慶應義塾大学学術情報リポジトリ
Keio Associated Repository of Academic resouces

Title	クロロキンのドラッグリポジショニングによる新規放射線増感治療の開発
Sub Title	Development of new radiation sensitization therapy by drug repositioning of chloroquine
Author	茂松, 直之(Shigematsu, Naoyuki) 深田, 淳一(Fukada, Jun'ichi) 公田, 龍一(Kōta, Ryūichi) 小池, 直義(Koike, Naoyoshi)
Publisher	
Publication year	2021
Jtitle	科学研究費補助金研究成果報告書 (2020.)
JaLC DOI	
Abstract	難治性の悪性腫瘍である膵癌に対する治療法としてオートファジーによる放射線抵抗性に着目しクロロキンのドラッグリポジショニングによる放射線増感効果を探索した。膵癌細胞を用いてスフェロイドを形成し、通常培地と低栄養状態の両方で照射とクロロキン投与を行ったがクロロキンによる生存率、サイズに大きな変化は見られず、放射線増感効果は見られなかった。また、オートファジー阻害効果も明らかでなかった。一方でミトコンドリアのオートファジーであるマイトファジーについて検討したところ阻害作用が示唆された。 As a treatment method for pancreatic cancer, which is an intractable malignant tumor, we focused on radiation resistance by autophagy and searched for the radiosensitizing effect of chloroquine drug repositioning. Pancreatic cancer cells were used to form spheroids, which were irradiated and administered with chloroquine in both normal medium and undernutrition, but there was no significant change in survival rate or size due to chloroquine, and no radiation sensitizing effect was observed.Moreover, the autophagy inhibitory effect was not clear. However, another study suggested an inhibitory effect on mitochondrial autophagy, mitophagy.
Notes	研究種目：基盤研究 (C) (一般) 研究期間：2018～2020 課題番号：18K07771 研究分野：放射線治療
Genre	Research Paper
URL	https://koara.lib.keio.ac.jp/xoonips/modules/xoonips/detail.php?koara_id=KAKEN_18K07771seika

慶應義塾大学学術情報リポジトリ(KOARA)に掲載されているコンテンツの著作権は、それぞれの著作者、学会または出版社/発行者に帰属し、その権利は著作権法によって保護されています。引用にあたっては、著作権法を遵守してご利用ください。

The copyrights of content available on the KeiO Associated Repository of Academic resources (KOARA) belong to the respective authors, academic societies, or publishers/issuers, and these rights are protected by the Japanese Copyright Act. When quoting the content, please follow the Japanese copyright act.

様　式　Ｃ－１９、Ｆ－１９－１、Ｚ－１９　（共通）

科学研究費助成事業　　研究成果報告書

令和　３ 年　 ６ 月　 ４ 日現在

機関番号：３２６１２
研究種目：基盤研究(C)（一般）
研究期間：2018～2020
課題番号：１８Ｋ０７７７１

研究課題名（和文）クロロキンのドラッグリポジショニングによる新規放射線増感治療の開発

研究課題名（英文）Development of new radiation sensitization therapy by drug repositioning of chloroquine

研究代表者
茂松　直之（SHIGEMATSU, Naoyuki）

慶應義塾大学・医学部（信濃町）・教授

研究者番号：３０１７８８６８

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費）　　3,400,000円

研究成果の概要（和文）：難治性の悪性腫瘍である膵癌に対する治療法としてオートファジーによる放射線抵抗性に着目しクロロキンのドラッグリポジショニングによる放射線増感効果を探索した。膵癌細胞を用いてスフェロイドを形成し、通常培地と低栄養状態の両方で照射とクロロキン投与を行ったがクロロキンによる生存率、サイズに大きな変化は見られず、放射線増感効果は見られなかった。また、オートファジー阻害効果も明らかでなかった。一方でミトコンドリアのオートファジーであるマイトファジーについて検討したところ阻害作用が示唆された。

