

令和 4 年 6 月 6 日現在

機関番号：32612

研究種目：若手研究

研究期間：2020～2021

課題番号：20K16771

研究課題名(和文) マイトファジーを標的にした膵がん放射線増感方法の新規開発

研究課題名(英文) Development of Radiosensitizer focused of Mitophagy in Pancreatic Cancer

研究代表者

澤田 将史 (SAWADA, Masafumi)

慶應義塾大学・医学部(信濃町)・助教

研究者番号：10824948

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,200,000円

研究成果の概要(和文)：膵癌において、マイトファジーの亢進によりミトコンドリア量の低下や嫌氣的解糖系の亢進が報告されており、それによるミトコンドリア由来の活性酸素種の減少や低酸素が放射線抵抗性の原因の一つである可能性がある。そこでマイトファジーを阻害することで放射線感受性を向上できるのではと考えた。膵癌細胞において、放射線照射によりマイトファジーの亢進が示唆された。しかし、大気圧あるいは低酸素におけるcolony formation法、sphere formation法を行いマイトファジー阻害による放射線増感効果を検討したが、明らかな増感効果を示すことはできなかった。

研究成果の学術的意義や社会的意義

膵がんは予後不良な悪性腫瘍の一つであり、放射線抵抗性であることが知られている。周囲に放射線感受性の高い正常組織が近接しており、物理的な放射線照射技術の進歩をもってしても放射線による局所制御は困難である。

本研究において放射線照射によりマイトファジーが亢進されることが示唆された。近年は放射線治療だけでなく殺細胞性抗がん剤や免疫チェックポイント阻害薬含む広範な抗癌治療の分野においてミトコンドリア活性による治療増強効果が報告されてきており、本研究で得られた知見は今後の放射線治療を含めた集学的治療の発展に寄与する可能性があると考えている。

研究成果の概要(英文)：In pancreatic cancer, it has been reported that mitophagy promote decrease of the amount of mitochondria and enhance of the anaerobic glycolysis system. This causes decrease in reactive oxygen species derived from mitochondria and hypoxia and can be one of the causes of radiation resistance. Therefore, we thought that inhibitor of mitophagy improve the radiosensitivity.

We showed that irradiation acceralates mitophagy in pancreatic cancer cells. The radiosensitizing effect of mitophagy inhibition was examined by performing colony formation assay at normoxia or hypoxia and sphere formation assay, but no clear sensitizing effect could be shown.

研究分野：放射線治療

キーワード：放射線治療 放射線増感作用 ミトコンドリア マイトファジー

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

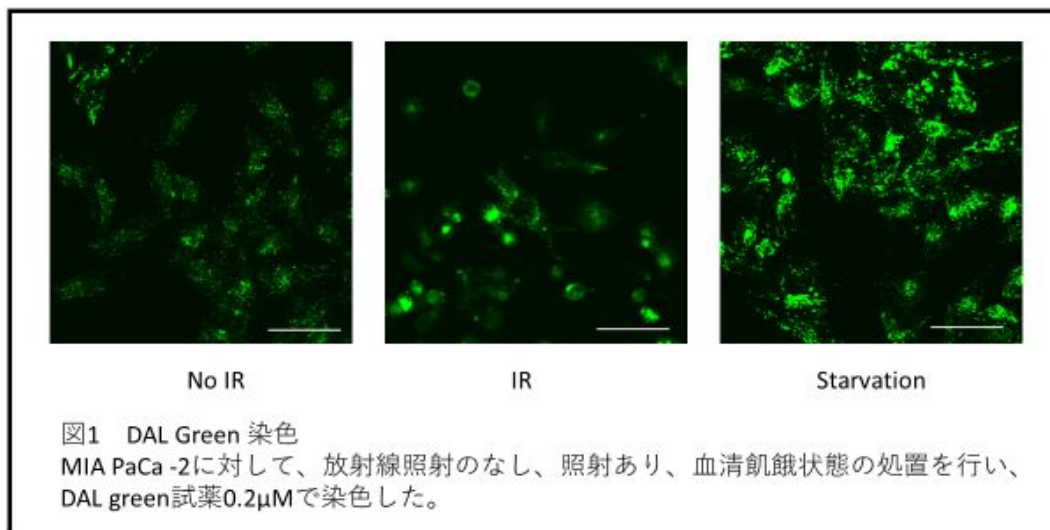
膵がんは予後不良な疾患であり、放射線抵抗性である。局所進行切除不能膵癌を対象とした gemcitabine 単独と gemcitabine + 局所放射線治療を比較したランダム化試験で、奏効率はそれぞれわずか 5%と 6%と (Loehrer PJ Sr et al. 2011)。放射線による局所制御は不十分である。そのため、放射線抵抗性を解除する手法が望まれる。がんは嫌氣的解糖系が亢進する warburg effect を特徴とする。膵がんでは K-Ras 変異が 90%以上で認められ (Almoguera C et al. 1988. Bailey P et al.2016.) K-Ras 変異依存的なマイトファジー亢進によるミトコンドリア量の低下と嫌氣的解糖系の亢進が報告されている (Humpton TJ et al. 2019)。ミトコンドリアは細胞内の活性酸素種 (Reactive Oxygen Species;ROS) の産生源であることからマイトファジーにより ROS の産生が減少すること (Kurihara Y et al. 2012) マイトファジーにより嫌氣的解糖系に代謝がシフトすることでペントースリン酸回路を経由した還元型グルタチオン (GSH) 量が増えることが膵がんの化学療法への抵抗性と関与している可能性が報告されている (Ying H et al. 2012)。放射線照射により細胞内に生じた ROS は DNA の 2 重鎖切断を引き起こすことだけでなく、ミトコンドリア障害を引き起こし遅発的にミトコンドリア由来の ROS を発生させ (Hosoki A et al. 2012.) 細胞死を誘導している。マイトファジーが亢進した膵がんでは、ミトコンドリアの絶対量が少ないので照射によるミトコンドリア由来の ROS の発生が少なく、ROS による細胞死を誘導できないことが照射抵抗性の原因ではないかと考えた。さらに嫌氣的解糖系の亢進により還元型グルタチオン量が多いことも照射の抵抗性の一因と考えた。そこで、マイトファジーを阻害し、ミトコンドリア量を増やすことで照射によるミトコンドリア由来の ROS を大量に発生させ細胞死を誘導できるのではないかと考えた。そこで申請者は、ヒト膵がん細胞株 MIA PaCa-2 にオートファジー/マイトファジーの阻害剤であるクロロキシンと放射線を併用し照射に対する増感効果をコロニー形成法にて検証したところ、クロロキシン併用下での放射線増感効果が示唆された。以上を踏まえて、本研究課題の核心をなす学問的問いは、膵がん細胞のマイトファジーを阻害することで *in vivo* で膵がん細胞の放射線増感効果を得られるかである。

