

平成 30 年 6 月 8 日現在

機関番号：11101

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2015～2017

課題番号：15K19764

研究課題名(和文)新規HIF-1阻害薬LW6のEMT抑制作用に新たな放射線併用療法を見出す

研究課題名(英文) Exploring new combination of radiotherapy and LW6, a novel HIF-1 inhibitor; suppression of EMT by LW6

研究代表者

佐藤 まり子 (Sato, Mariko)

弘前大学・医学部附属病院・助教

研究者番号：30645263

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,000,000円

研究成果の概要(和文)：低酸素腫瘍細胞では、放射線そのものが上皮間葉転換(EMT)の増進に影響することが明らかになってきている。低酸素誘導性EMTにはHIF-1の関与が報告されており、LW6はHIF-1抑制を介して、低酸素腫瘍の放射線治療効果改善に働く可能性が期待できる。

ヒト肺腺癌A549細胞株を通常酸素下または低酸素下(1% O₂)で培養し、0 Gyもしくは10 GyのX線照射を行って、創傷治癒アッセイとEMTマーカーやJNK、p-JNKの発現量を評価した。結果、LW6が低酸素/照射誘導性EMTの両方を阻害し、さらにこれにはLW6によるHIF-1阻害とJNK活性化の抑制が関与していることが明らかになった。

研究成果の概要(英文)：Recently study reported that hypoxic cancer cells are promoted epithelial-mesenchymal transition (EMT) by radiation therapy. The induction of hypoxia-induced EMT involvement of HIF-1 pathway has been suggested, therefore it is expected that LW6 improve the radiotherapeutic effect of hypoxic tumor via HIF-1 inhibition.

The human lung adenocarcinoma A549 cells were cultured under normoxia or hypoxia (O₂ 1%), and X-irradiated 0 or 10 Gy. We performed wound-healing assay and evaluated the expression of EMT markers, JNK and p-JNK. In this study, we revealed that LW6 suppress each of hypoxia- and radiation-induced EMT leading to cancer relapse through HIF-1 pathway and JNK pathway blockade.

研究分野：放射線生物学

キーワード：上皮間葉転換(EMT) HIF-1 HIF-1阻害剤 低酸素 放射線治療

1. 研究開始当初の背景

固形癌に対する放射線治療において、低酸素に起因する放射線抵抗性の獲得の他に、放射線そのものが低酸素と相乗効果を成して癌幹細胞能の獲得・維持と浸潤能の増進に影響することが明らかになってきており、今臨床的にも問題視されつつある。

近年、直腸癌の化学放射線療法として、骨盤に対して 50.4 Gy 照射後に局所に対してブースト 5 Gy を 2 回追加すると、追加しない場合に比べ局所再発率がより悪化する傾向にあることが報告された (Appelt et al., Int J Radiat Oncol Biol Phys 2014)。これは結腸直腸癌が低酸素環境下で放射線抵抗性を獲得して放射線に堪え凌ぐだけでなく、遊走・浸潤能を高める何らかの事象が生じ得ないと説明がつかない。まさに現在癌研究において注目されている上皮間葉形質転換 (epithelial-mesenchymal transition; EMT) が生じ細胞遊走・浸潤能を獲得するということが実際に生体組織内で起きていることに他ならない。そして放射線はこれに更なる拍車をかけているという悪循環さえ見出されてくる。

EMT の誘発には MAPK (Mitogen-activated protein kinase) を介する経路や Hypoxia-inducible factor-1 α (HIF-1 α) の関与が示唆されている。増大した腫瘍の壊死辺縁領域では低酸素環境が形成され、HIF-1 α 発現上昇や活性化が生じる。そして HIF-1 が Twist や Snail などの EMT 関連タンパク質の発現促進に働き、転移・浸潤能を亢進することがわかっている。

我々は HIF-1 α に対する新規小分子阻害剤である LW6 について検討を重ねてきた。これまでに、LW6 が低酸素選択的に腫瘍細胞に対してアポトーシスを誘導することを明らかにした (Sato et al, Mol Med Rep. 2015.) が、さらに、LW6 は、HIF-1 を抑制すること

