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

Title	生体内反応で発生する代謝活性ラジカルを利用した低酸素細胞増感剤の開発と臨床応用
Sub Title	Administration of a hypoxic cell sensitizer, 6-FP, enhance of radiation-induced apoptosis in human carcinoma
Author	茂松, 直之(Shigematsu, Naoyuki) 川田, 哲也(Kawata, Tetsuya)
Publisher	
Publication year	2012
Jtitle	科学研究費補助金研究成果報告書 (2011.)
JaLC DOI	
Abstract	癌放射線治療の改善には、腫瘍組織に存在する低酸素領域の放射線抵抗性細胞制御が重要である。本研究では生体内代謝産物6-FP(6-ホルミルプテリン)の活性化酸素効果が放射線増感能に与える影響を検討した。腫瘍細胞と正常細胞をコロニー法、染色体異常の頻度、アポトーシスを指標に比較検討した結果、照射と6-FP併用は放射線増感効果が腫瘍細胞で認められ、6-FPは低酸素性腫瘍細胞に対して放射線増感を増強することが示唆された。
Notes	研究種目：基盤研究(C) 研究期間：2009～2011 課題番号：21591619 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
Genre	Research Paper
URL	https://koara.lib.keio.ac.jp/xoonips/modules/xoonips/detail.php?koara_id=KAKEN_21591619seika

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

科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成 24 年 5 月 15 日現在

機関番号：32612
研究種目：基盤研究(C)
研究期間：2009～2011
課題番号：21591619
研究課題名（和文）
生体内反応で発生する代謝活性ラジカルを利用した低酸素細胞増感剤の開発と臨床応用
研究課題名（英文）
Administration of a hypoxic cell sensitizer,6-FP,enhance of radiation-induced apoptosis in human carcinoma
研究代表者
茂松　直之（SHIGEMATSU NAOYUKI）
慶應義塾大学・医学部・教授
研究者番号：30178868

研究成果の概要（和文）：癌放射線治療の改善には、腫瘍組織に存在する低酸素領域の放射線抵抗性細胞制御が重要である。本研究では生体内代謝産物 6-FP（6-ホルミルプテリン）の活性化酸素効果が放射線増感能に与える影響を検討した。腫瘍細胞と正常細胞をコロニー法、染色体異常の頻度、アポトーシスを指標に比較検討した結果、照射と 6-FP 併用は放射線増感効果が腫瘍細胞で認められ、6-FP は低酸素性腫瘍細胞に対して放射線増感を増強することが示唆された。

研究成果の概要（英文）：Hypoxia governs cellular adaption to oxygen deficiency by regulating tumor-relevant genes involved in energy metabolism, angiogenesis, cell proliferation and apoptosis. Heterogeneity of tumor was investigated with respect to radiosensitizing efficiencies of a hypoxic cell sensitizer, 6-FP(6-formylpterin), a metabolite of folic acid. In contrast to apoptosis induced by extracellular H_2O_2, only a few studies have examined apoptosis induced by intracellular H_2O_2. Oxidative stress is known to induce many forms of apoptosis, and as its common mediator, intracellular reactive oxygen species play a cardinal role in oxidative stress-induced apoptosis. Here we used an intracellular H_2O_2 inducer, 6-FP, which is a member of the pterin family. Tumor cells and normal cells were treated with 6-FP before expose of X-ray and then irradiated. We collected the cells and colony efficiency and survival fraction were analyzed. The results showed that the tumor cells were higher colony efficiency than the normal cells, and the cells with both X-ray irradiation and 6-FP treatment were significantly lower survival rate. These results suggested that 6-FP may have radioprotective effect for the tumor cells and the incidated that 6-FP enhances the apoptosis by the radiation-induced and 6-FP may be effective use of the drug.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合　計
2009 年度	1,500,000	450,000	1,950,000
2010 年度	1,000,000	300,000	1,300,000
2011 年度	1,000,000	300,000	1,300,000
総　計	3,500,000	1,050,000	4,550,000

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：放射線抵抗性・低酸素細胞

１．研究開始当初の背景

悪性腫瘍の放射線治療において、放射線抵抗性の原因の一つとして低酸素細胞があげられる。腫瘍が低酸素状態になると、腫瘍の悪性度（浸潤能や転移能など）が増したり、放射線治療や抗がん剤治療に対して抵抗性になったりすることが知られている。低酸素状態の腫瘍に対する研究は治療効果改善につながる重要な意義を有する。実際、現在まで多くの低酸素細胞細胞増感剤が研究されている。

