

令和 4 年 6 月 9 日現在

機関番号：12602
研究種目：基盤研究(C) (一般)
研究期間：2018～2021
課題番号：18K09739
研究課題名(和文) 口腔がんにおける放射線誘導性細胞動態を標的とした新規放射線増感戦略の基盤構築

研究課題名(英文) Establishment of novel radiosensitization targeting radiation-induced cell kinetics in oral cancer cell lines

研究代表者
戒田 篤志(Kaida, Atsushi)
東京医科歯科大学・大学院医歯学総合研究科・助教

研究者番号：40632097
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)：本研究課題では、放射線照射後に生じる細胞周期の変化に着目し、その変化を修飾することで放射線感受性を上昇させ得る薬剤を1000種類以上の機能既知化合物よりスクリーニングし、口腔がんにおける新規放射線増感法の構築を目指した。Fucciと呼ばれる細胞周期可視化システムを導入した口腔癌細胞株を用い、Fucciによる蛍光分布を指標にスクリーニングを行ったところ、25種類の候補化合物が抽出された。さらに候補化合物についてフローサイトメトリーおよびコロニー形成法にて細胞周期および放射線感受性への影響を詳細に検討したところ、1種類の化合物が細胞周期を標的とした放射線増感剤となり得る可能性が示された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

口腔がんに対する放射線治療は、生活の質を維持し得る点からも患者にとって重要な選択肢となり得るが、その治療成績には改善の余地がある。薬剤との併用による放射線増感法の開発は治療成績改善の上で有効な手段と考えられるが、創薬の難しさや新規薬剤による有害事象等のため、その多くが未だ臨床応用に至っていない。本研究課題では、放射線照射により誘導される細胞周期変化を標的とする薬剤を新たに開発するのではなく、すでに臨床応用されている機能既知化合物より抽出したことで新薬開発における多くの障壁を省略することが可能と考えられる。今後、より早期に臨床応用へつなげるためにもメカニズムの解明等、更なる検討が必要である。

研究成果の概要(英文)：We aimed to identify a compound that can increase radiosensitivity by modifying radiation-induced cell cycle kinetics and develop a novel radiosensitization for oral cancer. Imaging-based screening was performed using oral cancer cell lines expressing Fucci that can visualize cell cycle according to fluorescence color and we identified 25 candidates out of more than 1,000 function-known compounds. Moreover, flow-cytometric analysis and colony-formation assay showed that only a compound is a potential radiosensitizer targeting radiation-induced cell cycle kinetics.

研究分野：放射線生物学、腫瘍生物学

キーワード：口腔扁平上皮癌 放射線治療 細胞周期 Fucci 機能既知化合物ライブラリー スクリーニング

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

口腔領域は発語、摂食、嚥下等、生命を維持するための様々な機能を司る重要臓器のひとつである。そうした領域に発生する口腔がんへの主な治療法としては外科療法が第一に挙げられるが、侵襲の程度によっては治療後における生活の質(QOL)が低下することは避けられない。一方、非侵襲的治療法である放射線治療は、外科療法と比較して治療後 QOL を維持することが可能であり、また、近年の放射線治療は、がんに対して放射線を高精度に集約させることでがんへの高線量処方が可能となってきたものの、口腔領域では外科療法を凌駕するエビデンスはまだ得られていない。また、放射線照射後に生じる生物学的現象に対する薬剤を併用することで様々な放射線増感法も考案されてきたが、ほとんどが臨床応用には至っておらず検討の余地が残されている。特に、放射線照射後に生じる DNA 損傷修復機構および細胞周期チェックポイント機構は恰好の標的とされてはいるものの、標的薬剤による重篤な有害事象等が障害となり未だ実用化に至っていない。その一方で、近年の分子標的薬や免疫チェックポイント阻害薬等の活況は、より安全で効果的な放射線増感剤の登場を期待させる状況ではあるが、新薬の開発と応用は、創薬から臨床試験に至るまで越えるべき障壁が多く、実用化への道はかなり険しい。

