

令和 6 年 6 月 10 日現在

機関番号：82502

研究種目：基盤研究(B)（一般）

研究期間：2020～2023

課題番号：20H03633

研究課題名（和文）p53変異型放射線抵抗性がんへの線内用療法による新たな治療戦略の創出

研究課題名（英文）The new strategy for radioresistance in cancer associated with p53 mutation using targeted alpha therapy

研究代表者

坂下 哲哉（Sakashita, Tetsuya）

国立研究開発法人量子科学技術研究開発機構・高崎量子応用研究所 量子バイオ基盤研究部・首席研究員

研究者番号：30311377

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 13,300,000円

研究成果の概要（和文）：p53変異に対する治療効果とメカニズムを明らかにするため、ゲノム編集による細胞株構築、211At-MABG添加条件の検討、殺細胞効果の解析、動物実験を進めた。新規細胞株の構築は、コロニー単離が困難であった。211At-MABG添加条件の検討は、既存の細胞株について実施した。途中、分担研究者を不慮の事故にて失うなど難題に遭遇し、十分な殺細胞効果の解析と動物実験を実施できなかった。しかし、取得可能な試料についてシングルセル解析を実施し、加えて、精密な生存率測定が可能なコロニー形成試験を導入し特殊な生存率曲線を得ることに成功した。最後に、殺細胞効果の解析に必要な既存細胞株の試料を取得できた。

研究成果の学術的意義や社会的意義

p53変異に対する治療効果とメカニズムを明らかにできれば、今後の治療履歴により生ずる可能性がある、がんの線放出RI内用療法への治療抵抗性を克服し、さらに治療効果を高める新たな治療戦略に繋がる可能性がある。

研究成果の概要（英文）：In order to clarify the therapeutic effect and mechanism for p53 mutations, we carried out the following: 1) construction of cell lines by genome editing, 2) examination of 211At-MABG addition conditions, 3) analysis of the cell-killing effect, and 4) animal experiments. When constructing new cell lines, colony isolation was difficult. Examination of 211At-MABG addition conditions was carried out on existing cell lines. We encountered difficulties along the way, such as losing a co-researcher in an accident, and were unable to fully analyze the cytotoxic effect or conduct animal experiments. However, we performed single-cell analysis on samples that could be obtained, and in addition, we introduced a colony formation assay that allows for precise measurement of viability and succeeded in obtaining a special survival-curve. Finally, we were able to obtain samples of existing cell lines necessary for analysis of the cell-killing effect.

研究分野：線量評価、放射線生物学

キーワード：標的アイソトープ治療 p53 アルファ線 悪性褐色細胞腫

## 1. 研究開始当初の背景

### (1) がん抑制遺伝子 p53

がん抑制遺伝子 p53 は、さまざまなストレスで活性化され、多様な機能を持つ遺伝子群を転写誘導する。また、p53 が変異したがんの 7 割以上に観られるヘテロ型の p53+/-ミスセンス変異 (p53 変異) はドミナント・ネガティブ効果を誘導し、がんの悪性化を導く。そのため、p53 遺伝子は、がんの治療標的であり、かつ治療効果を予測する上での重要な分子である。

### (2) α線放出 RI 内用療法 (TAT)

全身にがんが転移した末期がん患者の治療法を開発することは、重要な社会的課題である。末期がんの治療法の 1 つとして、α線を放出するラジオアイソトープ (RI) をドラッグデリバリーによりがん細胞に運び、転移したがんを治療する α線放出 RI 内用療法 (TAT) が注目されている。2016 年に α線を放出する <sup>225</sup>Ac を用いた TAT 薬により、全身転移の難治性前立腺がんの治療成果が報告された。以来、世界中で α線内用療法薬の開発が活況を呈している。しかし、治療履歴による TAT の治療効果の違いなどの課題が報告されている (J Nucl Med, 2018)。また、がん治療を経る中で、p53 変異が生じて放射線治療抵抗性となることが知られている (Cancer Res, 2001)。そのため、治療履歴により生ずるがんの治療抵抗性を克服し、さらに治療効果を高める新たな治療戦略が必要とされている。