プリン誘導体は活性酸素消去作用や免疫抑制作用を有することが知られている。更にプリン誘導体は投与した動物の体内で少しずつ分解して 6-FP(6-ホルミルプリン)を放出し、放射線増強作用を有する化合物を誘導する。6-FP はキサンチンオキシダーゼの阻害剤としてすでに知られており、活性酸素消去作用があることも研究されている。更に 6-FP は放射線により誘発されるアポトーシスを増強することが報告されている。

２．研究の目的

癌放射線治療の成績改善のための課題は、放射線抵抗性の癌細胞の存在であり、放射線抵抗性の癌細胞は低酸素状態の存在し、放射線治療後も生存し続けて再酸素化し再発の原因となるといわれている。本研究では生体内で葉酸代謝物として生成される生体内代謝産物である 6-FP が有する活性酸素効果が、放射線を増感することを期待し、計画した。これまでなされてきた多くの増感剤の研究では抗腫瘍効果のみが検討されてきたが、正常細胞も放射線増感効果を比較検討する必要があり、本研究では正常細胞の増感効果も検討を加えることにより毒性も評価し、臨床へと結びつけていきたい。

３．研究の方法

(1) 放射線と 6-FP の増感効果を検討

① 腫瘍細胞と正常細胞の感受性感効果をコロニー法で検討

② サイトカラシンＢを用いた微小核小体の形成率

③ 染色体異常の頻度を照射単独と 6-FP 併用群で比較し、増感効果を検討

④ 細胞周期動態をフローサイトメトリーにて解析

⑤ アポトーシス誘導率を照射単独と併用で比較

(2) 放射線単独および 6-FP との併用により増感効果を評価した癌細胞群をヌードマウス大腿皮下に移植し、腫瘍を形成させる。腫瘍に対して 6-FP を経皮的に投与し、腫瘍の放射線増感効果を確認する。また、照射直後、２４時間後に腫瘍を摘出し、in vitro で行った解析法にて in vivo での代謝、増殖動態を批評し、臨床への応用方針を検討する。

①腫瘍細胞と正常細胞の感受性をコロニー法で検討

②サイトカラシンＢを用いた微小核小体の形成率

③染色体異常の頻度を照射単独と 6-FP 併用群で比較し、増感効果を検討

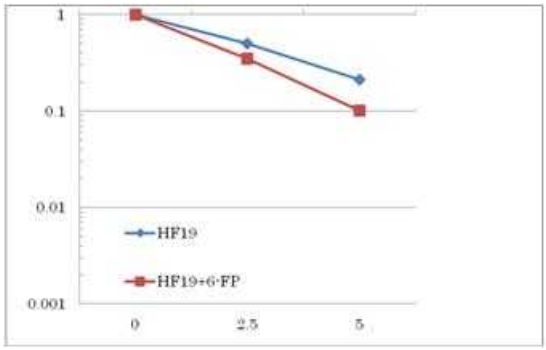
④細胞周期動態をフローサイトメトリーにて解析

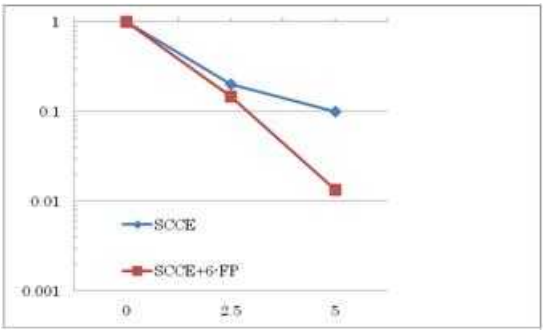
⑤アポトーシス誘導率を照射単独と併用で比較

４．研究成果

(1)腫瘍細胞と正常細胞の放射線感受性および 6-FP の増感効果を比較検討した。

① ヒト線維芽細胞 NHDF(normal human dermal fibroblasts cell line),HF19(normal primary lung fibroblast cell line), AG1522(normal human diploid skin fibroblast cell line)、肺癌細胞 NSCLC(non-small-cell lung carcinoma cell line)、食道癌細胞 SCCE(squamous cell carcinoma of esophagus cell line)を用いてコロニー法を行い、各々の生存曲線を形成した。

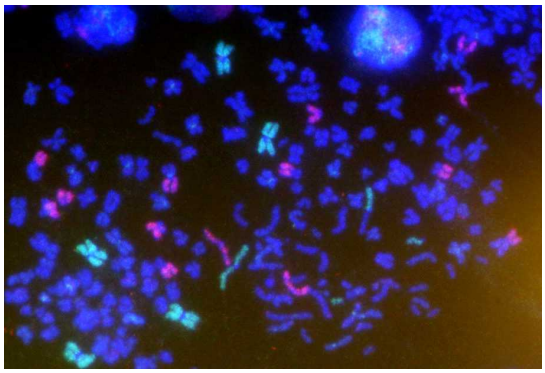




結果、正常細胞、HF19 は放射線、6-FP 単独ではあまり影響を受けなかったが(上記の図上)、腫瘍細胞では照射及び 6-FP 濃度依存的に生存率が低下した。更に、腫瘍細胞では照射と 6-FP の併用では生存率が顕著に低下した（上記の図下)。