2. 研究の目的

本研究課題では、未だ臨床において標的となり得ていない細胞周期チェックポイント、特に放射線照射後に G2/M チェックポイントの活性化に伴い生じる G2 アレスト動態に着目し、この G2 アレスト動態を修飾し、なおかつ、口腔がんにおいて放射線増感効果をもたらす薬剤を機能既知化合物より同定すること目的とした。

3. 研究の方法

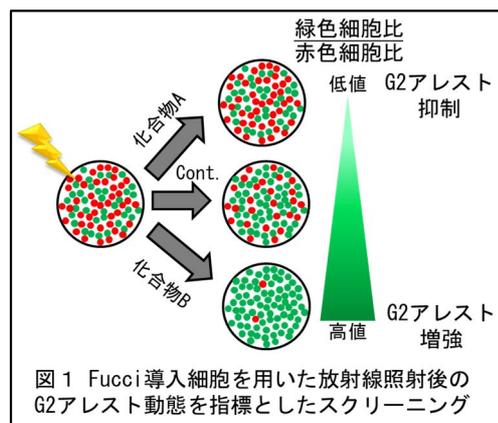
本研究では、放射線照射後の G2 アレスト動態を可視化するために、細胞周期可視化システムである Fluorescent Ubiquitination-based Cell Cycle Indicator (Fucci) を導入したヒト口腔扁平上皮癌 HSC3 細胞を樹立した。化合物ライブラリーとしては、本学にて有する機能既知化合物をライブラリー化したものを用いた。なお、ライブラリー化合物は、各々 FKL00*** としてナンバリングされている。

(1) 放射線照射後に生じる G2 アレスト動態を指標とした機能既知化合物ライブラリーからのスクリーニング(図 1)

Fucci 導入口腔扁平上皮癌細胞株を用い、ArrayScanVT1 により緑色細胞数および赤色細胞数を測定し、G2 アレストの指標として緑色細胞数と赤色細胞数の比(緑色/赤色比)を算出した。通常、放射線照射後、高度に G2 アレストが生じている時間に測定すれば、緑色/赤色比が高値(少なくとも 1 以上) 一方で G2 アレストが解除されている時間に測定すれば、緑色/赤色比は低値(1 以下)を各々示す。機能既知化合物ライブラリーを放射線と併用し、照射後における緑色/赤色比を G2 アレスト動態の指標とし、

- i) G2 アレストがピークとなる時間に測定した際に、緑色/赤色比が有意に低値を示す
- ii) G2 アレストが解除される時間に測定した際に、緑色/赤色比が有意に高値を示す

上記 i), ii) のいずれかに該当する化合物を 1 次候補化合物とした。この際には、各化合物に関して Z-score を算出し、Z-score が 2 以上もしくは -2 以下の化合物を 1 次候補化合物として抽出した。また、化合物単独でも同様の検討を行い、単独処理で緑色/赤色比に有意な変化をもたらす化合物は除外した。



(2) 1 次候補化合物および放射線の併用による細胞周期動態解析

各 1 次候補化合物と放射線を併用し、フローサイトメトリーにより、Fucci の蛍光分布から細胞周期を解析した。

(3) 1 次候補化合物および放射線の併用による細胞生存への影響解析

1 次候補化合物と放射線を併用し、主にコロニー形成法により細胞生存への影響を定量的に解析し、増感効果の有無について検討した。

4. 研究成果

(1) スクリーニングの結果

緑色/赤色比に応じて各化合物の分布をヒストグラムで表したところ、図2 Aのように正規分布を描いた。さらにこの結果から Z-score を算出し、Z-score の値順に並べたところ、図2 B のようなグラフを得た。

本結果をもとに Z-score が 2 以上もしくは -2 以下の化合物を抽出した。この際に細胞数が著しく減少させた化合物、さらに化合物単独でも緑色または赤色細胞を増加させるような化合物は除外したところ、G2 アレストを抑制した Z-score < -2 未満の化合物が 2 種類 (図 2 C)、G2 アレストを著明に起こさせた Z-score > 2 の化合物が 23 種類 (図 2 D)、各々抽出された。

