

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 9 月 18 日現在

機関番号：12301

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2012～2014

課題番号：24791277

研究課題名(和文) 神経膠芽腫における放射線誘導 HIF-1 のメカニズムと放射線抵抗性に関する探索

研究課題名(英文) Radiation-induced HIF-1 alpha is associated with radiation resistance in glioblastoma cells.

研究代表者

白井 克幸 (Shirai, Katsuyuki)

群馬大学・医学(系)研究科(研究院)・講師

研究者番号：10400748

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,900,000円

研究成果の概要(和文)：神経膠芽腫は予後不良な疾患であり、放射線治療抵抗性である。これまでの基礎的研究では、低酸素誘導転写因子(HIF-1)が放射線抵抗性因子であると報告されている。今回私たちは神経膠芽腫細胞株を用い、X線照射後にHIF-1が誘導され、その下流シグナルであるPDK1を介して、放射線抵抗性を獲得していることを明らかにした。今後は、in vivoモデルを用いて、今回のメカニズムを確認予定である。

研究成果の概要(英文)：Glioblastoma is one of the most radioresistant tumors and the patients have poor prognosis. Hypoxia inducible factor-1 (HIF-1), molecular markers of hypoxia, has been reported to be associated with radioresistance. We demonstrated that radiation-induced HIF-1 increases PDK1 expression in glioblastoma cells. In the future, this mechanism will be evaluated in vivo model.

研究分野：放射線生物学

キーワード：HIF-1 神経膠芽腫 radiation

1. 研究開始当初の背景

神経膠芽腫は術後放射線治療および化学療法を併用する事によって、治療成績の向上が報告されている。しかし全生存期間の中央値は15ヶ月程度と極めて予後不良であり、現在でもなお難治性疾患である。神経膠芽腫は種々の生物実験および臨床研究で、放射線治療抵抗性である事は明らかであり、その抵抗性の分子生物学的特性を明らかにする事は、治療効果の改善および予後延長の効果が期待される。

放射線治療は低酸素細胞に対して非常に抵抗性であり、低酸素誘導転写因子(Hypoxic induced-factor 1 alpha: HIF-1)も放射線抵抗性に関連している。近年照射によってもHIF-1が誘導され、放射線治療抵抗性と密接に関連している事が報告されているが、その詳細なメカニズムは明らかとなっていない。

2. 研究の目的

今回私たちは神経膠芽腫細胞株において照射誘導のHIF-1発現および放射線抵抗性のメカニズムを明らかにし、最終的には神経膠芽腫患者における治療効果改善および予後延長を目的とした基礎的な研究を行う。

3. 研究の方法

神経膠芽腫細胞を複数(U87, LN18, LN229など)用意し、各々の細胞をclonogenic survival assayおよびMTS assayを施行し、放射線抵抗性を評価した。ウェスタンブロッティングにより、HIF-1および、HIF-1の下流に位置する蛋白(VEGF, BNIP3, PDK1)を評価した。放射線抵抗性株ではHIF-1ノックダウン細胞株を作成し、放射線感受性の変化を検討した。

4. 研究成果

Clonogenic survival assay および MTS

assay を施行し、放射線抵抗性の株を同定し、これらの細胞において、照射後のHIF-1が増加することを明らかにした。また、一方で放射線感受性株ではHIF-1の変化は認めなかった。これらの結果により、神経膠芽腫細胞において、照射誘導HIF-1と放射線感受性は密接な関連があると示唆された。HIF-1の下流に位置する蛋白(VEGF, BNIP3, PDK1)をウェスタンブロッティングで蛋白発現量を確認し、PDK1の発現量が有意に照射によって増加していることを明らかにした(VEGF, BNIP3は変化なし)。さらに、HIF-1のノックダウン細胞株を作成し、放射線感受性を確認したところ、HIF-1の蛋白低下により放射線抵抗性は減弱し、PDK1の発現も低下していることがわかった。以上の研究により、HIF-1は神経膠芽腫細胞において、PDK1を介して放射線抵抗性の働きをしていることが明らかとなった。今後は、今回*in vitro*研究で用いた神経膠芽腫細胞を使い、マウスの脳内移植腫瘍モデルにて上記のメカニズムを、*in vivo*でも明らかにしていく予定である。

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14件)

1. Shirai K, Mizui T, Suzuki Y, Okamoto M, Hanamura K, Yoshida Y, Hino M, Noda SE, Al-Jahdari WS, Chakravarti A, Shirao T, Nakano T. X Irradiation Changes Dendritic Spine Morphology and Density through Reduction of Cytoskeletal Proteins in Mature Neurons. *Radiat Res.* 2013;179(6):630-6.(査読あり)

2. Shirai K, Tamaki Y, Kitamoto Y, Murata K, Satoh Y, Higuchi K, Ishikawa H, Nonaka T, Takahashi T, Nakano T. Prognosis was not deteriorated by multiple primary cancers in esophageal cancer patients treated by radiotherapy. *J Radiat Res.* 2013;54(4):706-11.(査読あり)

