

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 6 月 6 日現在

機関番号：11101

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2012～2015

課題番号：24591831

研究課題名(和文) 癌転移防止を目指した4-メチルウンベリフェロン併用放射線治療の研究

研究課題名(英文) The study of anti-tumor with anti-metastasis under combination of 4-methylumbelliferone on X-irradiation against cancer cell

研究代表者

細川 洋一郎 (Hosokawa, Yoichiro)

弘前大学・保健学研究科・教授

研究者番号：70173599

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)：放射線治療は癌に対して有効な治療法であるが、放射線治療単独では、遠隔転移を防止することはできない。そこで、ヒアルロン酸合成阻害剤である4-メチルウンベリフェロン(以下MU)を併用し、遠隔転移を減少させる治療開発を目的として、本研究を行った。その結果、放射線単独に比較してMUを併用すると、腫瘍細胞が減少し、腫瘍細胞の浸潤ならびに転移の能力が低下した。従って、放射線治療における遠隔転移の抑制剤としてMUの臨床応用が期待される。

研究成果の概要(英文)：Radiotherapy is generally effective against cancer, however distant metastasis cannot be controlled by radiotherapy alone. Our experiments are studied to develop new radiotherapy combined with 4-Methylumbelliferone (MU) in order to prevent metastasis of cancer cells. On this study, the treatment of radiation combined with MU showed anti-cancer and anti-metastatic effects compared with radiation alone. MU is hoped to apply in a clinical setting as anti-metastatic drug on radiotherapy.

研究分野：放射線腫瘍生物学

キーワード：4-メチルウンベリフェロン 放射線治療 転移

1. 研究開始当初の背景

癌治療において、克服されていない課題の一つに、癌転移を制御できないという問題がある。放射線治療は手術に比較して、機能的、審美的に優れるが、一部の報告では、照射が癌細胞の HIF、VEGF、MMP を発現し、転移を増加させるとする研究結果が散見される (Monk, 2010)。放射線治療は多くの腫瘍細胞を殺傷するのも事実であるから、これら一部の結果のみにより、放射線治療の優位性が失われるものではないが、予後不良因子として無視することはできない。

一方、癌組織にヒアルロン酸が豊富なことから、癌細胞が浸潤、転移していく過程においてヒアルロン酸が重要な役割を演じているらしいことが知られていた。最近の研究では癌細胞は線維芽細胞につくらせたヒアルロン酸をあたかも道しるべのようにして、CD44 を介してヒアルロン酸に結合しながら組織に潜り込み、浸潤していくと考えられる (Piorowicz et al., 2011)。したがって、癌組織のヒアルロン酸合成を抑えるか、あるいはアルロン酸を除去することができれば、癌の浸潤阻止が可能になる。4 - メチルウンベリフェロン (以下 MU) にはヒアルロン酸合成阻害があり、MMP-9 を抑制するなど、細胞外マトリクスに多機能的に作用することが示されている (Kuwabara et al., 2011)。癌細胞との関係では、Kudo らは *in vitro* 実験で MU を投与すると melanoma 細胞の浸潤能ならびに接着能が低下していることを、Yoshihara らは MU が癌の増殖や転移を効果的に抑制することを動物実験で明らかにした (Kudo et al., 2004, Yoshihara et al., 2005)。以上の背景から MU を放射線治療に併用することにより、癌の浸潤ならびに転移を防止する新しい放射線治療が期待できる。

2. 研究の目的

MU を放射線と併用し、癌細胞の浸潤ならびに転移を防止する、放射線治療の実現を目指し研究することを目的とした。

3. 研究の方法

(1) 試薬

ヒアルロン酸合成阻害剤である MU (Nacarai Tesque) は dimethylsulfoxide (以下 DMSO) に溶解させ使用した。

(2) 培養細胞

ヒト線維肉腫細胞 HT1080 を使用した。細胞は、非働化した仔牛血清 (Sigma) を 10% 含む RPMI1640 培地 (Sigma) で、37 °C、5% CO₂ 環境で培養した。細胞を以下の 4 群に分け実験を行った。