②射線と 6-FP 併用においての各々の濃度、及び 6-FP が細胞に作用する時間を放射線照射前後で比較検討した。小核は細胞内で遺伝子上の損傷が修復されない場合に生じ、細胞の遺伝子損傷修復能力を反映することから、サイトカラシンＢを用いて微小核小体の形成率を指標に 6-FP の作用時間を検討した。結果、6-FP は照射時に存在するとその増感効果を示し、照射後に作用させても影響は見られなかった。

③放射線照射による染色体異常の頻度を照射単独と上記で得られた 6-FP の濃度及び作用時間を用いた併用群で比較すると、併用することで増感効果が上がった。



誤修復と結合できずに残る染色体損傷を FISH 法にて観察

腫瘍細胞において放射線照射と 6-FP 処理の併用により得られた染色体異常の例
緑：染色体１番
赤：染色体３番

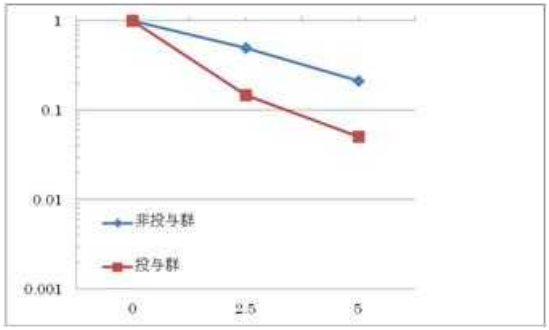
④細胞周期動態をフローサイトメトリーにて解析したところ、特に S/M2 期にある腫瘍細胞に対して、6-FP の増感作用が強くみられた。しかし、G0/G1 期の細胞に対しても正常細胞と比較すると、増感効果は検出された。

⑤生体内での代謝産物である 6-FP は細胞内でスーパーオキサイドを消去し、過酸化水素　を生成し、カスパーゼ８を経由しミトコンドリアにシグナル伝達されることにより、DNA 断片化などを伴ったアポトーシスを増強させ生体防御に関与することが知られている。そこで本研究ではアポトーシス誘導率を照射単独と併用で比較し、p53 の活性を検討した。結果、正常細胞と比較すると腫瘍細胞は p53 の活性がみられた。

腫瘍細胞では放射線により誘発されるアポトーシスが 6-FP により増強されることが認められた。

以上の結果から、in vitoro では 6-FP は放射線増感剤として有用であることが示唆された。

(2)vitro より得られたデーターをもとに、放射線単独および 6-FP との併用により増感効果を評価した癌細胞群を、ヌードマウス大腿皮下に移植し、腫瘍を形成させた。腫瘍に対して 6-FP を経皮的に投与した群と投与しない群で、腫瘍の放射線増感効果をコロニー法にて比較検討を行った。



投与群と非投与群の腫瘍細胞の生存率を比較すると、非投与群の生存率は高かった。引き続き、サイトカラシンＢを用いて微小核小体の形成率、染色体異常の頻度を照射単独と 6-FP 併用群で比較検討する予定である。更に、細胞周期動態をフローサイトメトリー法で解析し、アポトーシス誘導率を照射単独と 6-FP 併用で比較する。
今後、6-FP が有する活性酸素効果が低酸素性細胞放射線増感剤として有用であるか否か

を検討し、癌放射線治療の治療効果改善に役立てたい。

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）

①Shigematsu N, Shiraishi Y., Seki S., Fukada J., Ohashi T. Clinical evidence of particle beam therapy. Int J Clin Oncol. 2012 Apr;17(2):75-78.（査読有）

② Ohashi T., Momma T., Yamashita S., Nagatusma K., Kanai K., Kitagawa K., Takahashi S., Hanada T., Yorozu A., Shigematsu N. Impact of MRI-based postimplant dosimetric assessment in prostate brachytherapy using contrast-enhanced T1-weighted images. Brachytherapy. 2012. In press (査読有)

〔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
茂松　直之（SHIGEMATU NAOYUKI）
慶應義塾大学・医学部・教授
研究者番号：30178868

(2)研究分担者
川田　哲也（KAWATA TETSUYA）
慶應義塾大学・医学部・講師
研究者番号：60234077

(3)連携研究者
なし