

低酸素腫瘍細胞における TRAIL による 放射線誘発アポトーシスの増強効果に関する研究

学位論文内容の要旨

腫瘍治療法の一つであるX線は、腫瘍細胞内のDNA損傷を誘発し、ミトコンドリアを仲介したシグナルを活性化してアポトーシスを誘導するとされる。しかしながら、このような腫瘍治療における問題点の一つに低酸素影響がある。低酸素状態は腫瘍の成長過多により腫瘍内部の酸素供給量が低下する事により生じるもので、腫瘍への放射線治療や薬剤治療への抵抗性の一因である。低酸素影響下でも効果のある治療法の研究と開発が広く進められているが未だ解決されていない事項も多い。

当研究室の以前の研究結果から、腫瘍細胞へのX線照射により、アポトーシスを誘導するデスレセプターであるDR5の細胞膜上での発現が上昇する事、ならびにDR5のリガンドであるTRAILとの併用により固形腫瘍細胞にアポトーシスを誘導できる事が明らかになっている。この事を踏まえて、本研究ではTRAILとX線照射の併用による腫瘍細胞への放射線感受性の変化を検討すると共に、低酸素状態でのTRAILとX線照射を併用する事で腫瘍細胞への放射線感受性にどのような影響が与えられるか、加えて低酸素条件下でもアポトーシスを誘導するかについても検証した。

ヒト肺腺がん由来A549細胞を用いた*in vitro*実験での結果、TRAILとX線照射の併用処置では、無処置群、単独処置群と比較してアポトーシス細胞数の増加が観察された。低酸素条件下では併用処置によるアポトーシス誘導能は大気条件と比較して減少したが、それでも無処置群、単独処置群と比較してアポトーシス細胞数の増加が観察された。また、X線によるDR5の発現上昇は、低酸素条件下でも観察された。カスパーゼ阻害剤を用いた実験の結果から、このアポトーシス誘導は、ミトコンドリアを仲介したストレス誘導性のシグナル伝達経路ではなく、主としてデスレセプターを仲介したシグナル伝達経路で誘導されていることが明らかとなった。更にウェスタンブロット法の結果から、このシグナル伝達経路にIAPファミリーの一つであるXIAPが関与することが示唆された。コロニー形成法によるX線照射した腫瘍細胞の生存率曲線解析では、大気条件下ならびに低酸素条件下の両条件でTRAILの添加による生存率の有意な減少が見られた。以上の結果から、TRAILとX線照射の併用処置による腫瘍細胞への細胞死誘導は低酸素条件下においても有効である可能性が示された。従って、*In vivo*実験系において低酸素領域を有する固形腫瘍に対してもTRAILとX線照射の併用効果が期待された。

*In vivo*実験系では、確立されたマウス移植腫瘍モデルを用いて、ヒト胃腺がん由来MKN45細胞(野生型Tp53)とMKN28細胞(変異型Tp53)の成長曲線の検討、腫瘍組織の免疫組織化学染色等を行った。その結果、Tp53に依存せずTRAILとX線照射の併用処置では無処置群と比べて有意に腫瘍成長を抑制した。さらに*in vitro*実験系で観察されたX線によるDR5の発現の上昇が*in vivo*実験系でも確認された。また、腫瘍の成長抑制はアポトーシスの誘導ならびにアポトーシス実行因子であるカスパーゼ3の活性化と相関することが免疫組織化学の結果から明らかになった。低酸素マーカーであるピモニダゾールによる腫瘍組織内の低酸素領域の検討の結果、TRAILとX線照射の併用処置群で低酸素領域の減少が生じた。又、蛍光二重染色により併用処置群では低酸素領域でのカスパーゼ3の活性化が誘導されることが明らかとなった。これらの結果から、*in vivo*実験系においてもX線照射によりDR5の発現が上昇し、TRAILとの併用により固形腫瘍細胞にアポトーシスを誘導できる事が明らかになった。このアポトーシス誘導の結果と考えられる腫瘍成長の抑制がTp53の状態に関係なく生じることから、多くの放射線抵抗性な腫瘍細胞に対して有効である可能性が考えられる。また、TRAILとX線照射の併用処置により低酸素領域が減少すること、ならびに低酸素領域内でアポトーシスが誘導されることから、この処置法が放射線抵抗性を示す低酸素領域を有する固形腫瘍に対しても有効である可能性が示唆された。