DMSO 単独処理群 (MU の溶媒コントロールとして)

100 μM MU 単独処理群

2 Gy X 線照射群

2 Gy X 線照射及び MU 投与併用群

実験では、2 Gy X 線照射及び MU 処理から 24 時間後に回収した細胞及び培養上清を使用した。

(3) X 線照射 (以下照射)

MBR-1520R-3 (Hitachi Medical) を使用し、管電圧 120kVp、管電流 20 mA、距離 450 mm、線量率 1Gy/min で 2 Gy を培養細胞に照射した。

(4) 細胞死解析

細胞のクローン原性をコロニー形成アッセイで評価した。それぞれ適切な細胞数を播種し、8-10 日間培養後、コロニーをメタノール (Wako) で固定してからギムザ (Wako) で染色しコロニー数を計測した。また、それぞれの培養細胞に対し、Annexin V 及び propidium iodide (PI) 染色キット (Biolegend; Tomy Digital Biology) を使用し、アポトーシス細胞を測定した。細胞周期分配は Hoechst 33342 染色を用いて測定した。蛍光データはフローサイトメトリー (Cell Lab Quanta™ Sc MPL; Beckman Coulter) を用いて収集と解析を行った。

(5) 浸潤能解析

細胞の浸潤能を BioCoat Matrigel invasion chamber (BD Biosciences) を用いて評価した。チャンパーに細胞を播種してから 24 時間後に浸潤した細胞を Diff-Quick 染色キット (Dade Behring) で染色し測定した。また、浸潤に関わる因子として知られているヒアルロン酸及び MMP-2、-9 の培養上清中の濃度をそれぞれ、ヒアルロン酸定量用キット (R&D Systems) 及びゼラチンゼイモグラフィ (COSMO BIO) を用いて測定した。

(6) 統計処理

有意差は、Tukey-Kramer 検定を使用し、 P 値 < 0.05 を統計的に有意差有りとして判定した。

4. 研究成果

(1) 照射及び MU 処理後の細胞生存率

DMSO 濃度 0.1% の培養液を用いて培養した HT1080 及び正常の線維芽細胞である WI38 の生存率は、DMSO 非添加の生存率とほとんど変わらなかった。よって、DMSO 単独投与をコントロールとした。また、MU 濃度による細胞毒性を検証するために 0-1000 μM まで濃度を変化させ、コロニー形成アッセイを行った。WI38 の生存率は 100 μM で非添加と変わらなかった一方で、HT1080 の生存率は約 30% まで減少し、MU の腫瘍特異的な細胞毒性効果が明らかとなった (図 1A)。よって、最低有効濃度である 100 μM を 2 Gy 照射と併用する際の濃度として決定した。2 Gy 照射と MU 投与を併用した際のクローン原性は、2 Gy 照射単独と比較して約半分まで減少した (図 1B)。これらの結果から、2