2. 研究の目的

本研究の目的は膵がん細胞の放射線抵抗性をミトコンドリア、特にマイトファジーの亢進から明らかにして、マイトファジーをターゲットとした新規の放射線増感法を開発することである。本研究の学問的独自性は、放射線照射の効果に DNA 切断ではなく、ミトコンドリアに対する効果に着目していることである。照射によるミトコンドリア障害で ROS の増加やエネルギー産生の低下は報告されているが、照射による ROS の増加をマイトファジーに結びつけて報告されたものはこれまでになく、研究の独自性がある。本研究の学問的創造性は、照射抵抗性である膵がん治療において放射線による局所治療を改善しうる薬剤標的を提示しうることである。膵がん細胞においてマイトファジー阻害剤が放射線増感効果を有していれば、膵がんの局所制御において新たな治療戦略を創造しうる。

3. 研究の方法

- (1)放射線照射によりオートファジーが亢進されていることを検出する
- (2)放射線照射によりマイトファジーが亢進されていることを検出する
- (3)*in vitro* にてマイトファジーの阻害による放射線増感効果を検証する



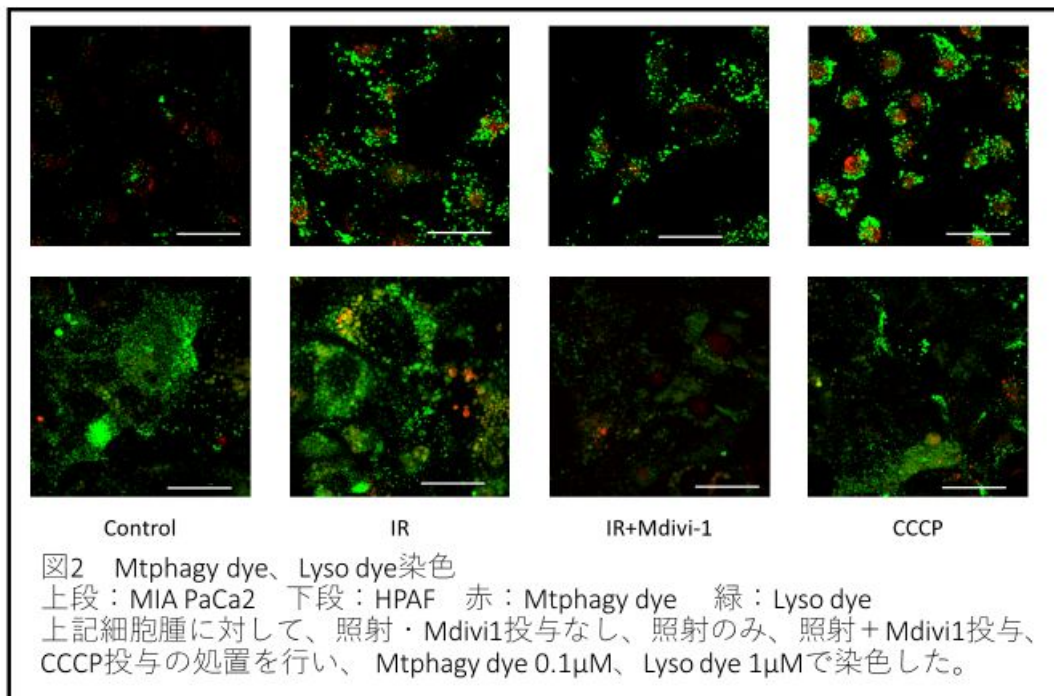
4. 研究成果

(1) 放射線照射によりオートファジーが亢進されていることを検出する

照射によるオートファジー亢進の検出放射線照射によりオートファジーが亢進していることを確認するため、オートリソソームを検出する DAL Green 染色を行った。