

科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成 24 年 5 月 13 日現在

機関番号：12301

研究種目：若手研究（B）

研究期間：2010～2011

課題番号：22791171

研究課題名（和文）低酸素腫瘍に対するX線と炭素イオン線の感受性と分子生物学的機構に関する基礎的研究

研究課題名（英文）Fundamental research of X-ray and carbon ion beam radiation sensitivity for the treatment of hypoxic tumor cells and investigation of its molecular biological mechanism.

研究代表者

齋藤 淳一（SAITOH JUN-ICHI）

群馬大学・大学院医学系研究科・講師

研究者番号：70572816

研究成果の概要（和文）：低酸素マーカーであるHIF-1 α の阻害剤であるYC-1，一酸化窒素合成酵素阻害薬であるL-NMMAを放射線照射と併用した際の低酸素状況下におけるHIF-1 α の発現と放射線感受性の変化について検討した。HIF-1 α の発現は0.1mmHg以下の低酸素状況下で亢進し，YC-1の投与により正常酸素状況下と同程度に抑制されたが，YC-1併用の有無による放射線照射後の細胞生残率に有意な差は認められなかった。また，低酸素状況下でL-NMMAを投与するとHIF-1 α 発現は有意に抑制されたが，L-NMMA併用の有無による放射線照射後の細胞生残率を評価すると放射線増感効果はみられなかった。

研究成果の概要（英文）：Changes of the expression of hypoxic marker HIF-1 α and radiation sensitivity under hypoxic conditions with HIF-1 α inhibitor were investigated. Hypoxic tumor cells were exposed to radiation with or without HIF-1 α inhibitor YC-1 or nitric oxide synthase inhibitor L-NMMA. The expressions of HIF-1 α under hypoxic conditions (>0.1mmHg) were inhibited with YC-1 or L-NMMA, but radiosensitizing effects with these drugs under acute hypoxic conditions were not observed.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2010年度	1,400,000	420,000	1,820,000
2011年度	1,200,000	360,000	1,560,000
年度			
年度			
年度			
総計	2,600,000	780,000	3,380,000

研究分野：放射線生物学

科研費の分科・細目：内科系臨床医学・放射線科学

キーワード：放射線感受性，低酸素，HIF-1 α ，一酸化窒素

1. 研究開始当初の背景

腫瘍内の低酸素状態を評価することは，放射線治療にとって重要であり，低酸素状態にある細胞は酸素に富む状態に比べ，X線照射

の場合で約2.5～3倍放射線抵抗性であることが知られている。ヒトの固形腫瘍では，腫瘍の増殖の状態に応じて低酸素細胞が不均一に存在し，放射線感受性を低下させる主因

となっていると考えられている。近年の分子生物学的研究では、低酸素は VEGF などの血管新生因子の発現と関係するだけでなく、p53 や bcl-2 などのアポトーシスに関連する分子とも密接な関係をしていることが報告されている。低酸素は放射線に対する抵抗性を誘導するとともに、腫瘍の浸潤や転移といった腫瘍の悪性度と直接関係している可能性も示されている。

本研究の研究代表者（齋藤）は、これまでに、酸素分圧測定や低酸素細胞マーカーを用いた腫瘍内低酸素状態の評価に関する研究成果を発表している。その結果、微小電極をマウスに移植した腫瘍内に刺入して酸素分圧を測定する方法では、腫瘍の大きさが増すと、酸素分圧は有意に低下しており、in vivo で放射線照射を行い、直後に腫瘍を摘出して in vitro でコロニーアッセイ法を行うと、腫瘍容積の増加により明らかに、放射線感受性は低下していた。

群馬大学では、放射線抵抗性難治腫瘍の新たな治療法確立のため、炭素イオン線治療を開始している。X 線に対して抵抗性である低酸素腫瘍は、炭素イオン線の強い殺細胞効果に大きな期待が寄せられている。しかしながら、低酸素腫瘍に対する重粒子線治療の基礎的、臨床的効果に関する研究や、低酸素状態と放射線感受性、低酸素に関連する分子生物学的機序に関しては未知な点も多い。

2. 研究の目的

以上から、低酸素腫瘍に対する放射線治療戦略を作成する上で、(1)低酸素状態に関連する分子生物学的機序の詳細な検討が必要であり、(2)低酸素腫瘍における炭素イオン線の治療効果に関する検討を行い、炭素イオン線治療の臨床応用に向けた至適な生物学的効果の解明に関した検討が必要と考えられる。

具体的には、(1)に関しては、一酸化窒素が細胞死や血管新生に関する生物学的シグナル伝達の内因的な制御因子となることを見つかっており、放射線照射時に一酸化窒素産生の阻害剤を併用することによる放射線感受性の変化や HIF-1 α など既知の低酸素因子の変動に関する検討を行う。

(2)に関しては、酸素濃度を可変できるチェンバー内に腫瘍細胞を設置した状態で放射線照射を行うことにより、酸素濃度と、X 線、炭素イオン線の抗腫瘍効果について比較検討する。

