

令和 5 年 6 月 25 日現在

機関番号：14301
研究種目：基盤研究(B)（一般）
研究期間：2020～2022
課題番号：20H03621
研究課題名（和文）低酸素誘導性分泌蛋白質の利用による腫瘍低酸素のモニタリングと放射線治療効果の増感

研究課題名（英文）Monitoring Tumor Hypoxia and Sensitizing Radiotherapy Effects by Using Hypoxia-Inducible Secreted Proteins

研究代表者
原田 浩（Harada, Hiroshi）
京都大学・生命科学研究科・教授

研究者番号：80362531
交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 13,600,000円

研究成果の概要（和文）：低酸素環境下でがん細胞は放射線抵抗性を獲得し、患者の予後不良の原因となるため、患者ごとに異なる腫瘍低酸素のモニタリングと腫瘍低酸素を標的とする治療法の確立が希求されている。本研究で我々は、低酸素刺激を受けたがん細胞が分泌するタンパク質としてSPINK1を同定し、その血漿内濃度を指標に腫瘍内低酸素画分をモニターできること、及びSPINK1を阻害することによって放射線増感効果が得られることを見出した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

悪性固形腫瘍（がん）の内部に存在する低酸素環境は、がんの悪性化を引き起こす問題として認識されている。本研究で見出した知見により、血漿内のSPINK1濃度を指標に腫瘍内低酸素画分の多いがん患者を選出し、SPINK1を標的とする治療により放射線治療の効果を増強する、個別化医療の実現に繋がる可能性がある。

研究成果の概要（英文）：Since cancer cells become radioresistant under hypoxic conditions and cause poor patient prognosis, there is a need to monitor tumor hypoxia differently in each patient and to establish therapies that target tumor hypoxia. In this study, we identified SPINK1 as a protein secreted by hypoxia-stimulated cancer cells and found that its plasma concentration can be used to monitor the hypoxic fraction in tumors, and that inhibition of SPINK1 can enhance therapeutic effect of radiation.

研究分野：放射線腫瘍生物学

キーワード：がん 微小環境 低酸素 マーカー 増感

1. 研究開始当初の背景

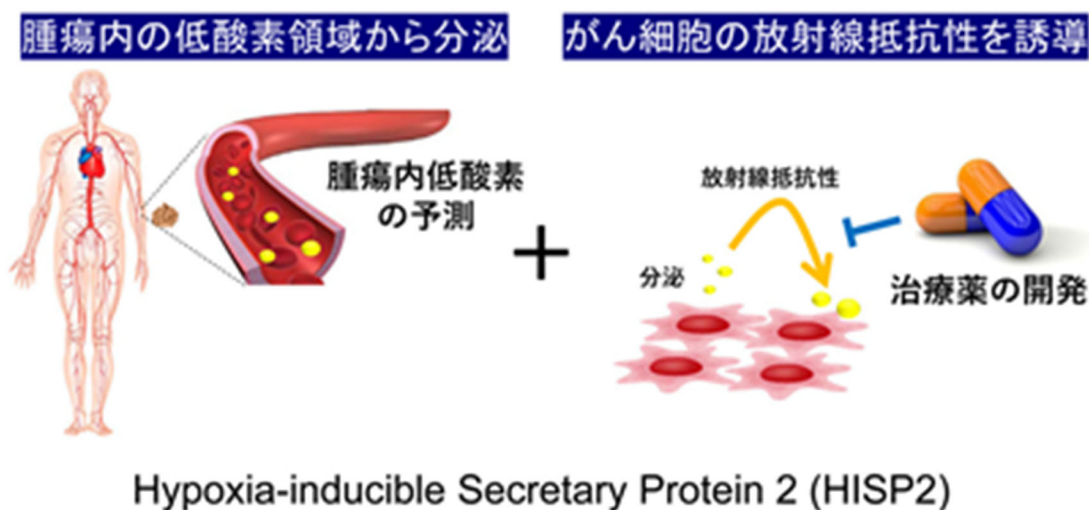
放射線の生物学的効果は、酸素非存在下と比較して酸素存在下で増大する。この「酸素効果」が1912年に初めて指摘され、その後1950年代にThomlinsonとGrayによって「悪性固形腫瘍内に低酸素領域が存在すること」が報告されたのを契機に、低酸素がん細胞の放射線抵抗性を克服することが、放射線腫瘍学領域の課題となった。具体的には、低酸素環境下で酸素アナログとして作用し、放射線治療効果を増強する放射線増感剤の開発が進められてきた。このような状況下で我々は、低酸素がん細胞の局在と動態を時間・空間的に解析するイメージング手法を確立し (Harada et al. Cancer Res. 2002; Harada et al. Mol Imaging. 2015; Harada et al. Oncogene. 2008; Harada et al. J Biol Chem. 2009; Harada et al. Br J Cancer. 2009 など)、低酸素がん細胞が放射線治療を優位に生き残り、酸素・栄養環境の良い血管近傍に浸潤して、がんの再発を直接的に引き起こすというがんの再発機構を解明してきた (Harada et al. Nature Commun. 2012; Zhu et al. Oncogene. 2013)。また、低酸素がん細胞の放射線抵抗性とがんの再発で低酸素誘導性転写因子 (HIF-1) が機能する機序を解明し、さらに HIF-1 を活性化する新規遺伝子を同定するなど、当該研究領域の進展に貢献してきた (Goto et al. Nature Commun. 2015; Zeng et al. Oncogene. 2015; Yeom et al. Oncotarget. 2016; Kobayashi et al. FEBS J. 2017)。がんに対する放射線治療の根治率を向上させるためには、①低酸素がん細胞の量を患者ごとに定量する手法を確立すること、②低酸素がん細胞が放射線抵抗性を獲得する機序を解明すること、③そこで機能する遺伝子の機能を阻害する手法を確立することが必要である。