研究成果の学術的意義や社会的意義
膵癌の多くは切除不能であり、放射線治療抵抗性で予後不良であることから放射線増感効果に着目した抗腫瘍効果の増強を探索する試みは重要と考える。オートファジーに着目した放射線増感剤の探索、機序解明を進めることで、放射線生物学的にも重要な研究と考えている。
本研究ではクロロキンによる増感効果、オートファジー阻害効果を明らかにすることはできなかったが、マイトファジーの阻害作用が示唆された。

研究成果の概要（英文）：As a treatment method for pancreatic cancer, which is an intractable malignant tumor, we focused on radiation resistance by autophagy and searched for the radiosensitizing effect of chloroquine drug repositioning. Pancreatic cancer cells were used to form spheroids, which were irradiated and administered with chloroquine in both normal medium and undernutrition, but there was no significant change in survival rate or size due to chloroquine, and no radiation sensitizing effect was observed.Moreover, the autophagy inhibitory effect was not clear. However, another study suggested an inhibitory effect on mitochondrial autophagy, mitophagy.

研究分野：放射線治療

キーワード：放射線生物学　膵癌　放射線抵抗性　オートファジー

※科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属します。

１．研究開始当初の背景

膵臓癌は最も予後不良な悪性腫瘍の一つである。その理由として初期には症状が乏しく診断が困難であるため、発見時には外科的完全切除が不能であることが挙げられる。一方、切除可能例においても手術後の再発や転移が多く認められる。抗がん剤治療や放射線療法への期待は大きいが、非手術治療の奏効率は低く治療成績は不良である。この理由として膵臓癌は抗がん剤、放射線療法に対し抵抗性であることが考えられる。治療成績改善のためには、従来の抗がん剤とは全く異なる機序による薬剤を用いた、放射線増感効果（局所病巣の制御）ならびに転移抑制効果を有する治療法開発が必要である。申請者らはこれまで膵癌、胃癌に対する放射線増感剤の開発として、mTOR 経路阻害剤（エベロリムスなど）、血糖降下剤（メトホルミン）を用いた基礎研究を行ってきた。これらの薬剤は放射線療法と併用することで薬剤投与単独よりも抗腫瘍効果が増加することが観察できたが問題点として、効果発現のために高用量の薬剤投与が必要であった。そこでクロロキンの**オートファジー抑制効果が抗がん剤に対する治療抵抗性を改善する**ことに着目した。**正常細胞**においては、**オートファジーにより**ミトコンドリアなどのオルガネラの恒常性やシグナル伝達を担う分子の調整が行われることで**腫瘍化が抑制される**方向に働く一方、**低栄養環境・低酸素環境（代謝ストレス）下にあるがん細胞**においては、オートファジーが栄養源の供給元となり**生存に貢献**している。

２．研究の目的

本研究の目標はまず in vitro における膵癌培養細胞における、クロロキンの放射線増感効果を明らかにすることである。続いて、オートファジー活性及び mTOR 系活性を解析することでクロロキンの作用部位、作用機序を明らかにする。これに加えて、これまで当研究室で解析してきた mTOR 阻害剤（エベロリムス）との併用効果、実験動物を用いた腫瘍組織・正常組織レベルでの放射線増感効果・有害反応評価について発展されることで、膵癌に対する有効な放射線増感剤の特定、機序の解明を目指す。

３．研究の方法

(1) 膵臓癌細胞系を 3 次元スフェロイド形成させて培養する。これにより、中心部は低栄養状態を作ることが可能である。さらに低栄養培地を用いることで膵癌組織に近い状態を再現する。放射線、クロロキン投与、放射線照射とクロロキン投与併用の処理を行いそれぞれの細胞生存率、細胞周期、DNA 損傷、アポトーシス分画を測定することでクロロキンの放射線増感効果を検討する。細胞生存率はコロニー形成法、WST (Water soluble Tetrazolium salts)アッセイにて測定する。

