

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 6 月 3 日現在

機関番号：22101

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2011～2013

課題番号：23591845

研究課題名(和文) フィトケミカルによるヒト腫瘍細胞の放射線増感に関する研究

研究課題名(英文) Radiosensitization of human tumor cells by phytochemicals

研究代表者

窪田 宜夫 (Nobuo, Kubota)

茨城県立医療大学・保健医療学部・教授

研究者番号：20046139

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,100,000円、(間接経費) 1,230,000円

研究成果の概要(和文)：我々はアメリカがん研究協会が、がんと闘う食べ物としてフィトケミカルを公表していることに着目し、フィトケミカルの放射線増感効果について検討してきた。我々はイソチオシアネート類のベンチルイソチオシアネート、そしてハーブ由来のcelastrolがヒト腫瘍細胞の放射線増感効果を有することを見出した。CelastrolはHsp90阻害作用を有することから、Hsp90阻害剤のヒトがん幹細胞様細胞に対する作用について調べた。多くのHsp90阻害剤はヒトがん細胞に比べ、がん幹細胞様細胞に対して大きな殺細胞効果が観察された。これらのHsp90阻害剤は放射線増感効果も観察されており、がん治療薬として期待できる。」

研究成果の概要(英文)： We studied radiosensitizing effects of phytochemicals on human tumor cells. Benzyl isothiocyanate (BITC), one of the common dietary isothiocyanates, sensitized human tumor cells to radiation. Celastrol, a quinone methide triterpene, also enhanced radiosensitivity in a similar fashion in both p53 wild and mutated human lung cancer cells, indicating that the drug effect is p53-independent. Celastrol inhibits Hsp90 chaperone activity by disrupting Hsp90-Cdc37 complex. Thus, we examined the radiosensitizing activity of PU-H71, a purine-scaffold Hsp90 inhibitor. PU-H71 enhanced radiosensitivity of human lung cancer cells and markedly inhibited the repair of DNA double strand breaks. Next, we studied the effect of various Hsp90 inhibitors on cell killing in hepatoma cancer cells (HepG2) and cancer stem like cells (HepG2-8960R). HepG2-8960R cells are far more sensitive to Hsp90 inhibitors than HepG2 cells. These data indicate that Hsp90 is good therapeutic target for carcinoma.

研究分野：内科系臨床医学

科研費の分科・細目：放射線科学

キーワード：フィトケミカル ベンチルイソチオシアネート セラストロール 放射線増感 アポトーシス DNA二本鎖切断修復 Hsp90阻害剤

## 1. 研究開始当初の背景

アメリカ癌研究協会は「がんと闘う食べ物」(Foods that fight cancer)としてフィトケミカル(植物が作り出す化学物質)を公表している。野菜の摂取と健康状態に関する疫学的研究は現在まで多くの研究成果が公表され、癌や虚血性心疾患など様々な疾患リスクの低減が期待され、また通常健康状態に関しても野菜の有用性が示唆されている。これら食品機能の基盤的研究のなかで、最も体系的に進んでいる研究分野として、癌予防研究が挙げられる。

癌の予防には発がん物質の排除と発がん抑制物質の摂取が基本戦略であるが、多数の疫学・動物実験の成果から、野菜や果物などの摂取が、癌予防に有効であると言われている。事実、ある種のフィトケミカルの摂取が多い地域では少ない地域に比べ、発癌リスクが低いと言った研究は、さまざまな癌で報告されている。特に、1990年代に米国で「デザイナーフーズ」計画がスタートしたことをきっかけとしたこれまでの研究は、癌予防ばかりでなく、その他の疾病もターゲットとした食品機能研究の進展に大きく寄与してきた。

近年、新たな癌治療の分子標的として癌細胞の癌化、増殖、生存のシグナル伝達に關与する種々の分子が注目を集め、それらを標的とした新たな抗癌剤の開発・研究が進行中である。細胞の生存と死は、アポトーシス誘導シグナルと生存シグナルとのバランスにより決定されている。相対的にアポトーシス誘導シグナルが増大すると細胞死が引き起こされ、生存シグナルが増大すると細胞の異常な生存につながる事となる。癌細胞の異常増殖・不死化にはアポトーシス誘導シグナルの減少のみでなく、生存シグナルの増大が關与していることが知られている。最近の研究から、細胞の癌化や癌細胞の放射線治療や抗癌剤への抵抗性の獲得には、アポトーシス制御の異常が深く關与していることが明らかにされてきた。