### (3) QST 高崎研での TAT の非臨床研究

QST 高崎研では、ノルアドレナリントランスポーター (NET) を高発現するがん (悪性褐色細胞腫等) に集積する TAT 薬 <sup>211</sup>At-MABG (メタアスタトベンジルグアニジン) の研究開発を進めている。悪性褐色細胞腫の p53 野生型 PC12 細胞、及び担がんマウスを用いた実験により、<sup>211</sup>At-MABG の優れた抗腫瘍効果を発見した (Ohshima 他, EJNMMI, 2018)。加えて、全遺伝子発現解析により殺細胞メカニズムとして p53 標的遺伝子の発現誘導が重要であることを見出した (Ohshima 他, Theranostics, 2019)。そこで、本研究により、p53 変異の有無に対応付けられた α線内用療法薬の殺細胞メカニズムを明らかにし、p53 変異型のがんを克服する可能性、あるいは必要な戦略を示すことが重要であると考えた。

## 2. 研究の目的

本研究では、「α線内用療法で p53 変異型の放射線抵抗性がんを克服できる可能性とその分子メカニズムを明らかにし、新たな治療戦略を、具体的な治療標的分子や細胞死誘導経路の知見から創出する」ことを目的とする。

## 3. 研究の方法

本研究の目的を達成するため、申請者らの実績がある①<sup>211</sup>At-MABG が集積する悪性褐色細胞腫由来の細胞株、神経芽腫の細胞株、または p53 変異をゲノム編集により導入する方法による細胞株の構築により、p53 変異の有無に焦点を絞って、②培養、<sup>211</sup>At-MABG 添加条件の検討、③殺細胞効果の解析、④動物実験を実施する。また、⑤本研究を発展させる、または関連する研究としてシングルセル解析、およびコロニー形成試験を実施した。

## 4. 研究成果

### (1) 細胞株の構築

悪性褐色細胞腫由来の p53 変異細胞株の作成については、分担研究者を亡くしたことにより、中断した。p53 欠損ヒト培養細胞に対する NET 遺伝子導入については、ヒト大腸がん細胞 HCT116 に NET 遺伝子を導入し、安定発現株を樹立することを進めた。NET の cDNA を人工合成し、pEGFP-C1 ベクターなどいくつかのベクターへ挿入した。現在、PEI-MAX 発現ベクターを導入し、G418 など選択薬剤存在下で生育可能なコロニーを単クローンとして単離することを進めている。

### (2) 培養、<sup>211</sup>At-MABG 添加条件の検討

既存のヒト神経芽腫由来の細胞株である p53 野生型の SK-N-SH 細胞、および p53 変異型の SK-N-BE(2)c 細胞について、<sup>211</sup>At-MABG の取り込み、保持活性を測定した (図 1)。SK-N-BE(2)c 細胞よりも SK-N-SH 細胞のほうが <sup>211</sup>At-MABG の取り込み活性が高く、保持活性も SK-N-SH 細胞のほうが高く、いずれも %dose の指標にて倍以上の値を示した。

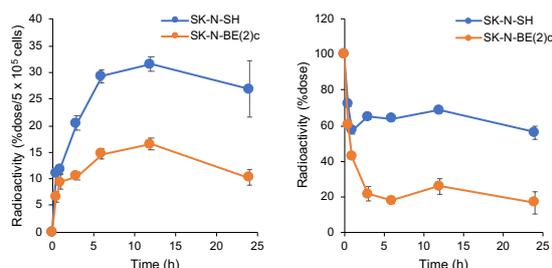


図1 <sup>211</sup>At-MABGの取り込みと排出活性

殺細胞効果を一定の生存率の条件で取得するために、SK-N-SH 細胞、および SK-N-BE (2)c 細胞の  $^{211}\text{At}$ -MABG 処置後の生存率を測定した (図 2)。生存率の測定には、細胞増殖/細胞死を測定する方法の一つで、テトラゾリウム塩である MTT の還元に伴う不溶性ホルマザン色素 (青色) の呈色反応を利用する MTT 法を用いた。SK-N-SH 細胞では、 $^{211}\text{At}$ -MABG の 0.3 kBq/ml の添加により生存率が著しく減少するが、SK-N-BE (2)c 細胞では、同放射能濃度の添加で 80%程度の生存率を示した。1 kBq/ml の添加により SK-N-BE (2)c 細胞は、20%程度の生存率まで減少した。

