

機関番号：11101

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2012～2013

課題番号：24791266

研究課題名(和文)ニトログリセリンの腫瘍血管拡張作用に基づく放射線増感作用に関する検討

研究課題名(英文)The study of radiosensitive effect through dilatation of tumor vessels with nitroglycerin

研究代表者

廣瀬 勝己(Hirose, Katsumi)

弘前大学・医学(系)研究科(研究院)・助教

研究者番号：60623767

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,300,000円、(間接経費) 990,000円

研究成果の概要(和文)：ニトログリセリン(NTG)は強力な血管拡張薬によって腫瘍組織の再酸素化を介して放射線増感作用を示しうるかを検討した。in vitroにおいて生体許容濃度NTGはA549細胞に対して放射線増感作用を示さなかった。NTGは細胞内HIF1 $\alpha$ やATMタンパク質の発現を増強した。NTGによって誘導されるNOを含む細胞内活性酸素がK562慢性白血病細胞の巨核球系分化誘導に関与することが明らかとなった。

SAS移植マウスモデルに対して10 Gy照射直前でのNTG投与は放射線増感作用を示さなかった。NTGは一過性・遅発性に腫瘍血流変化を伴わず腫瘍組織酸素分圧上昇を誘導する効果があることが分かった。

研究成果の概要(英文)：We examined whether nitroglycerin (NTG), which is an effective vasodilator, has an influence on radiosensitivity of cancers through reoxygenation of tumor tissue. The concentration allowable to a living body of NTG presented no radiosensitivity in A549 cells, although NTG increased the expression of HIF1 $\alpha$  and ATM proteins. This study suggested that intracellular reactive oxygen species, including nitric oxide induced by NTG, are involved with megakaryocytopoiesis of K562 chronic leukemia cells. The administration of NTG just before irradiation of 10 Gy presented no radiosensitivity on SAS tumor xenograft mouse model. However, NTG increased partial oxygen pressure of the tumor tissue slowly and transiently without the change of the tumor blood flow.

研究分野：医歯薬学

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：ニトログリセリン

## 1. 研究開始当初の背景

腫瘍組織内で低酸素状態にある腫瘍細胞 (0.1-1% O<sub>2</sub>) は放射線に抵抗性を示し、放射線治療の有効性を阻む原因となっている。腫瘍組織の低酸素化の主因は、腫瘍の増大と血管新生の不均衡により生じる腫瘍血流の低下であるため、腫瘍血流を増やすことで、組織酸素分圧の上昇による低酸素状態の解除、抗癌剤の Drug delivery の改善、といった効果が期待され、現在の放射線治療および化学療法の有効性が拡大する可能性がある。昨今、血管拡張薬であるニトログリセリン (NTG) や硝酸イソソルビド (ISDN) といった NO 供与体の検討において NTG は NO を介さない経路で作用し (Circ Res. 93: e104-112, 2003), 他の NO 供与体よりも強力な血管拡張作用 (Circ Res. 97: 1063-9, 2005) を有することがわかってきた。そして放射線との併用時に問題となる血中への NO 放出は極めて微弱であり (同 Circ Res. 97: 1063-9, 2005), 細胞内の NO 合成酵素を阻害し細胞内 NO 産生を抑制する作用を有する (Circ Res. 86:E7-E12, 2000) ことも明らかとなってきた。これらの NTG の特性により、強力な腫瘍組織血流増強を介して腫瘍細胞への放射線増感作用を誘導することが予測される。

## 2. 研究の目的

NTG の低酸素腫瘍組織の血流に与える影響を細胞・組織学的レベルで明らかにするとともに、腫瘍組織血流増強による放射線増感への影響を解明することを目的とした。

## 3. 研究の方法

(1) 細胞レベルでの NTG 作用解析と放射線感受性への影響解析

培養したヒト非小細胞肺癌細胞株 A549 を用い、まず通常酸素条件下にて、

培養細胞に NTG (1nM ~ 1μM) を投与し、2-6 時間後に X 線 6 Gy を照射した。コロニー形成法を用いて生存率を定量化し、放射線増感作用を検討した。

培養細胞に NTG を投与し、2-24 時間で経時的に細胞を回収し、タンパク質を定量した。次にウェスタンブロット法を用いて HIF や DNA 修復関連タンパク質 ATM の発現について定量解析を行った。これに加えて NTG 投与後に X 線 6 Gy を照射し、ウェスタンブロット法を用いて HIF や DNA 修復関連タンパク質 ATM の発現の変化を解析した。

次に慢性低酸素条件下にて、

低酸素下で 24 時間培養した細胞に NTG (1nM ~ 1μM) を投与し、X 線 6 Gy を照射した。コロニー形成法を用いて生存率を定量化し、放射線増感作用を検討した。