発癌予防に有効であるとされているフィトケミカルについてみると、多くのフィトケミカルが、悪性腫瘍細胞に対して、アポトーシスを誘導する働きを持つことが報告されている。一方、正常細胞に対しては、アポトーシス誘導作用は小さい。このようにフィトケミカルの発癌予防のメカニズムには、癌化へのステップを進行し始めた細胞、あるいは癌化した細胞をアポトーシスにより死へ導くといった過程が重要な役割を果たしていると考えられる。このよう

なフィトケミカルの作用は、発癌予防のみならず、癌治療にも大きな役割を果たすと考えられる。我々はすでに代表的なフィトケミカルであり、癌予防効果が期待されているIsothiocyanateの一種であるスルフォラファンが、ヒト腫瘍細胞に対して放射線増感効果を有していること、そしてその効果はin vivoのヌードマウス移植腫瘍でも観察され、また放射線増感効果の分子メカニズムについて報告した(Int J Cancer 2009; 125(5): 1205-1211)。

## 2. 研究目的

本研究では、様々なフィトケミカルの癌予防効果に着目し、癌細胞の放射線抵抗性を引き起こす分子機構から、放射線感受性を増強するフィトケミカルを見出し、その放射線感受性の増強を引き起こす分子機構について検討する。また、我々は従来より腫瘍細胞内に多量に発現している Heat shock protein 90 (Hsp90)の阻害剤の放射線増感効果について検討を進めてきたが、Hsp90 阻害効果を有するフィトケミカルおよびその他の Hsp90 阻害剤の放射線増感効果についても検討する。

また一方、近年、増殖系の正常組織に幹細胞が存在するのと同様に、がん組織にもがん幹細胞が存在し、治療後のがんの再発・転移に深く關与していることが明らかになってきた。そこで我々はヒトがん細胞とその細胞に繰り返し放射線の継続照射をすることにより得られたがん幹細胞様細胞に対して、フィトケミカルおよび Heat shock protein 90 (Hsp90)阻害剤の殺細胞効果および放射線増感効果について検討し、これらの癌治療への応用の可能性について検討する。

## 3. 研究の方法

### (1) 実験材料

実験にはヒト肺がん由来の SQ-5 細胞、A-549 細胞、またヒト肺がん由来の H1299 細胞に野生型 p53 および変異型 p53 遺伝子を導入した H1299/WT 細胞と H1299/248 細胞、ヒト膵臓がん由来の PANC-1 細胞、MIA PaCa-2 細胞を使用した。また、がん幹細胞様細胞としてヒト神経膠芽腫細胞と肝臓がん細胞に放射線継続照射をすることにより得た細胞を用いた。

### (2) 実験方法

細胞生存率、アポトーシス、免疫組織染色、

Western blot, ノードマウス移植実験は常法によった。

#### 4. 研究成果

我々は、以前の研究でがん予防効果のあることが知られているスルフォラファン(SFN)が、ヒト癌細胞に対して優れた放射線増感効果を有することすでに報告している。SFN はイソチオシアネート(ITC)類に含まれる。ITC類は疫学的研究などから、現在最も癌予防効果の期待される食品成分である。ITC類は特異的な官能基(ITC基: -N=C=S)を有する化合物の総称で、アブラナ科植物に含まれる特徴的な芳香を持つ辛味成分である。

そこで我々は SFN 以外に放射線治療と併用することで、がん細胞の放射線感受性を増強する可能性のある ITC 類について検討した。ITC の発がん抑制には第 相解毒酵素誘導作用のほかに、近年アポトーシス誘導作用を有することも報告されている。このことから、ITC 類の癌治療薬としての可能性が示唆されている。ITC 類には、側鎖の違いにより allyl ITC (AITC)、phenethyl ITC (PITC)、sulforaphane、benzyl ITC (BITC) など多くの類縁体がある。そこで、ヒト膵がん細胞由来の PANC-1 細胞と MIA PaCa-2 細胞でのこれらのイソチオシアネート類の放射線増感効果を調べたが、BITC が最も大きな放射線増感効果を示した。このことから、我々は以前の論文で提唱したように、放射線治療において SFN が放射線増感剤として期待できると思われる。次に別のフィトケミカルである celastrol に関して研究を進めた。Celastrol はタイワンクワソウの根を加工した生薬で、雷公藤の名で知られるトリプトリンであり、関節リウマチなど炎症性疾患の漢方薬とされている。Celastrol はすでにヒト腫瘍細胞に対して放射線増感効果が報告されている。我々はがん抑制遺伝子 p53 の変異の有無による celastrol のヒト腫瘍細胞に対する放射線増感効果について検討した。実験に使用した細胞はヒト肺がん由来の H1299 細胞に野生型 p53 遺伝子を導入した H1299/WT と H1299/248 細胞、そしてヒト肺由来の正常繊維芽細胞の HFL-III 細胞である。Celastrol は H1299/WT と H1299/248 細胞の両方とも放射線感受性を大きく増感し、10%生存率を基準にした増感率は両方の細胞ともほぼ 1.5 ないし 1.6 であった(図 1)。一方、HFL-III 細胞に対しては約 1.2 であった。このことは celastrol はヒト

