

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 6 月 23 日現在

機関番号：14301

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2014～2015

課題番号：26670558

研究課題名(和文) 腫瘍内低酸素がん細胞の動的平衡の時空間解析と放射線分割療法最適化への展開

研究課題名(英文) Spatiotemporal analyses of the dynamics of hypoxic tumor cells for the optimization of fractionated radiation therapy for cancers

研究代表者

原田 浩 (Harada, Hiroshi)

京都大学・白眉センター・准教授

研究者番号：80362531

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)：本研究で我々は、腫瘍組織内の低酸素環境下で低酸素誘導性転写因子HIF-1依存的にCre-ERT2を発現するシステムを活用し、悪性腫瘍の増殖過程で低酸素領域を構成するがん細胞がどのような時間軸で入れ替わっているのかを解析した。その結果、腫瘍血管から70-85ミクロン離れて存在する低酸素がん細胞が、24時間後には血管から85-100ミクロンの位置に移動し、さらにその24時間後には血管から100ミクロン以上離れた壊死領域に押し出されることを見出した。この結果は、放射線を分割照射する場合に24時間程度のインターバルをおくことの有用性を示している。

研究成果の概要(英文)：In the present study, we exploited a sophisticated strategy which enabled us to tag hypoxic cells with luciferase protein in tumor xenograft by using the hypoxia-responsive transcription factor-dependent Cre-loxP system, and performed spatiotemporal analyses about the dynamics of cancer cells in intratumoral hypoxic regions. What we found is that, 24 hours after hypoxic cells were tagged with luciferase protein in the regions 70-85 micrometers distant regions from tumor blood vessels, the cells were located in 85-100 micrometers from vessels. In the following day (48 hours after the tagging), the cells were detected in necrotic regions located more than 100 micrometer from vessels. These results support an idea that the interval of fractionated radiation therapy for cancer is about 24 hours.

研究分野：放射線腫瘍生物学

キーワード：がん 放射線治療 分割照射 腫瘍内低酸素 HIF-1

1. 研究開始当初の背景

先行研究を通して我々は、腫瘍血管から離れて存在する低酸素がん細胞が、放射線治療後のがんの再発を担っている可能性を報告した (Harada et al. Nature Communications, 2012.)。また、低酸素領域は腫瘍血管から約 70-100 ミクロン離れて存在するものの、同領域を構成する細胞群が徐々に入れ替わっていることを示唆する結果を得てきた (Zhu et al. Oncogene, 2013.; Yeon et al. Int J Mol Sci, 2012.)。これらの研究を通して、「放射線治療後のがんの再発を防ぐためには、腫瘍内低酸素領域を構成するがん細胞が入れ替わるタイムスケールを明らかにし、その情報をもとにして放射線分割照射の間隔を最適化する必要があること」を見出してきた。

2. 研究の目的

マウスの腫瘍モデルを対象に、上記動的平衡のタイムスケール(血管遠位にとどまっ見える低酸素領域に於いて、がん細胞が入れ替わるタイムスケール)を明らかにすることを目的に定め、以下に報告する研究成果を得た。

3. 研究の方法

低酸素環境下で活性化する転写因子 hypoxia-inducible factor 1 (HIF-1) を活用し、HIF-1 依存的に Cre-ER^{T2} を発現するベクターを構築する。その遺伝子産物を、floxed STOP-luciferase 発現カセットと共にがん細胞のゲノム DNA に安定導入し、樹立した細胞を免疫不全マウス (BALB/c nu/nu) に移植する。そうして得た担がんマウスにタモキシフェンを投与して、腫瘍内の低酸素領域内にあるがん細胞に対して HIF-1 依存的に光標識を導入する系を立ち上げる。当該モデルマウスを活用して、上記動的平衡のタイムコースに迫る。