低酸素下で 24 時間培養した細胞に NTG を投与し、経時的に細胞を回収した。まずタンパク質を定量し、次にウェスタンブロット法を用いて HIF や DNA 修復関連タンパク質 ATM の発現の変化を解析した。

(2) NO を含む活性分子種と放射線照射の相乗効果による細胞内ストレスの増強についての解析

培養したヒト慢性白血病細胞株 K562 を用い、通常酸素条件において、

培養細胞に活性分子種の産生を誘導する PMA を投与した。さらに X 線 4Gy を照射した。このときの CD41 発現量をフローサイトメトリーで解析した。また、細胞を経時的に培養し、ギムザ染色で細胞を染色し、位相差顕微鏡で細胞の形態を解析し、巨核球様細胞の割合を解析した。同様に、細胞内ストレスの評価として、同様に PMA および X 線 4 Gy で処理した細胞の巨核球関連遺伝子である ITGA2B および GP1BA の発現を real time RT-PCR で評価した。加えて、N-acetyl cysteine を投与後に PMA および X 線 4 Gy で処理した細胞での CD41 の発現量をフローサイトメトリーで評価した。

MAPK 経路阻害薬である PD98059、SB203580 を添加して、PMA および 4 Gy 照射での CD41 発現量増強に対する影響をフローサイトメトリーで評価した。

PMA および X 線 4 Gy で処理した細胞におけるアポトーシスの誘導についてフローサイトメトリーを用いて解析した。さらに、このアポトーシス誘導への MAPK 経路の関与について PD98059 および SB203580 を用いて検討した。

PMA および X 線 4 Gy で処理した細胞を H2DCFDA および CD41-PC7 で二重染色し、フローサイトメトリーで CD41 発現量の高い細胞集団 CD41<sup>high</sup> と低い集団 CD41<sup>low</sup> を区別した。この 2 集団での細胞内活性酸素の変化について解析した。

(3) NTG・他 NO 供与体の腫瘍組織血流への影響と放射線増感の検討

培養したヒト舌扁平上皮癌細胞系列 SAS をヌードマウスの左大腿皮下に移植した in vivo の系において、腫瘍血流の改善作用と腫瘍組織低酸素細胞分画の減少、放射線増感作用について検討を加えた。

培養細胞を背部皮下に移植したヌードマウスを用い、

腫瘍が評価可能な低酸素細胞分画を有する径まで生育したマウスに NTG および ISDN を静脈投与した。投与前後での腫瘍の組織血流の変化量をレーザー Doppler 測定にて定量的に解析した。

同様に NTG および ISDN 投与前後での腫瘍酸素分圧を定量的に解析した。

2) と同様に NTG および ISDN 皮下投与後すぐに腫瘍に X 線 16 Gy を 1 回照射した。Tumor doubling time を測定し放射線増感作用を解析した。

#### 4. 研究成果

A549 培養細胞に NTG を添加し、X 線を照射した。コロニー形成法により放射線増感作用を検討したところ、通常酸素条件下では、NTG は低濃度投与において放射線増感作用や防護作用を示さなかった。培養細胞に NTG を投与し、経時的に細胞を回収しウェスタンブロット法を用いて HIF および ATM の発現を解析したところ、HIF および ATM のバンドに増強を認めた。フローサイトメトリーを用いて細胞周期を解析したところ、X 線照射と NTG 処理によって細胞周期に大きな変化は認めなかった。

低酸素下で培養した細胞に NTG を投与し、X 線照射しても細胞周期に大きな変化は認めなかった。通常酸素条件下では活性分子である NO は HIF-1 $\alpha$  を安定化することが報告されているので、NTG は活性分子である NO を介して培養細胞に影響を与える可能性が示唆された。そこで、活性分子種が放射線照射との併用により細胞に与える作用をさらに検討する目的で、まず活性酸素の腫瘍細胞に与える影響を解析した。慢性白血病細胞株 K562 培養細胞に活性酸素を誘発する PMA を投与し X 線 4 Gy を照射したところ、細胞内の活性酸素量が増強し、巨核球系のマーカーである CD41 の発現と核の分葉化、微小小胞、空胞化といった巨核球様の細胞形態変化が観察され、巨核球への分子誘導が促進されたことが示唆された。さらにこの効果は、PMA と X 線照射が相乗的に影響し合うことが明らかとなった。遺伝子レベルでの巨核球系への分化促進の有無を検討すると、CD41 マーカーは遺伝子レベルで発現が増強していることが明らかとなった。さらに巨核球分化関連遺伝子である ITGA2B および GP1BA にも遺伝子レベルでの発現増強が認められた。さらに、活性酸素の巨核球分化への関与を検討するため、活性酸素の捕捉剤である N-アセチルシステインを投与し、同様の実験を行ったところ、NAC の投与により巨核球分化が抑制された。以上より X 線照射による活性酸素の産生増強が細胞内活性分子種と相加的に細胞分化に影響を与えると考えられた。次に、MAPK 阻害薬を併用し、巨核球分化の誘導への影響を調べたところ、MEK1/2 阻害薬である PD98059 は CD41 発現を促進したが、p38 阻害薬である SB203580 は逆に CD41 発現を抑制した。従って、巨核球分化には MAPK 経路が関与することが明らかとなった。さらに、NO 合成酵素の CD41 発現への関与を検討した。NO 合成酵素阻害薬であるジフェニレンヨードニウムは CD41 発現の誘導を有意に抑制した。従って CD41 発現誘導に NO が関与することが示唆された。

