗性細胞においてコントロール細胞と比べて増加していた。さらに、低酸素誘導因子 HIF-1 の発現もウエスタンブロッティングによって調べたところ、HCP1 同様、放射線抵抗性細胞において増加していた。既往研究から X 線照射によって mitROS の産生増大が起こることが明らかとなっていたほか、mitROS が HIF-1 α を安定化することおよび HCP1 の発現誘導を行う知見が得られていた^{2,3,5} (図 2)。さらに上述のとおり、放射線抵抗性細胞は HIF-1 の活性化を介して生き延びるとの報告もなされていることから⁴、放射線抵抗性がんの治療に PDT が有効に作用するのではないかと予想された。実際に、放射線抵抗性細胞におけるポルフィリン集積量はコントロール細胞に比べて有意に増加しており、ポルフィリン曝露後のレーザー照射による細胞殺傷効果も放射線抵抗性細胞で増強していた。細胞での検討だけでなく、担癌モデルマウスを用いた PDT による癌治療効果の検討においても、放射線抵抗性細胞を担持したモデルマウスではコントロールに比べて腫瘍の増殖が抑制される傾向が観察された。以上の結果から、放射線照射によって放射線抵抗性を獲得したがん細胞の治療に対して PDT が一定の効果を示すことが示唆された。

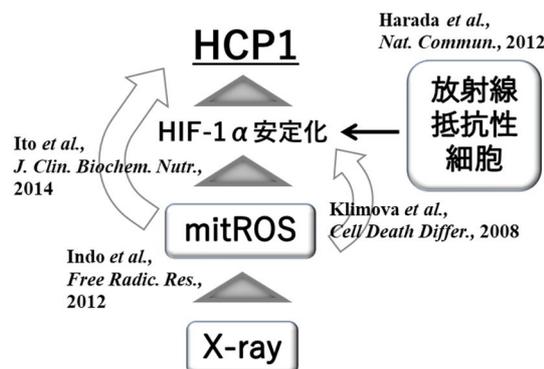


図 2 mitROS による HCP1 発現と放射線の関与

引用文献

1. Hiyama, K. *et al.* Cancer cells uptake porphyrins via heme carrier protein 1. *J. Porphyr. Phthalocyanines* **17**, 36–43 (2013).
2. Ito, H. *et al.* Mitochondrial reactive oxygen species accelerate the expression of heme carrier protein 1 and enhance photodynamic cancer therapy effect. *J. Clin. Biochem. Nutr.* **55**, 67–71 (2014).
3. Indo, H. P. *et al.* Roles of mitochondria-generated reactive oxygen species on X-ray-induced apoptosis in a human hepatocellular carcinoma cell line, HLE. *Free Radic. Res.* **46**, 1029–1043 (2012).
4. Harada, H. *et al.* Cancer cells that survive radiation therapy acquire HIF-1 activity and translocate towards tumour blood vessels. *Nat. Commun.* **3**, 783 (2012).
5. Klimova, T. & Chandel, N. S. Mitochondrial complex III regulates hypoxic activation of HIF. *Cell Death Differ.* **15**, 660–666 (2008).

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計1件（うち査読付論文 1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 Ito Hiromu, Shoji Yoshimi, Ueno Megumi, Matsumoto Ken-ichiro, Nakanishi Ikuo	4. 巻 15
2. 論文標題 Photodynamic Therapy for X-ray-Induced Radiation-Resistant Cancer Cells	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 Pharmaceutics	6. 最初と最後の頁 2536 ~ 2536
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.3390/pharmaceutics15112536	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1件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 伊藤 紘
2. 発表標題 放射線抵抗性腫瘍細胞に対する光線力学的治療効果の検討
3. 学会等名 第75回日本酸化ストレス学会学術集会
4. 発表年 2022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
---------------------------	-----------------------	----

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