4. 研究成果

当初の計画に従って、HIF-1 依存的に Cre-ER^{T2} を発現する人工遺伝子を構築した。そして floxed STOP-luciferase 発現カセットと共にがん細胞のゲノム DNA に integrate させた。このがん細胞を移植して準備した担がんマウスに対してタモキシフェンを投与することによって、腫瘍内低酸素領域に存在するがん細胞にルシフェラーゼの発光標識を導入することに成功した。この腫瘍モデルを活用して動的平衡のタイムコースを解析する目的で、タモキシフェン投与し、継時的にマウスから腫瘍を摘出して、免疫組織化学染色法で詳細な解析を行った。その結果、タモキシフェン投与 24 時間後に腫瘍血管から約 70-85 ミクロンの位置に存在していたルシフェラーゼ標識細胞が、その翌日(タモキシフ

エン投与 48 時間後)には腫瘍血管から約 85-100 ミクロンの位置に移動し、さらにその翌日(タモキシフェン投与 72 時間後)には、腫瘍血管から約 100 ミクロン以上離れた壊死領域(ヘマトキシリン染色陰性エリア)に位置を変えることを明らかにした。以上をもって当初の計画通りに、腫瘍内に存在するがん細胞の動的平衡を詳細に解明することに成功した。また、当初の計画を上回る成果として、遺伝子工学的に低酸素がん細胞にアポトーシスを誘導できる系を確立し、低酸素がん細胞を腫瘍内から排除したタイミングで放射線治療を施した場合に、がんの再発率が有意に低下することを証明し、当該領域のがんの再発における重要性を証明することに成功した。

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 15 件)

*Harada H. Hypoxia-inducible factor 1-mediated characteristic features of cancer cells for tumor radioresistance. J Radiat Res. pp1-7. 2016. doi: 10.1093/jrr/rrw012.

Olcina MM, Leszczynska K, Senra JM, Isa N, Harada H, Hammond EM. H3K9me3 facilitates hypoxia-induced p53-dependent apoptosis through repression of APAK. Oncogene. 35:793-799. 2016. doi: 10.1038/onc.2015.

Gaowa A, Horibe T, Kohno M, Harada H, Hiraoka M, Kawakami K. Potent anti-tumor effects of EGFR-targeted hybrid peptide on mice bearing liver metastases. Clin Exp Metastasis. 33:87-95. 2016.

Koyasu S., Tsuji Y., Harada H., Nakamoto Y., Nobashi T., Kimura H., Sano K., Koizumi K., Hamaji M., Togashi K. Evaluation of tumor-associated stroma and its relationship with tumor hypoxia using dynamic contrast-enhanced CT and 18F-misonidazole PET in murine tumor models. Radiology. 278:734-741. 2016.

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

Tanaka S, Harada H, Hiraoka M. A novel method to visually determine the intracellular pH of xenografted tumor in vivo by utilizing fluorescent protein as an indicator. Biochem Biophys Res Commun. 464:1151-1156. 2015. doi: 10.1016/j.bbrc.2015.07.095.

Zeng L, Morinibu A, Kobayashi M, Zhu Y, Wang X, Goto Y, Yeon CJ, Zhao T, Hirota K, Shinomiya K, Itasaka S, Yoshimura M, Guo G, Hammond EM, Hiraoka M, *Harada H.

Aberrant IDH3alpha expression promotes malignant tumor growth by inducing HIF-1-mediated metabolic reprogramming and angiogenesis. *Oncogene*. 34:4758-4766. 2015. doi: 10.1038/onc.2014.411.

Matsuyama T, Tanaka T, Tatsumi K, Daijo H, Kai S, Harada H, Fukuda K. Midazolam inhibits the hypoxia-induced up-regulation of erythropoietin in the central nervous system. *Euro J Pharmacol*. 761:189-198. 2015. doi: 10.1016/j.ejphar.2015.05.024.

Gaowa A, Horibe T, Kohno M, Tabata Y, Harada H, Hiraoka M, Kawakami K. Enhancement of anti-tumor activity of hybrid peptide by conjugation with carboxymethyl dextran via disulfide linkers. *Eur J Pharm Biopharm*. 92:228-236. 2015. doi: 10.1016/j.ejpb.2015.03.015.