2. 研究の目的 (Fig. 1)

上述の背景の下、これまでの研究で我々は、「低酸素環境下で発現誘導、そして分泌され、がん細胞の放射線抵抗性を惹起する新規分泌性タンパク質」として SPINK1 を同定した。この独自の知見を基に本研究では以下の目的を設定した。

1. 血中を循環している HISP2 の量を指標に「腫瘍内低酸素の量と腫瘍の放射線抵抗性」を予測する簡便な系を確立する
2. 放射線治療効果を増強する手段として HISP2 を治療標的とする Proof-of-Concept を確認する。

Fig. 1



3. 研究の方法

本研究では、子宮頸がん由来細胞株 HeLa 等のヒト由来がん細胞株を用いて実験を実施した。細胞の低酸素培養には、Ruskinn 社製の低酸素ワークステーションを使用した。mRNA 量を定量する場合には定量的 PCR (qPCR) を、またタンパク質量を定量する場合には Western Blotting と ELISA を実施した。動物実験については、所属機関内で承認を受けたのちに実施した。がん患者由来の検体を使用する研究は、所属機関による倫理審査を経て、承認を受けたのちに実施した。

4. 研究成果

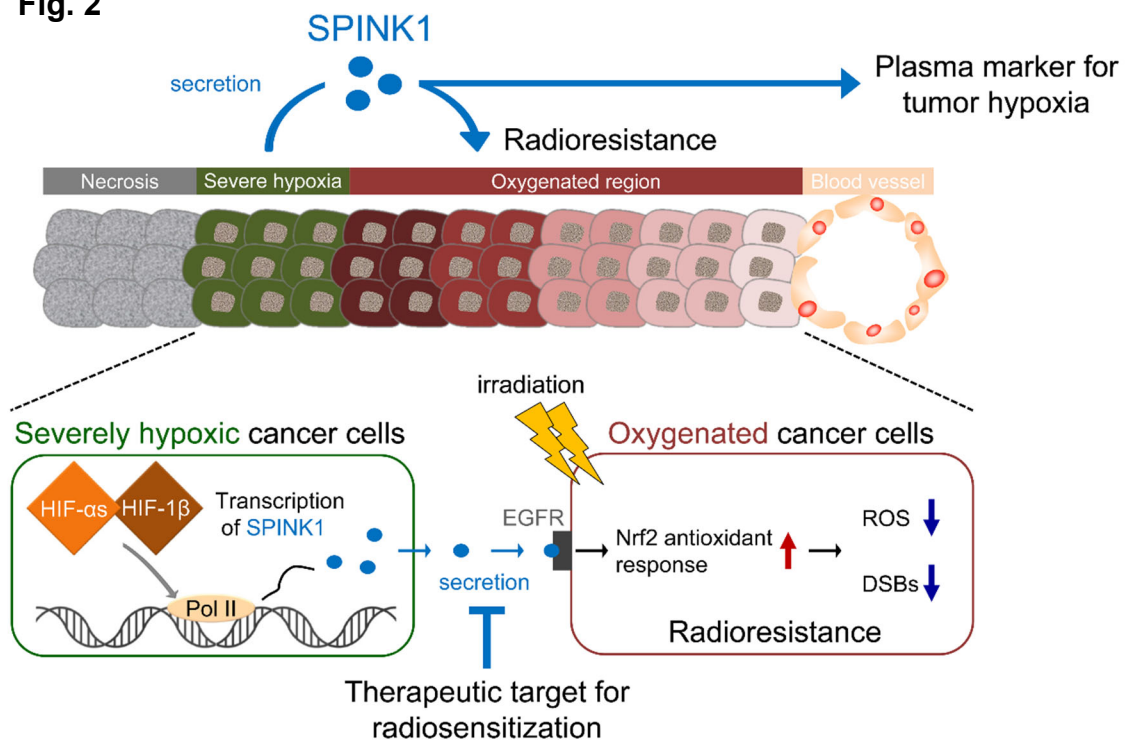
HeLa 等を様々な酸素条件下 (20~0.1%未満) で 24 時間程度培養することにより、SPINK1 の発現が酸素濃度 0.1%未満の重篤な条件下でのみ、hypoxia-inducible factors (HIFs)依存的に、転写開始レベルで誘導されることが見出された。低酸素環境下で新規合成された SPINK1 蛋白質は細胞外に分泌され、培地中に蓄積した SPINK1 蛋白質の量は細胞内の SPINK1 mRNA 量と強く相関した。ヒト由来がん細胞株の皮下異種移植腫瘍内で、SPINK1 は低酸素領域で強く、またその周囲でも僅かに検出され、SPINK1 と内在性低酸素マーカーCA9 の腫瘍内発現量は強い相関を示した。