

抗癌ナノ粒子を利用した放射線耐性腫瘍の新規治療法の開発

[1] 組織

代表者：濱 進 (京都薬科大学)
 対応者：福本 学 (東北大学加齢医学研究所)
 分担者：小暮 健太郎 (京都薬科大学)
 板倉 祥子 (京都薬科大学)
 中村 伊吹 (京都薬科大学)
 福本 学 (東北大学加齢医学研究所)

研究費：物件費 3 万 7 千円，旅費 1 万 6 千 3 千円

[2] 研究経過

(2-1) 本研究の目的

放射線療法は放射線照射により産生される活性酸素により癌細胞を死滅させることが可能であるが、臨床において反復照射による細胞自身の特性変化により、複雑な耐性機構を獲得した癌細胞の出現が放射線治療の効果を減弱させる一因である。そこで、本研究では放射線耐性腫瘍の有効な化合物を見出すために、細胞内レドックスバランスに着目して、耐性細胞の特性を明らかにするとともに、その特性情報を基に選定した化合物の放射線耐性腫瘍細胞に対する影響を検討することを目的とした。

(2-2) 本研究の概要

東北大学の福本先生が作製した臨床的放射線耐性腫瘍細胞 HepG2-8960-R および親株細胞 HepG2 における抗酸化酵素の遺伝子発現を比較した。その結果、HepG2-8960-R 細胞は、HepG2 に比べて、Superoxide dismutase (SOD) mRNA 発現が低いことが明らかとなった。そこで、細胞のスーパーオキシド (O_2^-) 産生を刺激することにより細胞死を誘導するトコフェロールコハク酸 (TS) の効果を比較した結果、HepG2-8960-R 細胞は TS に対する感受性が高かった。この感受性増大には、HepG2-8960-R 細胞の SOD mRNA レベルが低いために、ミトコンドリア由来の O_2^- 蓄積されやすいことが関与していることが示唆された。

(2-3) 研究活動状況の概要

H24 年 9 月 5-6 日：東北大学加齢医学研究所の福本研究室にて研究進捗状況の報告および研究計画の打ち合わせを行った。

H24 年 11 月 15 日：東北大学加齢医学研究所の福本研究室のセミナーに参加するとともに研究進捗状

況の報告および研究計画の打ち合わせを行った。

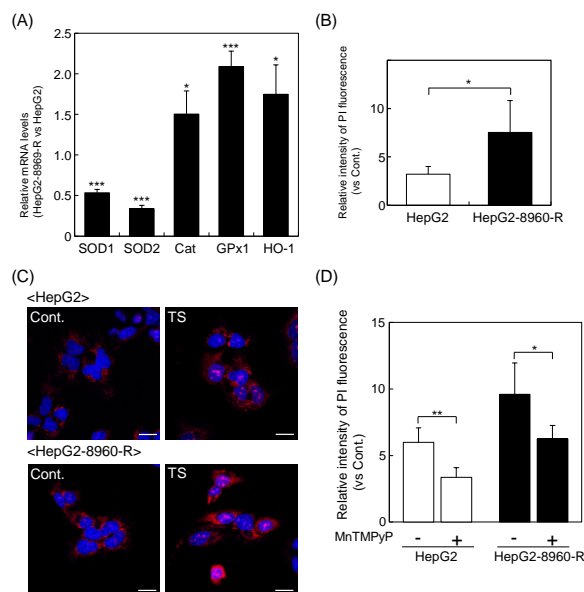
H24 年 11 月 20 日：京都薬科大学の耐性細胞の耐性能が維持されているのか確認するために京都薬科大学から東北大学へ HepG2-8960-R および HepG2 の送付。

H24 年 12 月 13 日：東北大学加齢医学研究所へ電子顕微鏡観察用サンプルの送付。

H25 年 1 月 28-30 日：東北大学医学部にて電子顕微鏡観察、および東北大学加齢医学研究所の福本研究室のセミナーに参加するとともに研究進捗状況の報告および研究計画の打ち合わせを行った。

上記に加えて、加齢研の担当教員の福本教授および病態臓器構築研究分野の桑原助教とは随時メールで打ち合わせを行った。

[3] 成果



(3-1) 研究成果

図 1. 放射線耐性細胞の抗酸化機構とトコフェロールコハク酸誘導細胞死の関連。

(A) 抗酸化酵素 mRNA レベル, (B) TS の細胞死誘導効果, (C) ミトコンドリア由来 O_2^- (赤), (D) TS 誘導細胞死に対する O_2^- 消去剤の影響

臨床的放射線耐性腫瘍細胞 HepG2-8960-R および非耐性細胞 HepG2 における代表的な抗酸化酵素の遺伝子発現を比較した。HepG2-8960-R 細胞では、HepG2 に比べて、SOD1 および SOD2 mRNA レ