Gy 照射と MU を併用することは、癌治療において有効であることが示唆された。

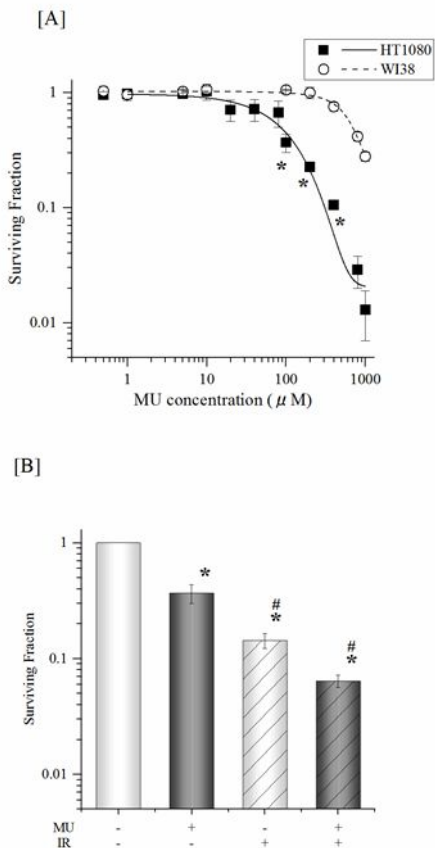


図 1 クローン原性能アッセイ。* $P < 0.01$ vs. control, # $P < 0.01$ vs. MU。

クローン原性能の減少が細胞死または細胞周期停止によって引き起こされているのかを明らかにするために、アポトーシスのマーカー及び細胞周期分配を検証した。2 Gy 照射と MU 併用において annexin-V (+) PI(+)細胞は、コントロールと比較して有意に増加したのに対し、細胞周期の G2/M 期では有意な変動がみられなかった(図 2A、B)。以上のことから、2 Gy 照射と MU 併用でのクローン原性能の減少は、アポトーシスの誘導によることが示唆された。

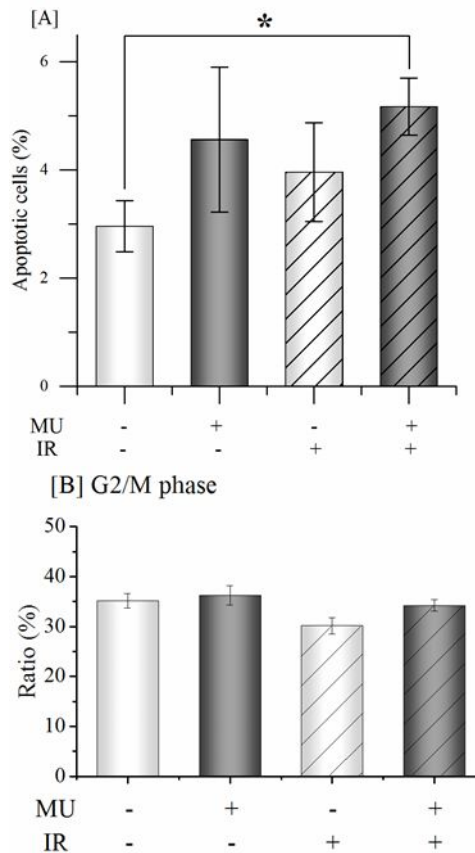


図 2 細胞死解析。* $P < 0.01$ 。

(2)細胞浸潤能の解析

細胞の浸潤能を定量的に評価するため浸潤アッセイを行った。2 Gy 照射と MU を併用するとコントロールと比較して半分以下まで減少した(図 3)。2 Gy 照射と MU を併用した際の細胞外環境への影響の評価として培養上清中のヒアルロン酸濃度を測定した。MU または 2 Gy 照射単独処理ではコントロールと同様の濃度だった一方で、照射と MU を併用すると 70%まで有意に減少した(図 4)。さらに、浸潤促進因子である MMP-2 及び-9 の培養上清中の濃度は MU 単独または 2 Gy 照射併用で顕著に減少した(図 5A、B)。