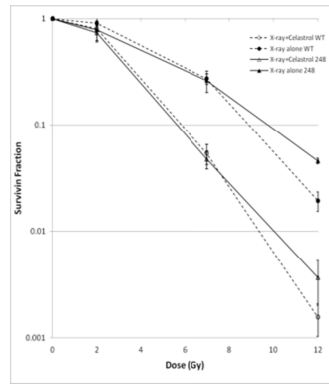


図 1 H1299/WT と H1299/248 細胞に対する celastrol の放射線増感

腫瘍細胞に対しては p53 遺伝子の status によらず放射線感受性を増強し、正常細胞に対しては放射線増感効果は小さかった。

次に放射線照射後の DNA 二重鎖切断(DSB)の修復をガンマーH2AX フォーカスアッセイ法で測定した。放射線照射後のフォーカス数は p53 status によらず照射単独では速やかに減少したが、予め celastrol を投与しておいて照射した場合は、H1299/WT と H1299/248 の両方の細胞とも照射単独に比べてガンマーH2AX が多く残存しており、celastrol が放射線照射後の DSB の修復を阻害し、その結果、celastrol が p53 status によらず、放射線感受性を増強したと考えられる。またヒトの肺がん細胞 SQ-5 をノードマウスに移植した xenograft モデルで celastrol と放射線の併用効果を測定すると、celastrol は in vivo でも放射線増感効果が観察された(図 2)。

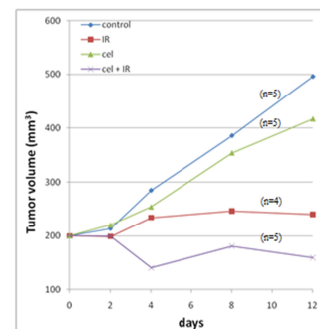


図 2 放射線と celastrol の SQ-5 細胞のノードマウス腫瘍に対する併用効果

Celastrol は、癌細胞に対する殺細胞効果、そして放射線との併用による放射線増感効果は、Heat shock protein 90 (Hsp90) が関与していると考えられる。Celastrol は Hsp90 と Cdc37 の相互作用を阻害することにより、Hsp90 のシャペロン活性を低下させることが知られている。そこで次に新しい Hsp90 阻害剤である PU-H71 の放射線増感効果について、ヒト肺がん細胞を用いて検討した。用いた細胞は SQ-5、A-549、そしてヒト肺由来の HFL-III である。PU-H71 はヒト肺がん細胞に対しては大きな放射線増感効果が観察されたが、ヒト正常細胞では放射線増感効果は極めて限定的であった(図3)。そしてがん細胞に対する放射線増感効果は、PU-H71 が放射線で生じる DNA DSBs の修復を抑制していること(図4)そしてそれには DNA DSBs の修復系の相同組換え修復で中心的役割を担う Rad51 の発現抑制が関与していることを見出した(図5)。