Goto Y, Zeng L, Yeom CJ, Zhu Y, Morinibu A, Shinomiya K, Kobayashi M, Hirota K, Itasaka S, Yoshimura M, Tanimoto K, Torii M, Sowa T, Menju T, Sonobe M, Kakeya H, Toi M, Date H, Hammond EM, Hiraoka M, *Harada H. UCHL1 provides diagnostic and antimetastatic strategies due to its deubiquitinating effect on HIF-1 α . *Nat Commun*. 6: 6153.2015. doi: 10.1038/ncomms7153.

Miki K, Kimura A, Inoue T, Matsuoka H, Harada H, Hiraoka M, Ohe K. Synthesis of Biocompatible Polysaccharide Analogues and Their Application to In Vivo Optical Tumor Imaging. *Bull Chem Soc Jpn*. 88:792-803. 2015.

Wu JB, Shao C, Li X, Shi C, Li Q, Hu P, Chen YT, Dou X, Sahu D, Li W, Harada H, Zhang Y, Wang R, Zhou HE, Chung LW. Near-infrared fluorescence imaging of cancer mediated by tumor hypoxia and HIF1 α /OATPs signaling axis. *Biomaterials*. 35: 8175-8185. 2014. doi: 10.1016/j.biomaterials.2014.05.073.

Miki K, Hashimoto H, Inoue T, Matsuoka H, Harada H, Hiraoka M, Ohe K. Sonication-Induced Formation of Size-Controlled Self-Assemblies of Amphiphilic Janus-Type Polymers as Optical Tumor Imaging Agents. *Small*. 10: 3119-3130. 2014. doi: 10.1002/sml.201400358.

Ohnishi K, Tani T, Bando S, Kubota N, Fujii Y, Hatano O, Harada H. Plastic induction of CD133AC133-positive cells in the microenvironment of glioblastoma spheroid. *Int J Oncol*. 45: 581-586. 2014. doi: 10.3892/ijo.2014.2483.

Zhao T, Zhu Y, Morinibu A, Kobayashi M, Itasaka S, Yoshimura M, Hiraoka M, *Harada H. HIF-1-mediated metabolic reprogramming reduces ROS levels and facilitates the metastatic colonization of cancers in lungs. *Sci Rep*. 4:3793. 2014. doi: 10.1038/srep03793.

〔学会発表〕(計18件)

原田浩, 平岡真寛. 低酸素バイオロジーで迫るがん細胞の放射線抵抗性獲得機構. 日本放射線影響学会評議員学術講演会. 東京. Mar 29. 2016.

原田浩, 平岡真寛. 低酸素バイオロジーへのいざない. 幹細胞・がん・エピゲノムに関する合同リトリート. 滋賀. Mar 7. 2016.

原田浩, 平岡真寛. がん細胞の放射線抵抗性の理解. 第2回松島シンポジウム. Mar. 4-5. 2016.

原田浩, 平岡真寛. がん細胞の糖代謝経路リプログラミングと放射線抵抗性. 奈良. Feb. 4th. 2016.

Harada H, Hiraoka M. Tumor Hypoxia; a Potent Inducer of Tumor Malignant Phenotypes. International Symposium@The 4th Military Medical University. Xi'an. China. Jan. 7. 2016.

原田浩, 平岡真寛. Importance of Hypoxic Niche; Lessons from Hypoxia and Cancer Biology. Biochemistry and Molecular Biology 2015 (BMB2015). Kobe. Dec 2. 2015.

原田浩, 平岡真寛. Molecular Biology for the Advancement of Cancer Radiotherapy; in the Past and the Future. 日本放射線腫瘍学会 第28回学術大会. 群馬. Nov. 19. 2015.

Harada H, Hiraoka M. Tumor Hypoxia, a Potent Inducer of Malignant Phenotypes of Cancer Cells. 2nd IFOM-Kyoto University Joint International Symposium. Kyoto. Oct 7. 2015.