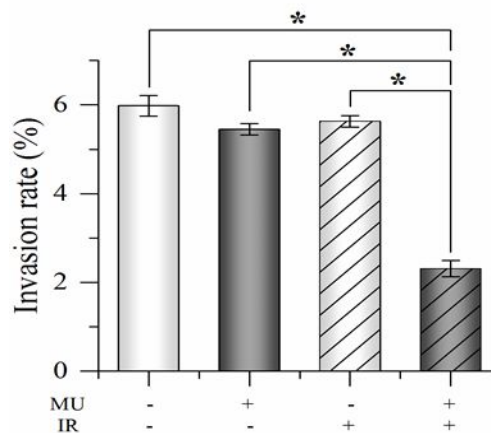


図 3 細胞浸潤能解析。* $P < 0.01$ 。

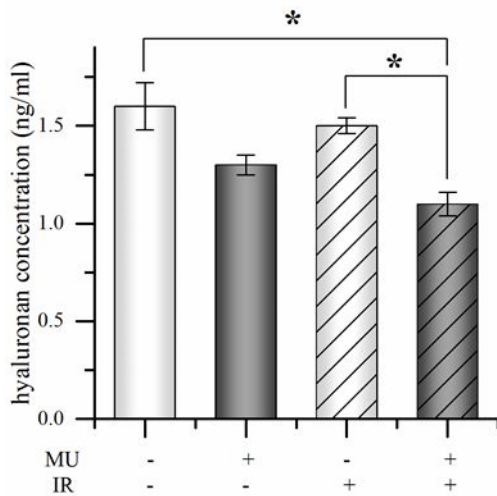


図4 ヒアルロン酸濃度定量。* $P < 0.01$ 。

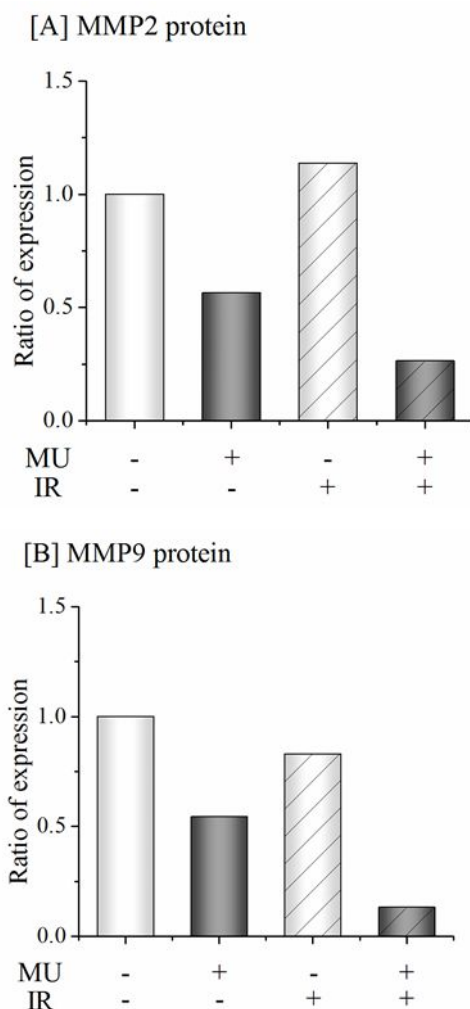


図5 MMP-2 及び-9 の発現解析。

(3)結論

本 in vitro 研究より、2 Gy 照射と MU の併用による HT1080 細胞への抗腫瘍ならびに抗浸潤効果が確認できた。これらの結果から、放射線治療中の癌の遠隔転移を阻害する新たな治療戦略として、放射線と MU の併用が有効であることが示された。

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5件)

Monzen S, Chiba M, Hosokawa Y. Genetic network profiles associated with established resistance to ionizing radiation in acute promyelocytic leukemia cells and their extracellular vesicles. *Oncol Rep*. 査読あり 2016 Feb; 35(2): 749-56. doi: 10.3892/or. 2015. 4471. Epub 2015 Dec 2.

Hosokawa Y, Monzen S, Yoshino H, Terashima S, Nakano M, Toshima K, Saga R, Kashiwakura I. Effects of X-ray irradiation in combination with ascorbic acid on tumor control. *Mol Med Rep*. 査読あり 2015 Oct; 12(4): 5449-54. doi: 10.3892/mmr.2015.4108. Epub 2015 Jul 22.

Terashima S, Hosokawa Y, Yoshino H, Yamaguchi M, Nakamura T. Effect of ascorbic acid and X-irradiation on HL-60 human leukemia cells: the kinetics of reactive oxygen species. *Oncol Rep*. 査読あり 2013 Dec; 30(6):2 653-8. doi:10.3892/or.2013.2758. Epub 2013 Oct 1.

Hosokawa Y, Okumura K, Terashima S, Sakakura Y. Radiation protective effect of hypoxia-inducible factor-1 α (HIF-1 α) on human oral squamous cell carcinoma cell lines. *Radiat Prot Dosimetry*. 査読あり 2012 Nov; 152(1-3): 159-63. doi: 10. 1093/ rpd/ ncs215. Epub 2012 Aug 26.