NTG および ISDN 投与時の放射線の増感作用を *in vivo* で検討した。細胞には培養したヒト扁平上皮癌 SAS を用い、BALBc nu/nu ノードマウスの右大腿皮化に移植した。腫瘍径が XXXmm<sup>3</sup> に到達後、NTG 1mg/kg もしくは ISDN

0.1 mg/kg を背部皮下に投与し、投与後すぐに放射線を 0Gy もしくは 10Gy 照射した。対象をそれぞれの投与薬剤の有無における非照射群とした。1 日もしくは 2 日おきに腫瘍径を測定し、(長径) × (短径)<sup>2</sup> × 0.5 より腫瘍体積を求めた。それぞれの群において腫瘍増大速度を比較した。NTG および ISDN のいずれの薬剤投与群でも腫瘍増殖抑制や促進を認めなかった。さらに、放射線の抗腫瘍効果を増強する作用は示さなかった。

次に、培養したヒト舌扁平上皮癌細胞 SAS を BALBc nu/nu ノードマウスの右大腿皮下に移植した。腫瘍が成長した時点で、NTG 1 mg/kg もしくは ISDN 0.1 mg/kg を背部皮下に投与した。投与開始から 2 時間まで腫瘍血流量をドップラー血流計で、腫瘍酸素分圧を酸素分圧系で測定した。腫瘍血流は光ファイバースコープを腫瘍内に 5mm 刺入し留置固定し 5 分ごとに腫瘍血流量を計測した。同時に腫瘍酸素分圧は測定電極を腫瘍内に 5mm 刺入し留置固定し、無感電極をマウス背部正中に貼付留置した。腫瘍血流量はいずれの薬剤の投与した場合でも明らかな変化を認めなかった。ISDN を投与したとき、腫瘍酸素分圧に変化を認めなかったが、NTG を投与すると、はじめ 1 時間から 30 分間程度で腫瘍酸素分圧の変化は認めなかったものの、それ以降では 10% 程度の腫瘍酸素分圧上昇が認められた。以上より、NTG は、腫瘍血流量に変化は与えないが、遅発性に腫瘍酸素分圧を上昇させることが明らかとなった。腫瘍の血流量の変化なしに分圧が上昇したのは、腫瘍以外の正常組織での血管拡張後の再収縮による一過性の血圧の上昇に伴う、酸素消費量の低下がその原因と考えられた。この点においては腫瘍血管が本来の血管構造・機能と異なり、性状に NTG に反応しないため、正常血管の NTG に対する反応が腫瘍酸素分圧に反映されたと考えられた。本研究では NTG 照射直後に放射線を照射するという実験モデルのため、NTG の放射線増感作用は示すことができなかった。しかし、NTG による遅発性一過性の血管再収縮による腫瘍酸素分圧上昇時に放射線照射を行うことによって、腫瘍の再酸素化に伴う放射線増感効果を狙える可能性があることが示唆された。

#### 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)

Hirose K, Monzen S, Sato H, Sato M, Aoki M, Hatayama Y, Kawaguchi H, Narita Y, Takai Y, Kashiwakura I. Megakaryocytic differentiation in human chronic myelogenous leukemia K562 cells induced by ionizing radiation in combination with phorbol 12-myristate 13-acetate. Journal of Radiation Research. 査読有, 54(3):438-46. 2013,

doi: 10.1093/jrr/rrs125.  
Hirose K, Monzen S, Yoshino H, Sato H,  
Aoki M, Hatayama Y, Kawaguchi H, Sato  
M, Narita Y, Takai Y, Kashiwakura I.  
Effects of radiation on the maturation  
of megakaryocytes. Journal of  
Radiation Research. 査読有  
4(3):447-52. 2013, doi:  
10.1093/jrr/rrs127.

〔学会発表〕(計0件)

〔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〕

ホームページ等

なし

#### 6. 研究組織

##### (1) 研究代表者

廣瀬 勝己 (HIROSE, Katsumi)

弘前大学・大学院医学研究科・助教

研究者番号: 60623767

##### (2) 研究分担者

なし

##### (3) 連携研究者

なし