(2) オートファジーは試薬（DALGreen）を添加して蛍光を観察する。経時的変化についても検討を加える。

(3) ミトコンドリアのオートファジーであるマイトファジーの検出は Mtphagy Dye を用いて蛍光を観察する。

(4) クロロキンのオートファジー阻害効果が得られる条件の検証として、LC3 の発現を western blotting 法にて測定する。

４．研究成果

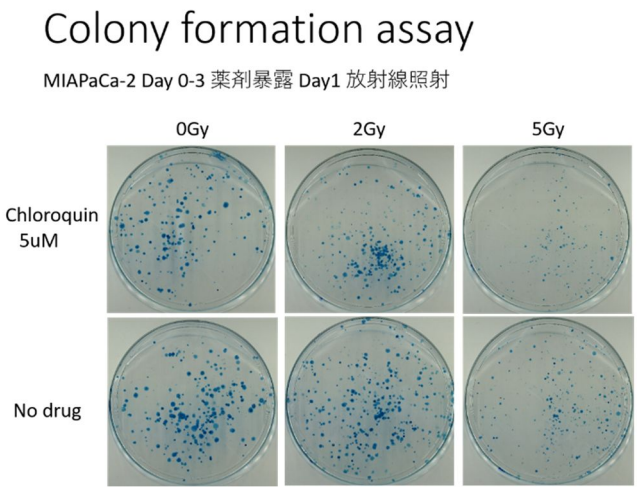
(1) スフェロイドの形成

ヒト膵臓癌培養細胞の中から MiaPaCa2 を選択し、通常培地（DMEN）中で培養し、3次元スフェロイドを形成させる。これにより中心部が低栄養の状態を作ることができ、膵癌組織に近い状態を再現するとともにオートファジーの関与についても検討することが可能である。低接着ディッシュ上で培養することでスフェロイドが形成されたが、その大きさにはバラつきが生じた。スフェロイドによる個体差を避けるため、低接着ウェルにて単一スフェロイドの形成を行った。低接着型 96 ウェルに 1 ウェルあたり 1000 個の細胞を播種することで均一なサイズのスフェロイド形成を得ることができた。これらに放射線照射、放射線照射とクロロキン投与併用の処理を行いスフェロイドのサイズを測定した。処理後 1 週間までサイズを測定したが、スフェロイドのサイズの変化は軽微であった。また、放射線照射、放射線照射とクロロキン投与処理をすることで蛍光を観察することができたが、クロロキン投与による蛍光の差などは明らかにできなかった。

(2) 細胞生存率の検討

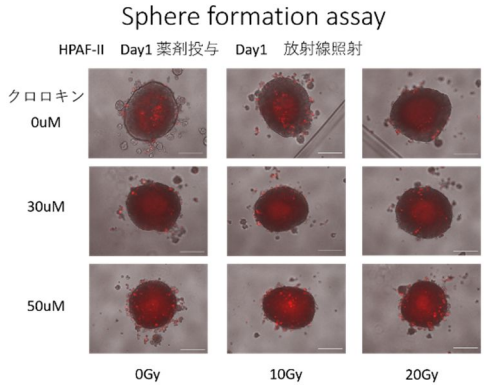
2-1）10㎝ ディッシュに 500、1000、5000、100000 個の細胞を播種しコロニー形成法を行った。同日クロロキン 0 あるいは 5μM の投与を行い、培養開始から 24 時間後に放射線照射 0、2、5、10Gy を行った。クロロキンを含んだ培地は 72 時間後に交換した。10-14 日後に固定し、細胞の生存率を計測した。10Gy での生存率はクロロキン投与群で 4.4-6.9%、非投与群で 2.4-3.5%であり、通常培地におけるクロロキン投与による明らかな放射線増感効果は得られなかった。