移植腫瘍への酸素供給量を人為的に減少させるとその程度に相関して腫瘍内と血漿中の SPINK1 量が増加した。腎細胞癌の臨床検体では、SPINK1 は腫瘍血管から離れた領域で強く検出されたのに加え、血管近傍でも検出され、低酸素領域から血管内へと拡散する可能性が示唆された。以上の結果から、低酸素領域から血中に分泌された SPINK1 を指標に腫瘍内の低酸素分画を予測できる可能性が示された。

In vitro のコロニー形成試験に於いて、SPINK1 の過剰発現により酸素存在下 (20%や 3% O₂) でも放射線抵抗性が誘導されることが確認された。この放射線抵抗性は培地中に組換え SPINK1 蛋白質を添加することでも誘導されたが、抗 SPINK1 中和抗体の添加により無効化された。また、N 末端のシグナルペプチドを欠失させた非分泌性 SPINK1 変異体の過剰発現では放射線抵抗性は誘導されなかった。以上の結果から、SPINK1 蛋白質がパラクリン的にがん細胞の放射線抵抗性を誘導することが示された。さらに、皮下移植腫瘍を対象にした in vivo 腫瘍増殖試験でも SPINK1 の過剰発現で放射線抵抗性が誘導された。

SPINK1 による放射線抵抗性は、epidermal growth factor receptor (EGFR)の薬理的な阻害により消失した。放射線照射後に 53BP1 や γ H2AX の foci としてモニターされる DNA 二重鎖切断の数も、SPINK1 の過剰発現により有意に減少したが、この効果も EGFR 阻害剤存在下では消失した。また SPINK1 が nuclear factor erythroid 2-related factor 2 (Nrf2)による抗酸化経路を EGFR 依存的に活性化し、放射線照射後の活性酸素種の蓄積を抑制することが確認された。さらに、SPINK1 による放射線抵抗性も Nrf2 阻害剤存在下で消失した結果と合わせ、以上の結果から低酸素がん細胞が分泌した SPINK1 が隣接細胞の EGFR-Nrf2 依存的な放射線抵抗性をパラクリン的に誘導することが示された。