3. 研究の方法

(1)一酸化窒素の生成を阻害することによる低酸素腫瘍細胞における放射線感受性の変化と分子生物学的機序についての検討
肺癌腫瘍細胞をシャーレで培養後

① 様々な酸素濃度の条件下で X 線を照射した後、一酸化窒素合成酵素阻害薬

(NG-Monomethyl-L-arginine, acetate, L-NMMA, 同仁化学)を投与し、線量・細胞生残率曲線やアポトーシスの変化を求め、低酸素条件下における放射線感受性の変化について検討する。

② 同様に様々な酸素濃度の条件下で X 線を照射した後に L-NMMA を投与し、PI3K/Akt/mTOR パスウェイや HIF- α などの低酸素に関連する因子の発現の変化をウェスタンブロット法で検討する。

(2)低酸素腫瘍細胞における炭素イオン線の生物学的効果の検討

低酸素腫瘍に対する放射線 (X 線・炭素イオン線) 感受性について比較検討する。様々な酸素濃度の条件下で X 線・炭素イオン線を照射した後、線量・細胞生残率曲線やアポトーシスの変化を求め、低酸素条件下における炭素イオン線の酸素効果比について検討する。また、上記薬剤併用時における炭素イオン線の感受性の変化についても検討する。

4. 研究成果

放射線照射時に HIF-1 α の阻害剤である YC-1 を併用し、低酸素状況下における HIF-1 α の発現と放射線感受性について検討した。ヒト肺癌腫瘍細胞株 A549 を 0.1 mmHg 以下の低酸素状態に暴露した後、10 μ M の YC-1 併用・非併用時における HIF-1 α の発現についてウェスタンブロットで調査した。また、同様に低酸素状況下に 2 時間暴露した状況で、YC-1 併用・非併用下に A549 に X 線 2, 5, 10 Gy を照射し、コロニー形成法で細胞生残率を評価した。低酸素状況下での HIF-1 α の発現は、正常酸素状況下と比べ亢進し、YC-1 の投与により正常酸素状況下と同程度に抑制された。YC-1 併用および非併用時における、X 線 2, 5, 10 Gy 照射時の細胞生残率は、それぞれ、71%, 63%, 24%, および 79%, 56%, 16% であり、YC-1 の併用の有無による放射線照射後の細胞生残率に有意な差は認められなかった。

また、放射線照射時に一酸化窒素産生の阻害剤を併用することによる放射線感受性の変化を検討した。ヒト肺腺癌細胞株 A549 と H3255 を低酸素チェンバー内で 0.1 mmHg 以下の低酸素状態に暴露した後、5 Gy の X 線を照射し、100 μ M の一酸化窒素合成酵素阻害薬 (NG-Monomethyl-L-arginine, acetate, L-NMMA) を投与し、L-NMMA 併用・非併用時における HIF-1 α の発現の変化を PCR, ウェスタンブロット法で調査した。その結果、いずれの細胞株においても L-NMMA 投与により一酸化窒素の代謝産物である亜硝酸塩の培養液中の濃度は著明に低下し、HIF-1 α 発現は有意に抑制さ

れ、これらの影響はH3255細胞株でより顕著であった。また放射線感受性について、フローサイトメトリーにより評価を行ったところ、放射線照射とL-NMMA投与によりA549ではアポトーシス分画が40%に、H3255では21%に増加したが、コロニー形成法で細胞生残率を評価するとL-NMMA投与による放射線増感効果はみられなかった。

これらの検討から、YC-1、L-NMMA投与によりHIF-1 α の発現は抑制されるが、急性期の低酸素環境下においては、HIF-1 α の発現は放射線感受性に直接的には関与していない可能性が示唆された。

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文] (計 2 件)

1. Oike T, Suzuki Y, Wael S, Mobaraki A, Saitoh J, Torikai K, Shirai K, Nakano T. Suppression of HIF-1 α expression and radiation resistance in acute hypoxic conditions. EXPERIMENTAL AND THERAPEUTIC MEDICINE. 査読有. 3:2012, 141-145.

2. Wael S, Suzuki Y, Mobaraki A, Yoshida Y, Noda S, Saitoh J, Nakano T. Reduction of nitric oxide level enhances the radiosensitivity of hypoxic non-small cell lung cancer. Cancer Science. 査読有. 102: 2011, 2150-2156.

[学会発表] (計 2 件)

1. T. Oike, et al. The Effect of HIF - 1 α on Radioresistance in Acute Hypoxia, In Vitro. ASTRO 53rd Annual Meeting. 2011年10月2日-6日. Miami, Florida (USA).

2. 尾池貴洋, 他. 急性低酸素モデルにおいて HIF-1 α 阻害剤が放射線感受性に与える影響の検討. 日本放射線腫瘍学会第 23 回学術大会. 2010年11月20日. 幕張, 千葉.

6. 研究組織

(1) 研究代表者

齋藤 淳一 (SAITOH JUN-ICHI)
群馬大学・大学院医学系研究科・講師
研究者番号：70572816

(2) 研究分担者

()

研究者番号：

(3) 連携研究者

()

研究者番号：