

令和 6 年 6 月 6 日現在

機関番号：82606

研究種目：基盤研究(C)（一般）

研究期間：2020～2023

課題番号：20K08074

研究課題名（和文）悪性腫瘍におけるテロメア伸長及び放射線内照射治療への影響に関する研究

研究課題名（英文）Study on Telomere Elongation in Malignant Tumors and its Implications for Radiotherapy: Effects and Considerations

研究代表者

稲木 杏吏（Inaki, Anri）

国立研究開発法人国立がん研究センター・先端医療開発センター・分野長

研究者番号：40645131

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,300,000円

研究成果の概要（和文）：一部の悪性腫瘍で認められるテロメア代替伸長（ALT）の生体内イメージングを行うため、SK-N-F1細胞と報告されていないSK-N-SH細胞を用いた担癌マウスモデルを作製し、各種のテロメア伸長の評価に関する検討を行った。放射線による影響を評価するため、細胞障害性の¹³¹I-β-酪氨酸を放出し、神経芽腫細胞に取り込まれる放射性医薬品である¹³¹I-MIBGを投与後のFlow-FISH法、テロメア長を半定量評価可能なPIPAによるFISH法及びPIPAに¹²⁵Iを標識した化合物によるイメージングを行ったが、テロメア長と投与放射能濃度（腫瘍への照射線量）には有意な関係がみられなかった。

研究成果の学術的意義や社会的意義

テロメア代替伸長（ALT）は、一部の悪性腫瘍で認められるテロメア長維持機構であり、細胞の不死性に強く関わっている。そのため、テロメア長の生体内イメージングは、腫瘍の悪性度、治療効果判定に極めて有用であることが予測され、放射線診断において極めて有用なプローブとなり、これを用いた抗腫瘍薬の開発につながるものと考えられたが、本研究においては開発に至らなかった。

研究成果の概要（英文）：To investigate telomere alternative lengthening (ALT) observed in some malignant tumors, we generated xenograft mouse models using SK-N-F1 cells and unreported SK-N-SH cells for in vivo imaging. Various evaluations of telomere elongation were conducted. To assess the impact of radiation, we administered ¹³¹I-MIBG, a radiopharmaceutical emitting ¹³¹I-particles causing cellular damage and taken up by neuroblastoma cells, followed by Flow-FISH, FISH with semi-quantitative telomere length assessment using PIPA, and imaging with ¹²⁵I-labeled compound via PIPA. However, no significant correlation was observed between telomere length and administered radiation dose (radiation dose to the tumor).

研究分野：放射線医学

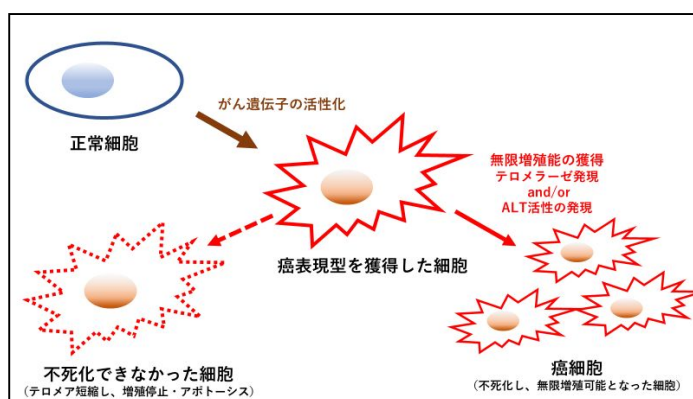
キーワード：核医学治療

1. 研究開始当初の背景

近年の研究において、いくつかの悪性腫瘍では、細胞の寿命に関連するテロメアを伸長するテロメラーゼの遺伝子変異や異常な活性化等により不死化を獲得していること、テロメラーゼの活性やテロメラーゼを介さないテロメアの代替延長 (ALT) が、ある種の悪性腫瘍の悪性化や転移性と関連があることが報告されている。さらに、放射線照射がテロメラーゼ活性及びテロメア長に影響を与えている可能性が報告されている。本研究では、これまでの研究においてテロメアの代替延長による細胞の不死化が示唆されている神経系腫瘍のうち当科で治療経験が豊富な悪性褐色細胞腫及び高リスク群小児神経芽腫について、その代表的な細胞株を用いてテロメア長及びALT活性を評価するとともに、それらの細胞株における放射線感受性とテロメア長・ALT活性の関係性を明らかにすることにより、臨床においてしばしば経験する当該腫瘍の放射線低感受性の要因を科学的に立証し、もって当該腫瘍罹患患者に対する適切な治療戦略の立案に資することを目的とする。