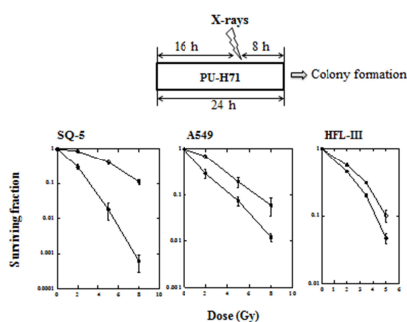


図3 ヒト癌細胞と正常細胞での放射線と PU-H71 の併用効果

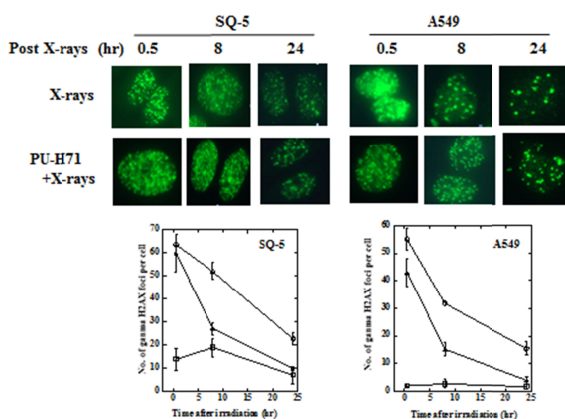


図4 ヒト癌細胞における PU-H71 の放射線による DNA DSBs の修復抑制

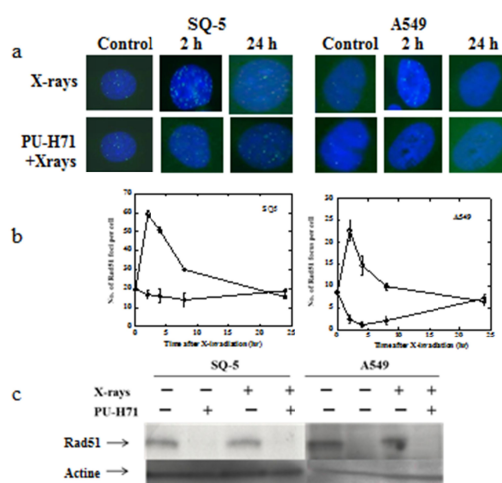


図5 ヒト癌細胞における PU-H71 の放射線による Rad51 フォーカス形成の抑制

一方、近年、増殖系の正常組織に幹細胞が存在するのと同様に、がん組織にもがん幹細胞が存在し、治療後のがんの再発・転移に深く関与していることが明らかになってきた。がん幹細胞は低酸素や酸化ストレスに暴露されても生存する能力が非がん幹細胞より高く、放射線治療に対して耐性獲得が認められる場合が多く、放射線治療により非がん幹細胞を消滅させることができても、がん幹細胞は放射線抵抗性で、生き残る可能性が極めて高い。

そこで我々はヒト肝がん細胞(HepG2)と HepG2 細胞に繰り返し放射線の継続照射をすることによりにより得られたがん幹細胞様細胞(HepG2-8960-R)に対して、フィトケミカルおよび Heat shock protein 90 (Hsp90) 阻害剤の殺細胞効果および放射線増感効果について検討することとした。HepG2-8960-R 細胞は幹細胞のマーカーである CD133 を高発現しており、また HepG2 細胞に比べて非常に放射線抵抗性であるなど、がん幹細胞の性質を有している(図6)。

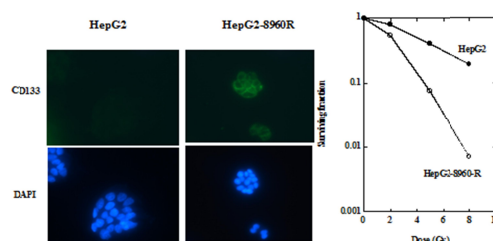


図6 HepG2 細胞と HepG2-8960-R 細胞の CD133 の発現と放射線感受性

その結果、フィトケミカルの一種である Celastrol は癌細胞の放射線増感効果は有するが、がん幹細胞用細胞に対する放射線増感効果は限定的であった。Celastrol は Hsp90 阻害効果が知られているので、その他の Hsp90 阻害剤についても検討した。

その結果、現在、抗がん剤として抗腫瘍効果が検討されている BII021、AUY922、PU-H71 等の Hsp90 阻害剤は、HepG2 細胞に比べてがん幹細胞様細胞の HepG2-8960-R 細胞に対して大きな殺細胞効果が観察された。

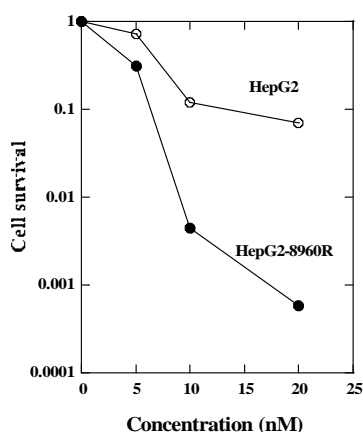


図7 Hsp90 阻害剤 AUY922 に対する HepG2 細胞と HepG2-8960-R 細胞の感受性

ここでは代表的な AUY922 の結果を図7に示す。特に AUY922 は 5nM、10nM といった非常に低濃度において HepG2-8960-R 細胞においては、大きな致死効果をもたらされていることは注目に値する。今後はがん幹細胞に対して Hsp90 阻害剤が大きな致死効果をもたらす分子メカニズムの解明が必要である。また、これらの Hsp90 阻害剤は放射線増感効果があることも見出されており、がん治療薬として大いに期待できると考えている。

## 5. 主な発表論文等

### [雑誌論文] (計6件)

Segawa T, Fujii Y, Tanaka A, Band SI, Okayasu R, Onishi K, Kubota N, Radiosensitization of human lung cancer cells by the novel purine-scaffold Hsp90 inhibitor, PU-H71. *Int J Mol Med* 33, 2014, 559-564 (査読有)