MIA PaCa2 に対して放射線照射なし、10 Gy の放射線照射、あるいは無血清培地での培養を行い DAL Green にて染色した。(図 1)放射線照射なしと比較し、10Gy の放射線照射を行った細胞では DAL Green の蛍光が増強しており、放射線照射によるオートファジーの亢進が示唆された。

(2)照射によるマイトファジー亢進の検出

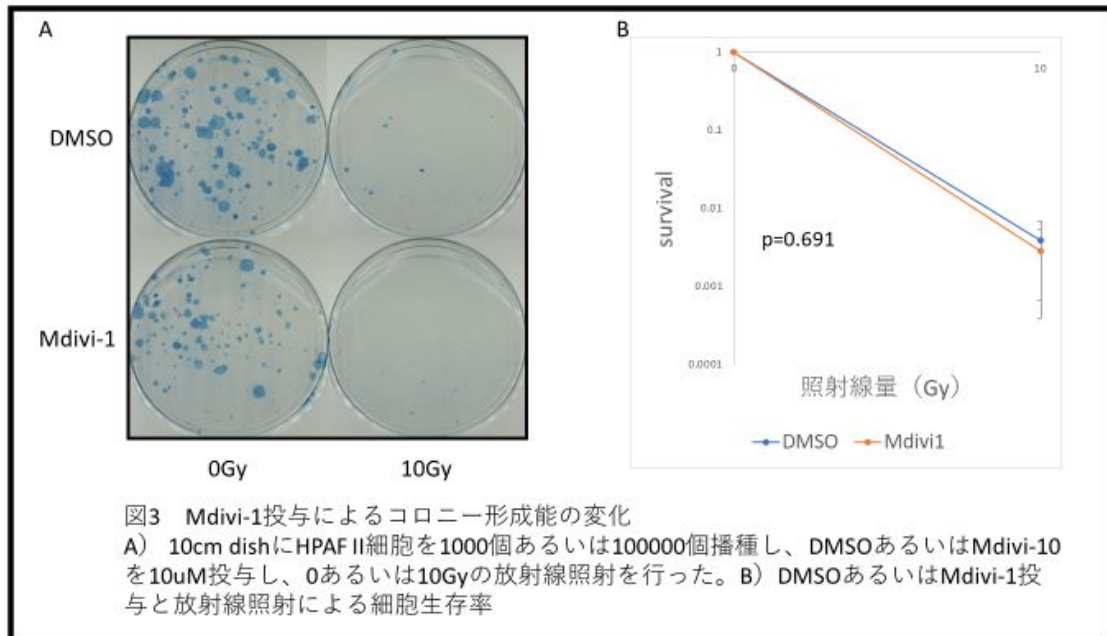
放射線照射によりマイトファジーが亢進していることを確認するため、酸性状態のミトコンドリアにて強い蛍光を呈する Mtphagy dye とリソソームを染色する Lyso dye にて共染色を行った。また、マイトファジーを阻害する Mdivi-1 を投与し照射により亢進したマイトファジーが阻害されているか確認した。(図 2)放射線照射した HPAF II では照射のない場合と比較し、Mtphagy dye により強い蛍光を呈するミトコンドリアの増加、リソソームの増加と一部ではミトコンドリアとの共局在を認められた。放射線照射によるマイトファジーの亢進が示唆された。また放射線照射に加えて Mdivi-1 の投与の有無を比較すると、Mdivi-1 を投与した細胞にて Mtphagy dye の蛍光強度低下を認めており、マイトファジーが阻害されていることが示唆された。MIA PaCa-2 においては放射線照射によりリソソームの増加を認めオートファジーの亢進は示唆されたが、Mtphagy dye の蛍光強度の増強やリソソームとの共局在は明らかでなく、放射線照射によりマイトファジーが亢進しているかは不明であった。