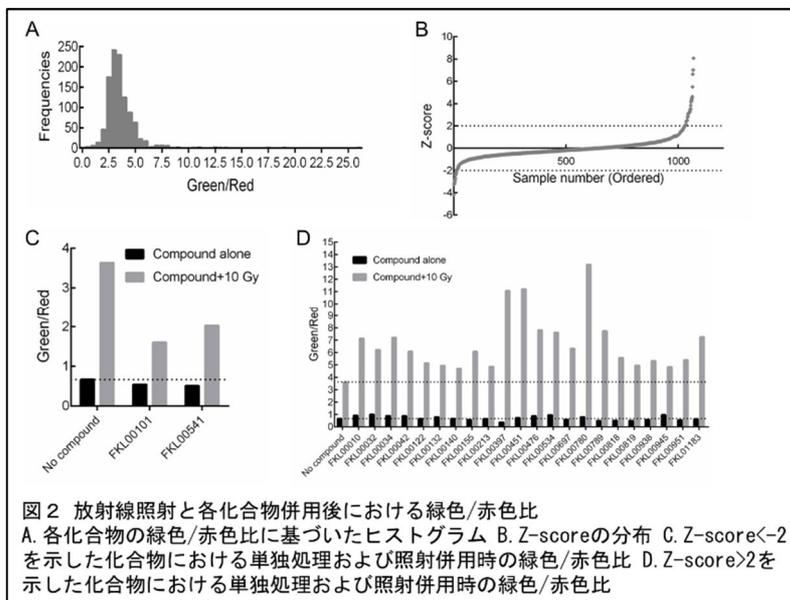


図2 放射線照射と各化合物併用後における緑色/赤色比
A. 各化合物の緑色/赤色比に基づいたヒストグラム B. Z-scoreの分布 C. Z-score < -2 を示した化合物における単独処理および照射併用時の緑色/赤色比 D. Z-score > 2 を示した化合物における単独処理および照射併用時の緑色/赤色比

(2) フローサイトメトリー解析によるスクリーニング結果の検証

Z-score < -2 を示した化合物 2 種類についてフローサイトメトリー解析したところ、FKL00541 がコントロールと比較して、G2 アレストの程度が弱いことが示唆された (図 3)。一方、Z-score > 2 を示した化合物のうち 6 種類について解析したところ、いずれも照射単独に比べて、G2 アレストは増強されており、特に FKL00397、FKL00451 および FKL00780 を併用することで著しく G2 アレストが増強されていた (図 4)。

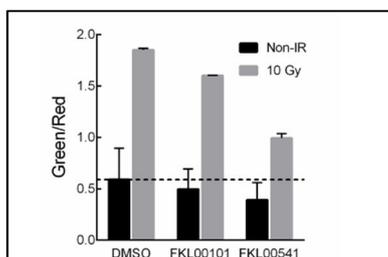


図3 Z-score < -2 を示した化合物による単独処理および照射併用後のフローサイトメトリー解析
左図がFucci蛍光の分布 (縦軸が赤色、横軸が緑色)、右図がフローサイトメトリー解析結果を基に算出された緑色/赤色比を各々示す。

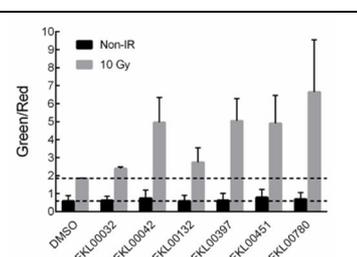


図4 Z-score > 2 を示した化合物による単独処理および照射併用後のフローサイトメトリー解析
左図がFucci蛍光の分布 (縦軸が赤色、横軸が緑色)、右図がフローサイトメトリー解析結果を基に算出された緑色/赤色比を各々示す。

(3) 1次候補化合物併用における放射線感受性への影響

1次候補化合物を併用し、放射線感受性への影響をコロニー形成法により検討したところ、ほとんどの化合物は照射していない状態においても細胞生存率を低下させていた。一方、FKL00397 は、単独処理ではほとんど細胞生存率に影響しなかったが、X線 6 Gy 照射と併用することで、DMSO 処理と比較して、細胞生存率を減弱させる傾向があることが示唆された (図 5)。