2-2)膵癌組織の低酸素状態に近い状態でのクロロキンによる増感効果を評価するため、96well 超低接着プレートに MiaPaCa2 を 1x103/well で播種し、24 時間後にクロロキン（0、5、10μM）の投与、72 時間後に放射線照射（0、5、10）Gy を行い Propidium iodide（PI）を用いて評価を行った。培養開始後 6 日目に PI を投与し、7 日目に蛍光顕微鏡にて観察した。放射線照射群、クロロキン投与群、放射線照射＋クロロキン投与群はコントロールと比し蛍光が強い傾向にあった。別検討では、12 日後に固定し細胞の生存率を計測したところ、低栄養により接着効果は低下しそれがクロロキンの投与下で顕著となる結果を得た。しかしながら、放射線照射にクロロキン投与を加えることによる上乗せ効果は明らかではなかった。

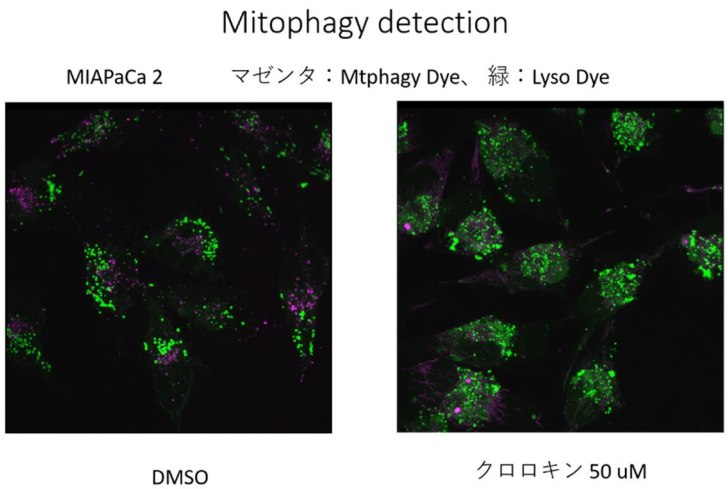


（3）別の膵癌細胞（HPAF II）を用いた検討

明らかな放射線増感効果が得られない原因として、MIA PaCa-2 のスフェロイド形成能が低いことも原因と考えられたため、より形成能の高い膵癌細胞である HPAF II を使用してスフェロイド形成下でのサイズ測定・PI 染色を行ったが、明らかな増感効果は示すことはできなかった。クロロキンによるオートファジー阻害効果が得られる条件確定のため、膵癌細胞にクロロキン 0、50uM を 24 時間暴露させ、LC3 の発現を western blotting 法にて測定したがクロロキンのオートファジー阻害効果は明らかではなかった。



そこでミトコンドリアのオートファジーであるマイトファジーに着目し、膵癌細胞 2 種 MIA PaCa-2，HPAF II にクロロキン 0、50uM を 24 時間暴露させ Mtphagy Dye,にて染色し、蛍光を観察した。50uM では Mtphagy Dye の蛍光が減弱しておりマイトファジーの阻害が示唆された。



Mtphagy Dyeでは酸性条件下のミトコンドリアで蛍光が増強しており、
マイトファジーを検出している。

(4)まとめ

膵癌細胞に対する放射線照射において、クロロキンによる増感効果を探索した。結果として明らかな増感効果を見出すことはできず、オートファジー阻害効果も明らかでなかった。しかし Mtphagy Dye 染色によりマイトファジーの阻害作用が示唆された。膵癌細胞におけるマイトファジーの阻害が得られる条件が確立した事は、今後オートファジー・マイトファジーと放射線照射との相関関係を検討するうえで有用と考えられる。

５．主な発表論文等

〔雑誌論文〕　計5件（うち査読付論文　5件／うち国際共著　0件／うちオープンアクセス　1件）

１．著者名 Nemoto T, Futakami N, Yagi M, Kumabe A, Takeda A, Kunieda E, Shigematsu N.	４．巻 61(2)
２．論文標題 Efficacy evaluation of 2D, 3D U-Net semantic segmentation and atlas-based segmentation of normal lungs excluding the trachea and main bronchi.	５．発行年 2020年
３．雑誌名 J Radiat Res	６．最初と最後の頁 257-264
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1093/jrr/rrz086.	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 －