研究代表者を含む研究グループでは、2000年代より、悪性褐色細胞腫、高リスク群神経芽腫患者に対する治療法として、ノルアドレナリン類似物質である 3-iodobenzylguanidine に線放出核種である ^{131}I を結合させた 3-(^{131}I)iodobenzylguanidine (^{131}I -MIBG) による放射線内照射治療を実施し、一定の成果を上げてきたところである (Yoshinaga et al. 2014)。しかしながら、 ^{131}I -MIBG 治療に対する不応性のマーカーとされる *SDHB* 遺伝子変異が治療成果と必ずしも一致しないこと、腫瘍細胞に対して同等の放射線照射が行われたはず複数の症例において、実際の治療効果に相違があることを経験してきた。

これまでの研究において、いくつかの悪性腫瘍では、細胞の寿命に関連するテロメアを伸長するテロメラーゼの遺伝子変異や異常な活性化等により不死化を獲得していること、テロメラーゼの活性やテロメラーゼを介さないテロメアの代替延長 (ALT) が、ある種の悪性腫瘍の悪性化や転移性と関連があることが報告されている。



そうした中で、褐色細胞腫、神経芽腫、神経内分泌腫瘍などの神経系由来の腫瘍においてALT活性が高いこと、またALT活性が褐色細胞腫の悪性化 (= 転移) に関連していること及び神経芽腫における予後不良因子であることが報告された (Dilley and Greenberg 2015; Job et al. 2019)。加えて、放射線照射がテロメア長、テロメラーゼ活性及びALT活性に様々な影響を与えている可能性を示唆する報告もされている (Sishc et al. 2015; De Vitis et al. 2019)。

^{131}I -MIBG 放射線治療による反応性を事前に評価できるならば、その結果を踏まえ、投与量・投与間隔の調整、投与の可否等を事前に検討することが可能であり、その生化学的背景を検討・立証する必要があると考えた。

2. 研究の目的

これまでの研究では、エックス線を細胞外から照射した場合、短期的にはテロメアの短縮、長期的にはALTの活性化が示唆されている。一方、放射線内照射療法では、放射性同位元素を腫瘍

細胞内に取り込ませることにより、持続的にベータ線が照射される。したがって、対象とする悪性腫瘍が ALT 活性を有するならば、総投与量、1 回あたり投与量及び投与間隔を適切に設定することにより、テロメアを短縮しつつ ALT 活性を上昇させないことにより、腫瘍細胞の不死化を解除し、テロメア短縮による細胞分裂を停止させ、アポトーシスを誘導できる可能性がある。

独創性： 神経系腫瘍におけるテロメア長の変化及び ALT 発現については、これまでいくつかの報告があるものの、確立された細胞株において体系的に評価した研究はない。また、テロメラーゼ活性の亢進、ALT 発現等によるテロメア長が維持されている細胞株と維持されていない細胞株に対し、放射線照射（放射線治療）がテロメア長に与える影響や放射線への感受性について検討をしている研究は存在しない。研究代表者はこれらの悪性腫瘍において放射線治療の感受性に差があることを経験的に把握しており、その理論的説明が可能となれば、放射線治療に対する感受性を事前に把握し、患者毎に適切な治療プロトコルを設計することが可能となり、治療成績の向上が強く期待される。

3. 研究の方法

(1) 神経芽腫及び褐色細胞腫の細胞株におけるテロメラーゼ活性及び ALT 活性化の評価

褐色細胞腫の細胞株 PC-12 及び神経芽腫の細胞株 SK-N-SH, SK-N-F1 について、de Vitis らの報告に基づき、テロメア長、テロメラーゼ活性、ALT 活性を評価する (De Vitis et al. 2019)。なお、PC-12 及び SK-N-SH については、これまでの報告により研究代表者らのグループが放射線内照射療法に実際に用いている ^{131}I -MIBG を取り込むことが示されている (Wieland et al. 1979)。SK-N-F1 については ^{131}I -MIBG 取り込みの報告はないものの、研究代表者は既に保有する SK-N-F1 細胞株を用いた ^{131}I -MIBG 取り込み実験にて取り込むことを確認済みである。