で EMT を介する再発機構を抑制する、またとない治療薬剤となる大きな可能性を秘めている。

2. 研究の目的

低酸素腫瘍細胞に対する放射線照射が与える EMT への影響とそのシグナル伝達経路を明らかにして、新規 HIF-1 α 阻害剤である LW6 が、照射後の生残細胞に誘導される EMT とこれに伴う浸潤能を多段階的に抑制することができるかを検討する。

3. 研究の方法

実験には、ヒト肺腺癌 A549 細胞株を用いた。

1. 低酸素及び照射による EMT 誘導機序・相互作用機序の解明

1) 低酸素細胞 ; 6 well plate に細胞を播種し、confluent の状態にした。ピペットチップで引っ掻いて創傷をつくり、通常酸素条件 (21% O₂) 下または低酸素条件 (1% O₂) 下にて培養して創傷治癒アッセイを行った。24 時間後に細胞を観察し、創傷幅を測定した。また、cell invasion chamber へ細胞を播種し、通常酸素下または低酸素下にて培養して細胞浸潤アッセイを行った。24 時間で細胞を固定、染色し、浸潤細胞数を定量化して、低酸素による細胞浸潤能の増進効果を評価した。

2) 10 Gy の X 線照射を行った細胞と非照射細胞 (通常酸素下) ; 1. 1) と同様に創傷を作成後、通常酸素下で培養し、創傷治癒アッセイを行った。また、cell invasion chamber へ細胞を播種し、通常酸素下にて培養し、細胞浸潤アッセイを行った。

3) 細胞を、X 線 10 Gy 照射あるいは低酸素へ曝露し、24 時間培養。その後、細胞を回収

タンパク質を定量後、ウェスタンブロット法を用いて、HIF-1 α 、MAPK ファミリーである JNK、phospho-JNK (p-JNK)、EMT マーカーである E-cadherin、N-cadherin、vimentin について定量解析を行った。

4) さらに、低酸素あるいは放射線照射により E-cadherin の局在が変化することが報告されており、これを検討するため、免疫組織化学染色法(蛍光法)を用いて、E-cadherin、N-cadherin、vimentin の局在を観察した。

5) JNK の siRNA を用いて MAPK を阻害した細胞を用い、3)と同様に定量解析を行った。

2. LW6 の JNK 抑制作用に起因する低酸素及び照射誘導性 EMT 阻害作用

1) HIF-1 阻害剤 LW6、YC-1 で前処理した細胞について、通常酸素下または低酸素下で創傷治癒アッセイ、細胞浸潤アッセイを行った。また、同様に前処理した細胞へ 10 Gy の X 線照射を行い、創傷治癒アッセイ、細胞浸潤アッセイを行った。

2) 同様に、JNK 阻害剤 SP600125 を前投与した細胞についても同様に創傷治癒アッセイを行った。

3. LW6 による照射誘導性 JNK の活性化抑制作用

1) JNK 阻害剤である SP600125 および siRNA を用いて MAPK を阻害した細胞に、10 Gy の X 線照射を行い、通常酸素下で培養した。その後、細胞を回収してタンパク質を定量し、JNK、p-JNK、E-cadherin、N-cadherin、vimentin の発現量をウェスタンブロット法により評価した。

2) LW6 を前投与した細胞に 10 Gy の X 線照射を行い、通常酸素下で培養し、細胞を回収してタンパク質発現量をウェスタンブロット法により評価した。

3) HIF-1 に対する小分子阻害剤である YC-1、についても 2. 2)と同様に細胞へ投与し、各タ

ンパク質の定量化を行った。

4. 研究成果

創傷治癒アッセイにおいて、低酸素曝露と X 線照射のいずれもが創傷幅の縮小をもたらした ($P < 0.01$)、細胞の創傷治癒を促進していた。E-cadherin は細胞接着に働くことが知られているが、その局在を蛍光顕微鏡にて観察したところ、control 群では細胞質および細胞膜への分布が明らかだったのに対して、低酸素へ曝露した細胞群では E-cadherin の発現が全体的に低下したうえ、細胞膜への分布が著明に減少していた。この変化は、X 線照射細胞においても同様にみられた。