本研究により、SPINK1 が腫瘍内低酸素分画を予測する簡便な血液マーカー、および低酸素がん細胞に起因する放射線抵抗性を克服する治療標的となる可能性が示された (Fig. 2)。

Fig. 2



5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計7件（うち査読付論文 7件/うち国際共著 3件/うちオープンアクセス 6件）

1. 著者名 Koyasu Sho, Horita Shoichiro, Saito Keisuke, Kobayashi Minoru, Ishikita Hiroshi, Chow Christalle CT, Kambe Gouki, Nishikawa Shigeto, Menju Toshi, Morinibu Akiyo, Okochi Yasushi, Tabuchi Yoshiaki, Onodera Yasuhito, Takeda Norihiko, Date Hiroshi, Semenza Gregg L, Hammond Ester M, Harada Hiroshi	4. 巻 24
2. 論文標題 ZBTB2 links p53 deficiency to HIF 1 mediated hypoxia signaling to promote cancer aggressiveness	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 EMBO reports	6. 最初と最後の頁 e54042 1-13
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.15252/embr.202154042	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 該当する
1. 著者名 Suwa T, Kobayashi M, Nam JM, *Harada H.	4. 巻 53
2. 論文標題 Tumor microenvironment and radioresistance.	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Exp Mol Med (NPG)	6. 最初と最後の頁 1029-1035
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1038/s12276-021-00640-9.	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 -
1. 著者名 Shirai Y, Chow CCT, Kambe G, Suwa T, Kobayashi M, Takahashi I, *Harada H, *Nam JM.	4. 巻 13
2. 論文標題 An overview of the recent development of anticancer agents targeting the HIF-1 transcription factor.	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Cancers	6. 最初と最後の頁 2813
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3390/cancers13112813	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 -
1. 著者名 Suwa T, Kobayashi M, Shirai Y, Nam JM, Tabuchi Y, Takeda N, Akamatsu S, Ogawa O, Mizowaki T, Hammond EM, *Harada H.	4. 巻 6
2. 論文標題 SPINK1 as a plasma marker for tumor hypoxia and a therapeutic target for radiosensitization.	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 JCI Insight	6. 最初と最後の頁 e148135
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1172/jci.insight.148135.	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 該当する

1. 著者名 Haitani T, Kobayashi M, Koyasu S, Akamatsu S, Suwa T, Onodera Y, Nam JM, Nguyen PTL, Menju T, Date H, Ogawa O, *Harada H.	4. 巻 528
2. 論文標題 Proteolysis of a histone acetyl reader, ATAD2, induces chemoresistance of cancer cells under severe hypoxia by inhibiting cell cycle progression in S phase.	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Cancer Lett	6. 最初と最後の頁 76-84
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.canlet.2021.12.028.	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 -

1. 著者名 Furukawa S, Nagamatsu A, Neno M, Fujimori A, Kakinuma S, Katsube T, Wang B, Tsuruoka C, Shirai T, Nakamura A, Sakaue-Sawano A, Miyawaki A, Harada H, Kobayashi M, Kobayashi J, Kunieda T, Funayama T, Suzuki M, Miyamoto T, Hidema J, Yoshida Y, Takahashi A	4. 巻 2020
2. 論文標題 Space Radiation Biology for "Living in Space"	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 BioMed Research International	6. 最初と最後の頁 1~25
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1155/2020/4703286	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 該当する

1. 著者名 Yamayoshi Asako, Oyama Shota, Kishimoto Yusuke, Konishi Ryo, Yamamoto Tsuyoshi, Kobori Akio, Harada Hiroshi, Ashihara Eishi, Sugiyama Hiroshi, Murakami Akira	4. 巻 12
2. 論文標題 Development of Antibody?Oligonucleotide Complexes for Targeting Exosomal MicroRNA	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Pharmaceutics	6. 最初と最後の頁 545~545
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3390/pharmaceutics12060545	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17件 (うち招待講演 10件 / うち国際学会 4件)