3. **Shirai K**, Nakagawa A, Abe T, Kawahara M, Saitoh J, Ohno T, and Nakano T. Use of FDG-PET in Radiation Treatment Planning for Thoracic Cancers. International Journal of Molecular Imaging. 2012;2012:609545. (査読あり)

4. **Shirai K**, Siedow MR, Chakravarti A. Antiangiogenic therapy for patients with recurrent and newly diagnosed malignant gliomas. J Oncol. 2012;2012:193436. (査読あり)

5. Ebara T, Shimada H, Kawamura H, **Shirai K**, Saito J, Kawashima M, Tashiro M, Ohno T, Kanai T, Nakano T. Dosimetric analysis between carbon ion radiotherapy and stereotactic body radiotherapy in stage I lung cancer. Anticancer Res. 2014;34(9):5099-104. (査読あり)

6. Kudo S, Suzuki Y, Noda SE, Mizui T, **Shirai K**, Okamoto M, Kaminuma T, Yoshida Y, Shirao T, Nakano T. Comparison of the radiosensitivities of neurons and glial cells derived from the same rat brain. Exp Ther Med. 2014;8(3):754-758. (査読あり)

7. Okonogi N, Oike T, **Shirai K***, Tamaki T, Noda S, Suzuki Y, Nakano T. Current Advances in Radiotherapy for Newly Diagnosed Glioblastoma Multiforme. J Neurol Neurophysiol, 5: 186, 2014. (査読あり) *Corresponding author

8. Oike T, Suzuki Y, Sugawara K, **Shirai K**, Noda SE, Tamaki T, Nagaishi M, Yokoo H, Nakazato Y, Nakano T. Radiotherapy plus Concomitant Adjuvant Temozolomide for Glioblastoma: Japanese Mono-Institutional Results. PLoS One. 2013;8(11):e78943. (査読あり)

9. Kaira K, Tomizawa Y, Yoshino R, Yoshii A, Matsuura M, Iwasaki Y, Koga Y, Ono A, Nishioka M, Kamide Y, Hisada T, Ishizuka T, **Shirai K**, Ebara T, Saitoh JI, Nakano T, Sunaga N. Phase II study of oral S-1 and cisplatin with concurrent radiotherapy for locally advanced non-small-cell lung cancer. Lung Cancer. 2013;82:449-454. (査読あり)

10. Oike T, Suzuki Y, Al-Jahdari W, Mobaraki A, Saitoh JI, Torikai K, **Shirai K**, Nakano T. Suppression of HIF-1 α expression and radiation resistance in acute hypoxic conditions. Exp Ther Med. 2012;3(1):141-145. (査読あり)

11. Perry J, Okamoto M, Guiou M, **Shirai K**, Errett A and Chakravarti A. Novel Therapies in Glioblastomas. Neurology Research International, 2012;2012:428565. (査読あり)

12. Jacob NK, Cooley JV, **Shirai K**, Chakravarti A. Survivin splice variants are not essential for mitotic progression or inhibition of apoptosis induced by doxorubicin and radiation. Onco Targets Ther. 2012;5:7-20. (査読あり)

13. Yoshida Y, Suzuki Y, Al-Jahdari WS, Hamada N, Funayama T, **Shirai K**, Katoh H, Sakashita T, Kobayashi Y, Nakano T. Evaluation of the relative biological effectiveness of carbon ion beams in the cerebellum using the rat organotypic slice culture system. J Radiat Res (Tokyo). 2012;53(1):87-92. (査読あり)

14. Tamaki T, Ishikawa H, Takahashi T, Tamaki Y, Kitamoto Y, Okamoto M, Noda SE, Katoh H, **Shirai K**, Sakurai H, Nakano T. Comparison of efficacy and safety of low-dose-rate vs. high-dose-rate intraluminal brachytherapy boost in patients with superficial esophageal cancer. Brachytherapy. 2012;11(2):130-6. (査読あり)

[学会発表](計 15件)

(国内学会 9回、国際学会 6回)

1. **白井克幸**.放射線照射による神経細胞死誘導と機能変化. 第4回国際放射線神経生物学会大会. 2014年1月17日. シンポジスト.

2. **白井克幸**, 齋藤淳一、武者篤、岡野奈緒子、鈴木義行、大野達也、紫野正人、豊田実、高安幸弘、近松一朗、中野隆史. 局所進行中咽頭癌に対する化学療法併用強度変調放射線治療. 口演発表. 第38回日本頭頸部癌学会. 東京. 2014年6月12日~13日.

3. **白井克幸**, 齋藤淳一、高草木陽介、柴慎太郎、武者篤、川嶋基敬、深田恭平、鈴木義行、大野達也、中野隆史. Intensity modulated radiotherapy reduced

xerostomia in oropharyngeal cancer patients. ポスター発表. 第 52 回日本癌治療学会学術集会. 横浜. 2014 年 8 月 28 日～30 日.