DOI: 10.3892/ijmm.2013.1594

Fujii Y, Yurkon CR, Maeda J, Genet SC, Kubota N, Fujimori A, Mori T, Mauro K, Kato TA, Comparative study of radioresistance between feline cells and human cells. *Radiat Res* 180, 2013, 70-77 (査読有)

DOI: 10.1667/RR3194.1

Fujii Y, Genet MD, Roybal EJ, Kubota N, Okayasu R, Fujimori A, Mori T, Mauro K, Kato TA, Comparison of the bromodeoxyuridine-mediated sensitization effects between low-LET and high-LET ionizing radiation on DNA double-strand breaks, *Oncol Rep* 29, 2013, 2133-2139 (査読有)

DOI: 10.3892/or.2013.2354

Kubota N, Matsumoto Y, Hsp90 inhibitors are promising radiosensitizers for radiotherapy, *Thermal Med* 28, 2012, 53-62 (査読有)

板東真一、窪田宜夫、大西健、植物由来天然整理活性物質フィトケミカルの放射線増感作用、*放射線生物研究*、47, 2012, 46-63 (査読有)

Ohara M, Kimura S, Tanaka A, Onishi K, Okayasu R, Kubota N, Benzylisothiocyanate sensitizes human pancreatic cancer cells to radiation by inducing apoptosis. *Int J Mol Med* 28, 2011, 1043-1047 (査読有)

DOI: 10.3892/ijmm.2011.770

### [学会発表] (計13件)

大西健、窪田宜夫、他、スフェロイドに発現する CD133 陽性細胞の放射線感受性、第 16 回癌治療増感研究シンポジウム、2014 年 2 月 (奈良)

谷敏明、窪田宜夫、他、スフェロイド低酸素微小環境に依存した CD133 発現の可塑的变化、第 11 回がんとハイポキシア研究会、2013 年 12 月 (仙台)

大西健、窪田宜夫、他、グリオブラストーマスフェロイド内低酸素微小環境と CD133 陽性細胞の誘導、第 72 回日本癌学会、2013 年 10 月 (横浜)

大西健、窪田宜夫、他、神経膠芽腫細胞 T98G の単層培養 スフェロイド間で見られる CD133 陽性細胞の可塑的な誘導、第 56 回日本放射線影響学会、2013 年 10 月



(青森)

Yoshihiro Jujii, Nobuo Kubota, et al. Comparative study of radioresistance between feline and human cells,. 第56回日本放射線影響学会、2013年10月(青森)

李恵子、窪田宜夫、他、Hsp90阻害剤と炭素線の併用による細胞致死および転移抑制効果、第56回日本放射線影響学会、2013年10月(青森)

李恵子、窪田宜夫、他、Hsp90阻害剤と放射線の併用による転移抑制効果、第15回癌治療増感研究シンポジウム、2013年2月(奈良)

窪田宜夫、Hsp90をターゲットとした放射線増感、15回癌治療増感研究シンポジウム(招待講演)、2013年2月(奈良)

Yoshihiro Fujii, Nobuo Kubota, et al, Chromosome aberrations of the first responders followed by FUKUSHIMA DAIICHI Nuclear accident. 第55回日本放射線影響学会、2012年9月(仙台)

板東真一、窪田宜夫、他、フラボノイドAに新規に三井田冴えた放射線増感作用の作用機序の解析、第55回日本放射線影響学会、2012年9月(仙台)

窪田宜夫、分子シャペロン Hsp90 をターゲットとする放射線増感、第55回日本放射線影響学会(招待講演)2012年9月(仙台)

瀬川達矢、窪田宜夫、他、新規 Hsp90 阻

害剤 PU-H71 の放射線増感メカニズムについて、第14回癌治療増感研究シンポジウム、2012年2月(奈良)

瀬川達矢、窪田宜夫、他、Hsp90阻害剤 Celastrol のヒト腫瘍細胞の放射線増感と p53 status、第24回日本放射線腫瘍学会、2011年11月(神戸)

[その他

ホームページ等

<http://www.ipu.ac.jp/>

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

窪田 宜夫 (KUBOTA, Nobuo)  
茨城県立医療大学・保健医療学部・  
名誉教授  
研究者番号：20046139

### (2) 研究協力者

大西健 (OHNISHI Ken)  
茨城県立医療大学・保健医療学部・  
教授  
研究者番号：50152195

### (3) 藤井義大 (FUJII Yoshihiro)

茨城県立医療大学・保健医療学部・  
助教  
研究者番号：20637540