しかしながら LW6 投与によって低酸素および X 線照射細胞でみられた E-cadherin の発現低下および局在の変化はいずれも明らかでなくなり、細胞膜への E-cadherin の発現が観察された。また、X 線照射細胞では vimentin の発現増強が認められたが、LW6 投与によってこれが抑制された。以上より、LW6 は E-cadherin の分布を変化させ、vimentin 発現を抑制することで、低酸素/照射誘導性 EMT のいずれをも阻害することが示唆された。

LW6、YC-1 のいずれも、低酸素/照射による創傷治癒促進を有意に抑制した ($P < 0.01$)。細胞浸潤アッセイでは、低酸素曝露により遊走細胞数は増加したが、LW6、YC-1 はいずれもこれを阻害した ($P < 0.05$)。

近年、細胞の低酸素応答への MAPKs 経路の関与が報告され、JNK については EMT の関与を示唆する報告がいくつかある。そこで、JNK および p-JNK に対する LW6 の影響を調査したところ、低酸素細胞では p-JNK の発現が著明に増強し、LW6 投与によってこれが抑制された。一方、照射細胞ではこのような p-JNK の発現量の変化は認められなかつ

たが、SP600125 投与で照射誘導性 JNK 発現が抑制された。また、SP600125 は低酸素 / 照射細胞の創傷治癒促進をいずれも阻害した。以上より、LW6 は JNK を阻害することによって、低酸素 / 照射誘導性 EMT を抑制する可能性が示された。

JNK の EMT への関与を調査するため、siRNA にて JNK を抑制した (JNK-knockdown; JNK-KD) 細胞を用いて、EMT マーカーの発現量を評価したところ、JNK-KD 細胞では E-cadherin の発現増強と vimentin の照射による過剰発現の抑制がみられた。

我々は、LW6 が低酸素誘導性 HIF-1 α の発現を抑制することを過去に報告している (Sato et al, Mol Med Rep. 2015.)。これらの結果から、LW6 は HIF-1 と JNK の 2 つの経路を阻害して、低酸素 / 照射誘導性 EMT の抑制に働く可能性が示唆された。

低酸素細胞では HIF-1 が蓄積され、血管新生や細胞浸潤、DNA 修復等に関する遺伝子発現が促進されて細胞の低酸素応答が生じる。これが放射線治療抵抗性獲得にもつながり、臨床上的問題になる。低酸素腫瘍細胞では、E-cadherin の抑制や PI3K/Akt/HIF-1 経路、JNK 経路が EMT 誘導に関与する。我々の実験でも、低酸素曝露により E-cadherin 発現低下や p-JNK 発現増強があり、矛盾しない結果であった。照射誘導性 EMT についての報告はほとんどなく、いまだその機序は明らかにされていないが、今回、照射により E-cadherin の局在の変化や vimentin の発現増強、JNK 発現低下がみられ、これらが EMT 誘発に関与することが示唆された。さらに、LW6 は HIF-1 阻害のみならず、JNK 活性化も阻害することで EMT を抑制している可能性を示した。

我々は今回、LW6 が低酸素 / 照射誘導性 EMT の両方を阻害し、さらにこれには LW6 による HIF-1 阻害と JNK 活性化の抑制が関

与していることを明らかにした。放射線治療と LW6 の組み合わせが、特に放射線治療抵抗性を獲得した低酸素腫瘍に対する新たな治療戦略の一つとなる可能性が考えられた。

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 0 件)

[学会発表](計 1 件)

1. Mariko S. et al. Inhibition of Hypoxia- and Radiation-induced EMT through Blockade on HIF-1 and JNK Phosphorylation by LW6. 15th International Congress of Radiation Research, 2015.

[図書](計 0 件)

[産業財産権]

出願状況(計 0 件)

取得状況(計 0 件)

[その他]

ホームページ等

6 . 研究組織

(1)研究代表者

佐藤 まり子 (SATO, Mariko)

弘前大学・医学部附属病院・助教

研究者番号 : 30645263

(2)研究分担者

なし

(3)連携研究者

なし

(4)研究協力者

高井 良尋 (TAKAI, Yoshihiro)

廣瀬 勝己 (HIROSE, Katsumi)