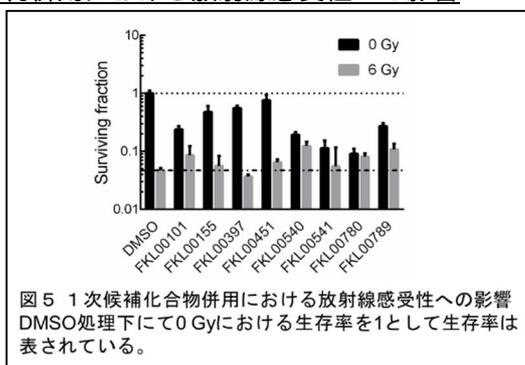


図5 1次候補化合物併用における放射線感受性への影響
DMSO処理下にて0 Gyにおける生存率を1として生存率は表されている。

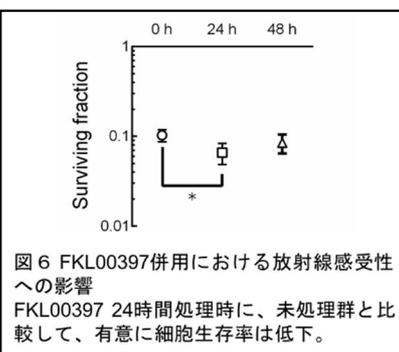


図6 FKL00397併用における放射線感受性への影響
FKL00397 24時間処理時に、未処理群と比較して、有意に細胞生存率は低下。

FKL00397 に焦点を絞り、処理時間による放射線感受性への影響についても検討した。その結果、未処理群と比較して、24 時間処理群は有意に細胞生存率が減弱していたが、48 時間処理群では有意な差は認められなかった (図 6)。

以上の研究結果から、研究をさらに展開するために化合物ライブラリー上における FKL00397 と同等の製品を市販されているものから選択し購入したが、G2 アレストの増強がライブラリー

上の化合物と比較して、弱いことが明らかになっており、この結果からは、化合物ライブラリー上の FKL00397 と市販化合物間において何らかの違いがあることが考えられる。現時点では、純度や構造(異性体の割合)などが検討課題に挙がっているが、まだ結論は得られておらず、検討を進めている段階である。しかしながら、化合物ライブラリー上の FKL00397 と条件が一致さえすれば、本化合物は放射線照射後に誘導される G2 アレストを有意に増強し、それに付随して放射線感受性を上昇させることが示されており、今後、口腔癌における放射線増感剤として有望な候補化合物である可能性が明らかになった。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計5件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 戒田篤志、下野宏晃、三浦雅彦
2. 発表標題 Fucci導入腫瘍細胞を応用した細胞周期依存的放射線感受性の検証
3. 学会等名 第56回日本放射線腫瘍学会生物部会学術大会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 戒田篤志、三浦雅彦
2. 発表標題 放射線照射後の細胞周期動態を指標とした腫瘍再発起源同定の試み
3. 学会等名 日本放射線腫瘍学会第31回学術大会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 戒田篤志、三浦雅彦
2. 発表標題 腫瘍細胞動態を基礎とした放射線照射後の固形腫瘍における再発起源の同定
3. 学会等名 第21回菅原・大西記念癌治療増感研究シンポジウム
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 戒田 篤志, 吉松 康裕, 野島 瞳, 三浦 雅彦
2. 発表標題 増殖ステータスに基づく標識技術を応用した口腔がんにおける放射線照射後の再発起源細胞の同定
3. 学会等名 口腔病学会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 戒田篤志, 三浦雅彦
2. 発表標題 放射線照射後のG2アレスト動態が細胞運命に及ぼす影響
3. 学会等名 日本放射線腫瘍学会第34回学術大会
4. 発表年 2021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
研究協力者	三浦 雅彦 (Miura Masahiko)		

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