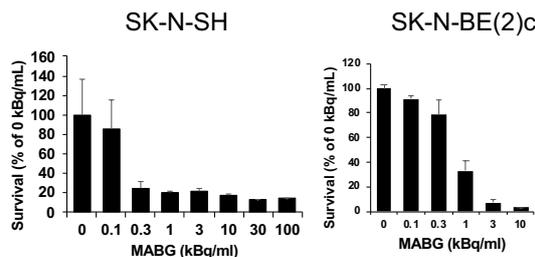


図2  $^{211}\text{At}$ -MABG処置後の生存率測定

### (3) 殺細胞効果の解析

殺細胞効果について全遺伝子発現解析により実施する予定であった。しかし、代表者の采配が悪く、SK-N-SH 細胞、および SK-N-BE (2)c 細胞の  $^{211}\text{At}$ -MABG 処置後の全遺伝子発現解析の試料取得まで実施し、研究期間が終了した。今後、取得した試料については、予算の確保ができ次第、全遺伝子発現解析を実施する予定である。

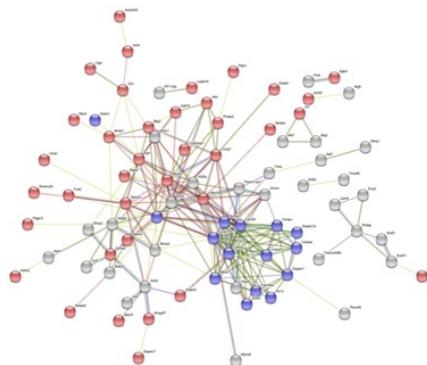


図3 全遺伝子発現の関連遺伝子解析 (動物実験)

### (4) 動物実験

悪性褐色細胞腫由来の細胞株 PC-12 について、担がんマウス動物実験を実施し、全遺伝子発現解析を行なった。発現変動が観られた遺伝子について関連性をストリング解析により実施し、 $^{211}\text{At}$ -MABG 投与により応答する遺伝子の特徴的なネットワークを抽出した (図 3)。

### (5) シングルセル解析、およびコロニー形成試験

シングルセル解析 (1 細胞単位の遺伝子発現解析) を、 $^{211}\text{At}$ -MABG 処置した細胞株 PC-12 について実施した。図 4 の t-SNE プロットが示すように、 $^{211}\text{At}$ -MABG 処置の有無により、細胞毎の応答の特徴的なグループの構成が大きく変化することが示唆された。