1. 発表者名 原田浩
2. 発表標題 がん抑制機構と低酸素応答機構をつなぐ新規遺伝子の同定と活用
3. 学会等名 第27回癌治療増感研究会 (招待講演)
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 原田浩、諏訪達也
2. 発表標題 血漿内SPINK1濃度を指標にした腫瘍内低酸素分画のモニタリング
3. 学会等名 第59回JASTRO生物部会学術大会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 原田浩
2. 発表標題 固形腫瘍内の不均一な酸素環境におけるがん細胞の動態と転移
3. 学会等名 第31回 日本がん転移学会学術集会・総会（招待講演）
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 原田浩
2. 発表標題 酸素生物学で迫るがん細胞の素顔
3. 学会等名 名古屋大学大学院創薬科学研究科 第154回創薬科学セミナー（招待講演）
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 Hiroshi HARADA
2. 発表標題 Radioresistance of hypoxic tumor cells; lessons from hypoxia and HIF-1 biology
3. 学会等名 The 5th Asian Congress of Radiation Research（招待講演）（国際学会）
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 諏訪達也、小林稔、白井友香理、武田憲彦、溝脇尚志、原田浩
2. 発表標題 Tumor Hypoxic Fraction (THF)を予測する血漿バイオマーカー-SPINK1
3. 学会等名 がんとハイポキシア研究会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 Hiroshi HARADA
2. 発表標題 Radioresistance of hypoxic tumor cells
3. 学会等名 The 13th isDDRHD-2022 (招待講演) (国際学会)
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 Hiroshi HARADA
2. 発表標題 Hypoxic tumor cells: their dynamics during tumor growth and involvement in recurrence after radiation therapy
3. 学会等名 Sussex-Japan Genome Stability Meeting (招待講演) (国際学会)
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 Gouki KAMBE, Minoru KOBAYASHI, Sho KOYASU, Hiroshi HARADA
2. 発表標題 Crosstalk between cellular hypoxia signaling and DNA damage response mediated by a HIF-1 activator, ZBTB2
3. 学会等名 ATW2023 (国際学会)
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 原田浩
2. 発表標題 酸素生物学と放射線腫瘍学の接点
3. 学会等名 日本量子医科学会第1回学術総会（招待講演）
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 原田浩
2. 発表標題 高線量放射線照射後の腫瘍内酸素環境の変化に基づく分割照射法の再考
3. 学会等名 第34回日本放射線腫瘍学会（招待講演）
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 原田浩
2. 発表標題 HIFシグナルが加速する悪性固形腫瘍内の細胞社会ダイバーシティー
3. 学会等名 第94回日本生化学学会（招待講演）
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 諏訪達也
2. 発表標題 分泌タンパク質 SPINK1 を活用した腫瘍内低酸素のモニタリングと放射線増感
3. 学会等名 低酸素研究会2021
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 原田浩
2. 発表標題 低酸素バイオロジーの視点で見るハイパーサーミアによる放射線増感
3. 学会等名 第38回日本ハイパーサーミア学会（招待講演）
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 Suwa T, Kobayashi M, Shirai Y, Mizowaki T, Harada H
2. 発表標題 Hypoxia-inducible secretory protein 2 (HISP2); a novel marker and therapeutic target for hypoxia
3. 学会等名 JASTRO 2020
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 Shirai Y, Suwa T, Kobayashi M, Harada H
2. 発表標題 Gene expression regulatory mechanism of a novel radioresistance-related gene, HISP2
3. 学会等名 第79回日本癌学会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 白井友香理、諏訪達也、小林稔、原田浩
2. 発表標題 新規低酸素誘導性分泌タンパク質hypoxia-inducible secretory protein2 (HISP2)の発現機構の解析
3. 学会等名 第72回日本細胞生物学会大会
4. 発表年 2020年

〔図書〕 計0件

〔出願〕 計2件

産業財産権の名称 低酸素バイオマーカー及びその利用	発明者 諏訪達也、小林稔、 原田浩	権利者 同左
産業財産権の種類、番号 特許、特願2021-108196	出願年 2021年	国内・外国の別 国内

産業財産権の名称 がんを治療するための医薬組成物	発明者 原田浩、子安翔	権利者 (国) 京都大学
産業財産権の種類、番号 特許、PCT/JP2020/029217	出願年 2020年	国内・外国の別 外国

〔取得〕 計0件

〔その他〕

http://www.rbc.kyoto-u.ac.jp/cancer_biology/

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