１．著者名 Eriguchi T, Takeda A, Tsurugai Y, Sanuki N, Kibe Y, Hara Y, Kaneko T, Taguri M, Shigematsu N.	４．巻 134
２．論文標題 Pleural contact decreases survival in clinical T1N0M0 lung cancer patients undergoing SBRT.	５．発行年 2019年
３．雑誌名 Radiother Oncol	６．最初と最後の頁 191-198
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.radonc.2019.02.005. Epub 2019 Feb 26	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 －

１．著者名 Yura M, Takahashi T, Fukuda K, Nakamura R, Wada N, Fukada J, Kawakubo H, Takeuchi H, Shigematsu N, Kitagawa Y.	４．巻 20
２．論文標題 A Highly Advanced Gastric Cancer Maintaining a Clinical Complete Response after Chemoradiotherapy Comprising S-1 and Cisplatin.	５．発行年 2018年
３．雑誌名 Case Rep Gastroenterol	６．最初と最後の頁 578-585
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1159/000492206. eCollection 2018 Sep-Dec	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 －

１．著者名 Nishimura S, Ohashi T, Momma T, Sakayori M, Eriguchi T, Tanaka T, Yamashita S, Kosaka T, Oya M, Shigematsu N	４．巻 7
２．論文標題 Prostate-specific antigen nadir within 12 months as an early surrogate marker of biochemical failure and distant metastasis after low-dose-rate brachytherapy or external beam radiotherapy for localized prostate cancer.	５．発行年 2018年
３．雑誌名 Cancer Med	６．最初と最後の頁 1794-1801
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1002/cam4.1443. Epub 2018 Mar 25.	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 －

１．著者名 Koike N, Kota R, Naito Y, Hayakawa N, Matsuura T, Hishiki T, Onishi N, Fukada J, Suematsu M, Shigematsu N, Saya H, Sampetrean O	４．巻 17
２．論文標題 2-Nitroimidazoles induce mitochondrial stress and ferroptosis in glioma stem cells residing in a hypoxic niche.	５．発行年 2020年
３．雑誌名 Commun Biol.	６．最初と最後の頁 ―
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1038/s42003-020-01165-z	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 ―

〔学会発表〕　計3件（うち招待講演　0件／うち国際学会　0件）

１．発表者名 小池直義、深田淳一、公田龍一、伊藤章吾、湯浅慎介、茂松直之
２．発表標題 放射線照射後のマウス心臓の形態学的・病理学的検討
３．学会等名 日本放射線腫瘍学会第32回学術大会
４．発表年 2019年

１．発表者名 公田龍一、小池直義、深田淳一、茂松直之
２．発表標題 マウス放射線肺臓炎モデルにおける病理学的検討
３．学会等名 日本放射線腫瘍学会第32回学術大会
４．発表年 2019年

１．発表者名 深田淳一、深田恭平、小池直義、公田龍一、茂松直之
２．発表標題 機械学習による胸部放射線照射後の予後予測因子と有害事象発症予測因子の探索
３．学会等名 第58回日本癌治療学会学術集会
４．発表年 2020年

〔図書〕　計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

―

6．研究組織

	氏名 （ローマ字氏名） （研究者番号）	所属研究機関・部局・職 （機関番号）	備考
研究分担者	深田　淳一 (Fukada Junichi) (50338159)	慶應義塾大学・医学部（信濃町）・講師 (32612)	
研究分担者	公田　龍一 (Kota Ryuichi) (00464834)	慶應義塾大学・医学部（信濃町）・助教 (32612)	
研究分担者	小池　直義 (Koike Naoyoshi) (60464913)	慶應義塾大学・医学部（信濃町）・助教 (32612)	

7．科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕　計0件

8．本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関