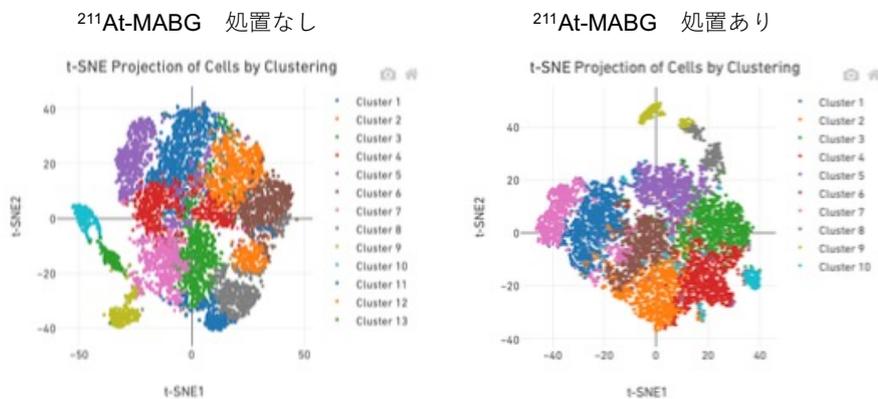


図4  $^{211}\text{At}$ -MABG処置とシングルセルの遺伝子応答

精密な生存率測定が可能なコロニー形成試験を、 $^{211}\text{At}$ -MABG 処置した SK-N-BE (2)c 細胞について実施した。図 5 に示すような特殊な生存率曲線を観察した。 $^{211}\text{At}$ -MABG で処置した SK-N-BE (2)c 細胞の生存率曲線が、外照射のように線量増加に伴い片対数グラフで直線的に減少する生存率曲線ではなく、この直線から上方へと変曲する特殊な生存率曲線になることを見いだした。先行研究の知見等から、特殊な生存率曲線となる理由は、 $^{211}\text{At}$ -MABG の細胞への送達の不均一さに起因すると予想される。今後の検討が必要である。

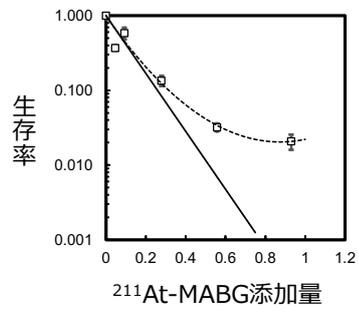


図5  $^{211}\text{At}$ -MABG処置したSK-N-BE(2)c細胞の生存率曲線

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 0件）

1. 著者名 坂下哲哉、横田裕一郎、大島康宏	4. 巻 55
2. 論文標題 線放出核種を用いた RI 内用療法と放射線生物学	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 放射線生物研究	6. 最初と最後の頁 229-247
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） なし	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 -

〔学会発表〕 計3件（うち招待講演 0件/うち国際学会 1件）

1. 発表者名 Yumin HUANG, Tetsuya SAKASHITA, Yasuhiro OHSHIMA, Yoshihisa MATSUMOTO
2. 発表標題 COMPUTATIONAL CELL-DOSE MODEL BUILDING FOR THE STUDY OF TARGETED ALPHA THERAPY
3. 学会等名 Biological Effects and Application of Radiation 2024（国際学会）
4. 発表年 2024年

1. 発表者名 Yumin HUANG, Kaima TSUKADA, Mikio SHIMADA, Yasuhiro OSHIMA, Tetsuya SAKASHITA, Yoshihisa MATSUMOTO
2. 発表標題 Development of HCT116 cell line with norepinephrine transporter expression for the study of meta-211At-astato-beenzylguanidine therapy.
3. 学会等名 日本放射線腫瘍学会第59回生物部会学術大会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 大島 康宏、横田 裕一郎、河野 暢明、渡辺 茂樹、佐々木 一郎、松本 翔二郎、石岡 典子、坂下 哲哉、荒川 和晴
2. 発表標題 MABG処置褐色細胞腫モデルマウス腫瘍の網羅的トランスクリプトーム解析
3. 学会等名 第61回日本核医学会学術総会
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
研究分担者	大島 康宏 (Ohshima Yasuhiro)  (00588676)	国立研究開発法人量子科学技術研究開発機構・高崎量子応用研究所 量子バイオ基盤研究部・主幹研究員  (82502)	
研究分担者	松本 義久 (Matsuoto Yoshihisa)  (20302672)	東京工業大学・科学技術創成研究院・教授  (12608)	
研究分担者	河野 暢明 (Kono Nobuaki)  (90647356)	慶應義塾大学・政策・メディア研究科(藤沢)・特任准教授  (32612)	
研究分担者	有田 隆也 (Arita Ryuya)  (40202759)	名古屋大学・情報学研究科・教授  (13901)	
研究分担者	横田 裕一郎 (Yokota Yuuichiro)  (30391288)	国立研究開発法人量子科学技術研究開発機構・高崎量子応用研究所 放射線生物応用研究部・主幹研究員  (82502)	削除：2021年8月17日

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