(2) 放射線内照射が腫瘍細胞株のテロメア長、テロメラーゼ活性及び ALT 活性に与える影響の評価

上記細胞株を培養した培地に複数の濃度で ^{131}I -MIBG を添加し、テロメア長、テロメラーゼ活性、ALT 活性の経時的变化を観察する。また、細胞増殖曲線を作成し、テロメア長と細胞増殖速度を比較検討する (*in vitro* 実験)。さらに、これらの細胞株をヌードマウスに皮下接種して腫瘍塊を形成させ、 ^{131}I -MIBG を静脈内投与し、組織切片を作成し、腫瘍組織内でのテロメア長、テロメラーゼ活性、ALT 活性を評価するとともに、オートラジオグラフィにより ^{131}I -MIBG の分布を評価する (*in situ* 実験)。必要に応じて、小動物用 PET/SPECT/CT によるイメージングを実施する (*in vivo* 実験)。

(3) 患者試料を用いたテロメア長、テロメラーゼ活性、ALT 活性と放射線治療効果との関連性の評価

研究代表者の所属する医療機関では、すでに悪性褐色細胞腫及び神経芽腫に対する ^{131}I -MIBG 内照射療法の各種臨床研究（特定臨床研究、先進医療 B、企業治験、今年度中には医師主導治験）を実施している。これらの臨床研究の付加的検討として、患者由来の組織、細胞におけるテロメア長、テロメラーゼ活性、ALT 活性を確認し、特に ALT 活性の有無、 ^{131}I -MIBG の病変への集積量、予後について後ろ向き観察研究又は前向き介入研究を実施し、実験系において示されたテロメア長、テロメラーゼ活性、ALT 活性と腫瘍増殖速度、予後との関係性を証明する。

4. 研究成果

In vivo 実験の前実験としての in vitro 試験として、今後作製する in vivo モデル(担癌マウスモデル)において、多様な細胞が存在する中でヒト神経芽腫細胞である SK-N-SH 細胞(以下 SH 細胞)及び SK-N-F1 細胞(以下 F1 細胞)が同定可能であるか検証するため、神経芽腫細胞の CD 分類において広く認められている CD45-CD56+を両細胞系において確認した。ヒト血液細胞と培養した両細胞を混在させ、フローサイトメーターにて測定し、両細胞が CD45-CD56+で分類可能であることを確認した。

次に、テロメア長の半定量法として、F 細胞と SH 細胞のテロメア長を Flow-FISH 法によるフローサイトメトリーで解析した。いずれも CD45-CD56+でゲートを行い、テロメア長が可測であることを確認した。

これらの結果を元に、MIBG 添加培地における SH 細胞及び F1 細胞のテロメア長の変化を確認した。

次に、MIBG 添加培地における SH 細胞及び F1 細胞のテロメア長の変化について、I-131MIBG の放射能濃度を段階的に変化させ、また、腫瘍細胞が死滅しない濃度範囲において、I-131MIBG 添加を複数回行い、テロメア長の変化を観測した。その結果、MIBG 添加後に伸長したテロメア長と放射能濃度及び添加回数には有意な関係はみられなかった。

ヌードマウス(BALB-c nu/nu)に神経芽腫細胞である SH 細胞及び F1 細胞を皮下投与して担癌マウスモデルを作製し、神経芽腫細胞に発現する uptake-1 受容体を介して腫瘍内に取り込まれる I-131MIBG を投与、SPECT/CT により腫瘍への I-131MIBG の取り込みを定量的に評価後、その後抽出し、Flow-FISH 法によりテロメア長の変化を観測したところ、前年度同様にテロメア長と投与放射能濃度(腫瘍への照射線量)には有意な関係がみられなかった。そのため、Flow-FISH 法に代わる方法としてピロール・イミダゾールポリアミド化合物(PIPA)を利用した蛍光プローブを用いたテロメア長の半定量評価を実施したが、Flow-FISH 法と同様に I-131MIBG の投与放射能濃度(腫瘍への照射線量)との間には有意な相関は見られなかった。

一方、in-vivo imaging を企図し、並行して PIPA に RI を標識した RI プローブの作成を試み、PIPA への放射性ハロゲン(I-125)の導入を試みた。I-125 標識 PIPA を担癌マウスモデルに投与し、SPECT/CT によるイメージング及び抽出後のオートラジオグラフィによるイメージングを行った。しかし、in situ 細胞内への取り込みは極めて低く、正常組織と比較した腫瘍内への取り込み量増加は観察できなかった。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計0件

〔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	瀧 淳一 (Taki Junichi) (10251927)	金沢大学・医学系・協力研究員 (13301)	

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