原田浩, 平岡真寛. IDH3-HIF-1 経路によるがん細胞の糖代謝リプログラミング. 第3回癌と代謝研究会. 金沢. Jul. 16-17. 2015.

原田浩, 平岡真寛. 低酸素バイオロジーに基づく放射線治療の新展開. 日本医学放射線学会 (JRS) 中四国地方会 放射線治療懇話会 特別講演. 山口. Jun 27. 2015.

原田浩, 平岡真寛. 低酸素バイオロジー研究に於けるデータベースの活用例. 第13回がんとハイポキシア研究会. 三島. Jun. 6-7. 2015.

Harada H, Hiraoka M. Tumor Hypoxia and Radioresistance. The 15th International Congress for Radiation Research (ICRR2015). Kyoto. May 25-29. 2015.

原田浩, 平岡真寛. 低酸素生物学に基づく生体内低酸素の可視化. 第54回日本生体医工学会. 名古屋. May 7-9. 2015.

原田浩, 平岡真寛. がん幹細胞と腫瘍内低酸素 -癌の診断と治療における重要性と展望-. 第74回日本医学放射線学会. 横浜. Apr. 17-19. 2015.

原田浩, 平岡真寛. 腫瘍内低酸素領域・HIF-1活性を診る意義 -低酸素バイオロジー研究で明らかになったがんの悪性形質獲得メカニズム-. 第17回国際癌治療増感シンポジウム. 奈良. Feb. 6-7. 2015.

原田浩, 平岡真寛. がんの微小環境研究を通して同定された新たな治療標的. 第3回国際先端生物学・医学・工学会議. 名古屋. Jan

15-16. 2015.

Harada H、Hiraoka M. UCHL1 provides novel diagnostic and antimetastatic strategy due to its deubiquitinating effect on HIF-1alpha. Hypoxia Meeting, Oxford. Jul. 4. 2014.

原田浩、平岡真寛. IDH3 によるがんの代謝リプログラミング機構の解明と新たな治療法確立への展開. 第 18 回日本がん分子標的治療学会学術総会. 仙台. Jun. 26. 2014.

〔図書〕(計 2 件)

後藤容子、平岡真寛、*原田浩. 低酸素シグナル. 生体の科学. 66:394-395. 2015.

後藤容子、平岡真寛、*原田浩. 低酸素がんと標的とした治療. Bio Clinica. 30:145-150. 2015.

〔産業財産権〕

○出願状況 (計 1 件)

名称: 新規抗腫瘍剤及び新規抗腫瘍剤のスクリーニング方法

発明者: 原田浩、平岡真寛

権利者: 国立大学法人京都大学

種類: 特許権

番号: 国際出願番号 JP2012064964、国際公開番号 WO2012176651

出願年月日: 2012 年 6 月 12 日

国内外の別: 国際

○取得状況 (計 0 件)

〔その他〕

ホームページ等

<http://radiotherapy.kuhp.kyoto-u.ac.jp/biology/>

http://www.med.kyoto-u.ac.jp/organization-staff/research/doctoral_course/r-080/

http://www.med.kyoto-u.ac.jp/en/organization-staff/research/doctoral_course/r-080/

http://www.lif.kyoto-u.ac.jp/j/?post_type=labos&p=6923

http://www.lif.kyoto-u.ac.jp/e/?post_type=labos&p=3701

6 . 研究組織

(1)研究代表者

原田 浩 (HARADA, Hiroshi)

京都大学・白眉センター・特定准教授

研究者番号: 8 0 3 6 2 5 3 1

(2)研究分担者

吉村 通央 (Yoshimura, Michio)

京都大学・大学院医学研究科・助教

研究者番号: 4 0 5 9 7 9 3 6

小林 稔 (KOBAYASHI, Minoru)

京都大学・大学院医学研究科・研究員

研究者番号: 4 0 6 4 4 8 9 4

(3)連携研究者
なし