Chai H, Hazawa M, Hosokawa Y, Igarashi J, Suga H, Kashiwakura I. Novel Acridine - Based N - Acyl - homoserine Lactone Analogs Induce Endoreduplication in the Human Oral Squamous Carcinoma Cell Line SAS. *Biol Pharm Bull*. 査読あり 2012; 35(8): 1257-63.

[学会発表](計9件)

Hosokawa Y, Monzen S, Terashima S, Yoshino H, Mariya Y. Effect of X-ray irradiation in combination with ascorbic acid against malignant cell lines. 日本放射線腫瘍学会第28回大会, ペイシア文化ホール(群馬県前橋市) 2015年11月19日

嵯峨 涼, 門前 暁, 細川 洋一郎. ヒト前立腺癌細胞に対する 4-methylumbelliferone の放射線増感効果. 放射線影響学会ワークショップ, 富山大学五福キャンパス黒田講堂(富山県富山市)2015年10月17日

門前 暁, 細川 洋一郎, 嵯峨 涼, 千

葉 満. 4-メチルウンベリフェロンを併用したがん放射線療法の基礎的検討. 第25回日本サイトメトリー学会学術集会, お茶の水ソラシティーカンファレンス (東京都千代田区) 2015年7月12日
Ryo Saga, Satoru Monzen, Hironori Yoshino, Mitsuru Chiba, Toshiya Nakamura, Yoichiro Hosokawa. Effect of 4-methylumbelliferone and irradiation Combination of Factors Related to A Variety of Invasion and metastasis. 15th International Congress of Radiation Research, Kyoto International Conference Center (Kyoto, Japan) 27th May, 2015.
Monzen S, Saga R, Chiba M, Hosokawa Y. Acquisition of resistance to ionizing radiation in acute promyelocytic leukemia cells occurs via modifications of several mRNA expression networks. International Journal of Molecular Medicine. 19th World Congress on Advances in Oncology and 17th International Symposium on Molecular Medicine, Metropolitan Hotel, (Athens, Greece) 10th October, 2014.
Ryo Saga, Satoru Monzen, Hironori Yoshino, Mitsuru Chiba, Toshiya Nakamura, Yoichiro Hosokawa. Inhibition of malignant tumor metastasis by 4-methylumbelliferone on X-irradiation. 19th World Congress on Advances in Oncology and 17th International Symposium on Molecular Medicine, Metropolitan Hotel, (Athens, Greece) 10th October, 2014.
門前 暁, 細川 洋一郎, 嵯峨 涼, 千葉 満. 4-メチルウンベリフェロンを併用したがん放射線療法の基礎的検討. 第24回日本サイトメトリー学会学術集会, 関西医科大学加多乃講堂 (大阪府枚方市) 2014年6月29日
Yui Inoue, Shingo Terashima, Yoichiro Hosokawa. Cytotoxic effects of hyper-radiation sensitivity by low dose multiple exposures. 5th International Symposium on Radiation Emergency Medicine, Hirosaki University (青森県弘前市) 2013年10月13日.
Ryo Saga, Yoichiro Hosokawa, Hironori Yoshino, Shingo Terashima, Toshiya Nakamura. 4-methylumbelliferone's addition against human fibrosarcoma cells and the effect of radiation concomitant use. 5th International Symposium on Radiation Emergency Medicine, Hirosaki University (青森県弘前市) 2013年10月13日.

〔図書〕(計 0件)

〔産業財産権〕
○出願状況(計 0件)

○取得状況(計 0件)

〔その他〕

6. 研究組織

(1) 研究代表者

細川 洋一郎 (HOSOKAWA, Yoichiro)
弘前大学・大学院保健学研究科・教授
研究者番号: 70173599

(2) 研究分担者

(3) 連携研究者

門前 暁 (MONZEN, Satoru)
弘前大学・大学院保健学研究科・助教
研究者番号: 20514136

寺島 真悟 (TERASHIMA, Shingo)
弘前大学・大学院保健学研究科・助教
研究者番号: 00583733

吉野 浩教 (YOSHINO, Hironori)
弘前大学・大学院保健学研究科・助教
研究者番号: 10583734