4. **Shirai K**, Abe T, Saitoh J, Takakusagi Y, Shiba S, Okano N, Ohno T, Nakano T. The Maximum Standardized Uptake Value (SUVmax) on FDG-PET Predicted Overall Survival and Progression Free Survival but not Local Control for Stage I Non-Small-Cell Lung Cancer Treated with Carbon Ion Radiotherapy. Poster presentation. ASTRO 56th meeting, San-Francisco, Sep 14-17, 2014.

5. **白井克幸**. 進行期中咽頭癌に対する化学療法併用 IMRT の初期経験. 口演発表. 頭頸部がん化学療法症例検討会. 前橋. 2014 年 10 月 9 日.

6. **Katsuyuki Shirai**, Akito Saito. Case study: Carbon-Ion Radiotherapy for Stage I Lung Cancer. International Training Course on Carbon-ion Radiotherapy 2014. Inage-Maebashi. Oct 20-25, 2014.

7. **白井克幸**, 齋藤淳一, 岡野奈緒子, 大野達也, 中野隆史. 重粒子線治療を施行した I 期原発性肺癌における治療前 SUVmax (FDG-PET) の予後への影響. 第 55 回日本肺癌学会学術集会. 京都. 2014 年 11 月 14 日～16 日.

8. **白井克幸**, 齋藤淳一, 阿部孝憲, 水上達治, 入江大介, 岡野奈緒子, 尾池貴洋, 大野達也, 中野隆史. I 期肺癌における重粒子線治療前 SUVmax(FDG-PET)の予後への影響. 口演発表. 日本放射線腫瘍学会第 27 回学術大会. 横浜. 2014 年 12 月 11 日～12 月 13 日.

9. **Shirai K**, Mizui T, Suzuki Y, Okamoto

M, Hanamura K, Yoshida Y, Hino M, Noda S, Shirao T, Nakano T. X-Irradiation Changes Dendritic Spine Morphology and Density through Reduction of Cytoskeletal Proteins in Mature Neurons. ポスター発表 第 4 回国際放射線神経生物学会. 沖縄. 2013 年 1 月 25 日～1 月 26 日.

10. **白井克幸**, 齋藤淳一, 岡野奈緒子, 吉本由哉, 桑子慧子, 高橋健夫, 鈴木義行, 大野達也, 紫野正人, 豊田実, 近松一朗, 中野隆史. I～III 期下咽頭癌に対する放射線治療成績. ポスター発表. 第 37 回頭頸部癌学会. 東京. 2013 年 06 月 13 日～14 日.

11. **白井克幸**, 齋藤淳一, 川嶋基敬, 高草木陽介, 岡野奈緒子, 鈴木義行, 大野達也, 高安幸弘, 高橋克昌, 近松一郎, 中野隆史. Stage III-IV 中咽頭癌に対する化学療法併用強度変調放射線療法の初期経験. 口演発表. 日本放射線腫瘍学会第 26 回学術大会. 青森. 2013 年 10 月 18 日～10 月 20 日.

12. **白井克幸**, 齋藤淳一, 岡野奈緒子, 高草木陽介, 高橋健夫, 鈴木義行, 大野達也, 中野隆史. I～III 期下咽頭癌に対する放射線治療成績. ポスター発表. 第 51 回日本癌治療学会学術集会. 京都. 2013 年 10 月 24 日～10 月 26 日.

13. **白井克幸**, 齋藤淳一, 岡野奈緒子, 吉本由哉, 高橋健夫, 鈴木義行, 大野達也, 中野隆史, 高橋克昌, 近松一朗. I～III 期下咽頭癌に対する放射線治療成績. 2012 年 11 月 23 日～11 月 25 日. 日本放射線腫瘍学会第 25 回学術大会. 東京. 口演.

14. **Katsuyuki Shirai**, Kamalakannan

Palanichamy, Disha Patel, Nicolaus Gordon, Arnab Chakravarti .
Radiation-induced HIF-1 α is associated with radiation resistance in glioblastoma cell lines. AACR 102nd Annual Meeting, Orlando, April 17-21, 2011, Poster.

15. **Katsuyuki Shirai**, Yoshiyuki Suzuki, Mizuki Hino, Yukari Yoshida, Toshiyuki Mizui, Kenji Hanamura, Tomoaki Shirao, Takashi Nakano . X-ray irradiation induces acute depolymerization of axonal and dendritic microfilaments in cultured neuron . 2011 年 12 月 3 日 . 第 2 回国際放射線神経生物学会 . 前橋 . ポスター .

〔図書〕(計 2 件)

1. 白井克幸、大野達也 . 治療各論：放射線療法 . 肺癌診療 Q&A 一つ上を行く診療の実践 第 2 版、2013 年 .

2. 白井克幸、鈴木義行、Textbook of Radiosurgery 放射線外科治療の進歩、日本放射線外科学会著、井上洋編、メディカ出版、**各論 5 章 F**、p88-92、2012.

〔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

白井 克幸 (Shirai Katsuyuki)

群馬大学・大学院医学系研究科・講師

研究者番号：10400748

(2)研究分担者 なし

(3)連携研究者 なし