以上の結果から、TRAILにより腫瘍細胞の放射線感受性が向上する事が明らかとなり、この放射線感受性の上昇は低酸素状態に大きく左右されない事が示唆された。本実験は低酸素条件下でのTRAILを使用した放射線感受性の増感に関して新しい知見を示すものであり、腫瘍組織への新規の放射線治療法の基礎研究となるものである。

学位論文審査の要旨

主 査 教 授 稲 波 修
副 査 教 授 昆 泰 寛
副 査 教 授 滝 口 満 喜
副 査 准教授 浅 沼 武 敏

学 位 論 文 題 名

低酸素腫瘍細胞における TRAIL による 放射線誘発アポトーシスの増強効果に関する研究

固形腫瘍の放射線治療や制がん剤治療の際、治療効率を妨げる大きな問題の一つに固形腫瘍内の低酸素性腫瘍細胞の存在があげられる。低酸素細胞は放射線や制がん剤に対して抵抗性を示し、生残した腫瘍細胞は再増殖、転移等の原因となることから、低酸素細胞にも効果のある新たな治療法の開発が強く求められている。最近、アポトーシスを誘導する受容体DR5が低酸素条件や放射線照射によって腫瘍の細胞膜上に高発現するということが報告された。申請者はこの報告に着目し、DR5に対するリガンドTRAILを腫瘍細胞に作用させることで、この低酸素腫瘍細胞の放射線抵抗性を向上させられるのではないかと考え、培養細胞系ならび移植腫瘍系の実験を行った。

ヒト肺腺がん由来A549細胞にTRAILとX線照射を大気中で併用処置をすると、無処置群や単独処置群と比較してDR5の細胞膜への発現上昇とカスパーゼ8とカスパーゼ3を介したアポトーシス細胞の増加を起こすことが示された。さらに、低酸素条件下での併用処置でも無処置群や単独処置群と比較してDR5の発現上昇とアポトーシス細胞数の有意な増加が観察された。コロニー形成法によるX線照射した腫瘍細胞の生存率曲線解析では、大気条件下・低酸素条件下の両条件でTRAILの添加による生存率の有意な減少が見られた。次に、ヒト胃腺がん由来MKN45細胞(野生型Tp53)とMKN28細胞(変異型Tp53)のマウス移植腫瘍モデルを用いて腫瘍成長曲線を検討したところ、TRAILとX線照射の併用処置では無処置群と比べて有意にDR5発現上昇と腫瘍成長を抑制した。腫瘍組織の免疫組織化学による解析の結果、アポトーシスの誘導ならびにアポトーシス実行因子であるカスパーゼ3の活性化が起きている事が明らかになった。さらに、低酸素マーカーであるピモニダゾールによる腫瘍組織内の低酸素領域の検討の結果、TRAILとX線照射の併用処置群で全体の腫瘍に占める低酸素領域の面積の減少が観察された。これらの結果から、大気条件下でも低酸素条件下でもX線照射により腫瘍のDR5発現上昇が起こるとともに、TRAILと放射線照射の併用処置により固形腫瘍細胞にアポトーシス誘導と増殖遅延を誘導できる事が明らかになった。このアポトーシス誘導と腫瘍成長抑制が腫瘍細胞のTp53が野生型か変異型であ

るかに関係なく起きることから、この併用処置が多くの放射線抵抗性腫瘍細胞に対して有効である可能性を示している。

以上の結果はTRAILを照射時に併用することで放射線抵抗性の低酸素腫瘍細胞に対しても放射線感受性を高める新しい方法を示すものであり、新規放射線治療法開発のための重要な基礎研究となるものである。よって審査員一同は、上記博士論文提出者高橋桃子の博士論文は、北海道大学大学院獣医学研究科規定第6条の規定による本研究科の行う博士論文の審査等に合格と認めた。