(3) *in vitro* におけるマイトファジーの阻害による放射線増感効果の検証

colony formation 法によるマイトファジー阻害による放射線増感効果の検証

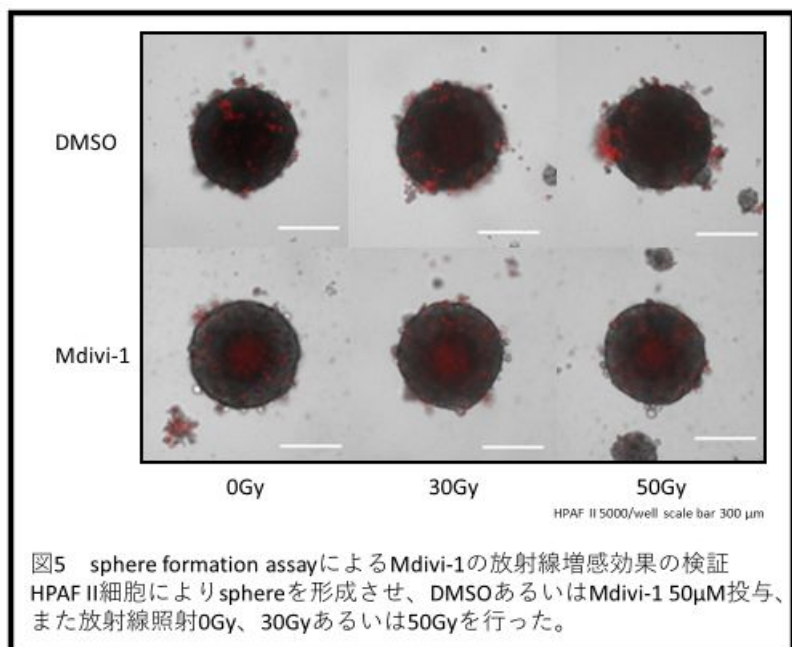
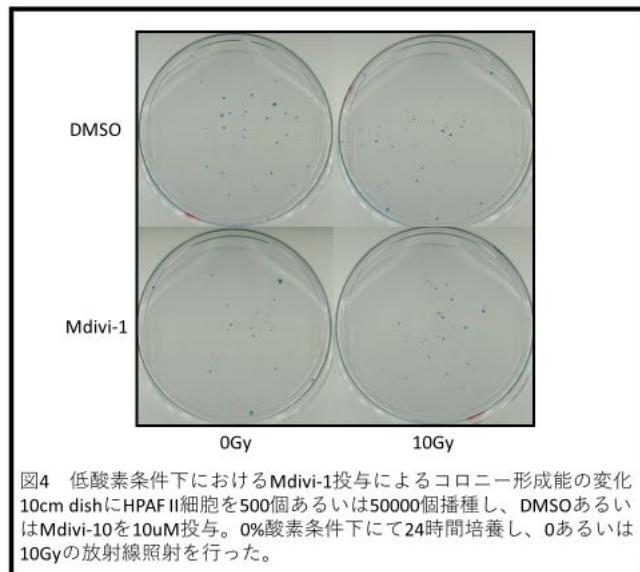
マイトファジー阻害による放射線増感効果を検証するため、HPAF II 細胞腫において DMSO あるいは Mdivi-1 10uM を投与、また放射線照射 0Gy あるいは 10Gy を行い、colony formation 法にて細胞の生存率を測定した。(図 3)DMSO と Mdivi-1 投与による生存率の有意な差は認められず、マイトファジー阻害による増感効果は明らかでなかった。



また膵がん組織における低酸素状態を再現するため、0%酸素条件下において同様に colony formation 法を行った。(図4)同条件下においてもマイトファジー阻害による増感効果は明らかでなかった。

sphere formation 法によるマイトファジー阻害による放射線増感効果の検証

膵がん組織の低栄養・低酸素状態を再現するため、HPAF II 細胞にて sphere を形成し、DMSO あるいは Mdivi-1 50 μ M の投与、その後放射線照射 0Gy、30Gy、50Gy を行った。細胞死を検出するため Propidium Iodide (PI) にて染色し、観察した。(図5) Control と比較し、Mdivi-1 の投与したものでは sphere 中心で PI の強陽性が見られ、中心部での細胞死の増加が示唆された。しかし照射の有無に関わらず PI の染色や sphere のサイズは変わらず、sphere 形成下でのマイトファジー阻害による放射線増感効果は明らかではないと思われた。



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

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