ベルが著しく低かったのに対して, Catalase (Cat), Glutathione peroxidase 1(GPx1), Hemeoxygenase-1(HO-1) mRNA レベルは有意に高かった(図(A))。この結果は, HepG2-8960-R 細胞は O_2^- が蓄積されやすい特性を有することが示唆された。そこで, 細胞のスーパーオキシド産生を刺激する TS の効果を比較した結果, TS は HepG2-8960-R 細胞に強力な細胞死を誘導し, その効果は HepG2 細胞に比べて著しく高かった(図(B))。次に HepG2-8960-R 細胞が TS に対する感受性の高いメカニズムを解析するために, ミトコンドリア由来の O_2^- 産生量を MitoSOX Red 染色により検討した。その結果, HepG2-8960-R 細胞では, TS 処理により O_2^- が著しく増大した(図(C))。さらに, O_2^- 消去剤の Manganese (III) tetrakis (1-methyl-4-pyridyl) porphyrin (MnTMPyP) の共処理により, TS 誘導細胞死が抑制された(図(D))。これらの結果より, SOD 発現が低い臨床的放射線耐性細胞は O_2^- 産生を刺激する TS によって強力な細胞死が誘導されることが示唆された。

さらに放射線耐性細胞に強力な細胞死を誘導する TS を *in vivo* 応用するために, TS の製剤化を行った。これまでに脂溶性の高い TS をナノベシクル化 (TS-NV) し, 担癌マウスへ投与することにより, 腫瘍成長が抑制されることを報告している。しかし, TS-NV の抗腫瘍効果を更に増強するために, ナノベシクルの膜物性に着目して, TS と egg phosphatidylcholine (EPC) を混合させた新規のナノベシクル (TS-EPC-NVs) を構築した。この TS-EPC-NVs は TS-NVs よりも強力な抗腫瘍効果を示した。さらに, TS-EPC-NVs 内に siRNA などの核酸も封入可能であった。これらの結果より, *in vivo* 応用可能な TS-EPC-NVs は放射線耐性腫瘍に対する有効な治療法として期待される。

(3-2) 波及効果と発展性など

本共同研究の成果は, 臨床的放射線耐性腫瘍細胞が O_2^- 消去活性が低い特性を示すことを明らかにするとともに, その特性に基づいて選定した O_2^- 産生を刺激する TS が臨床的放射線耐性細胞において強力な細胞死を誘導することを見出したことである。本成果は, 日本ビタミン学会などで発表したことにより, 学外研究者との交流が飛躍的に活性化した。また, 脂溶性の高い TS の製剤化 (TS-EPC-NVs) にも成功しており, 東北大学の福本先生の研究室と共同で進めている癌の放射線耐性機構が更に明らかにされることにより, TS-EPC-NVs 内にその機構情報に基づく様々な薬物を封入することにより, 効果的な放射線治療システムの構築へと発展することが期待される。

[4] 成果資料

(4-1) 論文発表

1. Hama S, Utsumi S, Fukuda Y, Nakayama K, Okamura Y, Tsuchiya H, Fukuzawa K, Harashima H, Kogure K. Development of a novel drug delivery system consisting of an antitumor agent tocopheryl succinate. J Control Release. (2012) 161, 843-51.

2. Hama S, Ohishi T, Nakamura I, Fukuda Y, Kuwahara Y, Tsuchiya H, Fukuzawa K, Fukumoto M, Kogure K. Potent cytotoxicity induced by tocopheryl succinate depends on the balance between production and elimination of superoxide in the clinically relevant radioresistant cancer cells. 投稿準備中.

(4-2) 学会発表

1. 大石利一, 濱 進, 岡村有里子, 福田友紀, 中村伊吹, 土谷博之, 桑原義和, 福本学, 福澤健治, 小暮健太郎. トコフェロールコハク酸は臨床的放射線耐性細胞に強力な細胞死を誘導する. 第3回近畿地区ビタミン懇話会 (大阪) 2013年2月

2. 大石利一, 濱 進, 中村伊吹, 土谷博之, 桑原義和, 福本学, 小暮健太郎. 放射線耐性細胞の酸化機構とトコフェロールコハク酸誘導細胞死の関連. 第24回ビタミンE研究会 (東京) 2013年1月

3. 濱 進, 中村伊吹, 大石利一, 土谷博之, 桑原義和, 福本学, 福澤健治, 小暮健太郎. 放射線耐性細胞におけるトコフェロールコハク酸の細胞死誘導効果. 日本ビタミン学会第64回大会(岐阜) 2012年6月