

## 機関リポジトリ登録用論文の要約

論文提出者氏名	腫瘍制御科学領域 放射線腫瘍学分野 氏名：一瀬 浩司
<p>(論文題目) <b>Complementary killing effect of tirapazamine in combination with radiation therapy on cells with high aldehyde dehydrogenase activity in SAS cell line</b></p> <p>(アルデヒドデヒドロゲナーゼ高活性 SAS 細胞に対する放射線療法とチラパザミンの相補的殺細胞効果)</p>	
<p>(内容の要約)</p> <p>近年、放射線治療技術の高精度化に伴い腫瘍への線量集中性は向上している。しかし、投与線量の増加のみでは腫瘍内の放射線抵抗性分画に抗することは困難である。従って、放射線治療の有効性を改善するためには、腫瘍内の低酸素分画や癌幹細胞様細胞といった放射線抵抗性分画を標的とした増感法を確立することが重要である。既存の報告において、aldehyde dehydrogenase (ALDH)高活性の腫瘍細胞 (ALDH<sup>high</sup> cells) は腫瘍内の低酸素状態によって誘導され、放射線抵抗性、腫瘍再発、および転移の要因となり得ることが示されてきた。よって、放射線治療の抗腫瘍効果を向上させる上で、ALDH<sup>high</sup> cells を標的としてこれらの制御を図ることは合理的であると言える。そこで本研究では、ALDH<sup>high</sup> cells に対する X 線照射と低酸素細胞毒チラパザミンの併用による抗腫瘍効果を <i>in vitro</i> で評価した。</p> <p>はじめに、チラパザミンの低酸素選択的な細胞毒性を評価する目的で、5 種類のヒト頭頸部癌細胞株 SAS、Ca9-22、HO-1-u-1、HSC-2、HSC-3 の単層培養細胞に対して通常酸素下(21%O<sub>2</sub>)あるいは低酸素下(1%O<sub>2</sub>)で 40 μM のチラパザミンを投与し、24 時間後にトリパンプルーアッセイを用いて細胞生残率を評価した。全ての細胞株において低酸素下で有意に細胞毒性が増強した。本研究では単層培養細胞に加えて、腫瘍内の微小環境をより再現した 3 次元腫瘍スフェロイドモデルを用いた検討を行った。しかし、Ca9-22、HO-1-u-1、HSC-2、HSC-3 の 4 細胞株は、スフェロイドから単細胞への分散の行程で細胞回収率が低下し、その後の検討に進むことが困難であった。そのため、以降の各検討ではスフェロイドから単細胞への分散が良好であったヒト舌扁平上皮癌細胞株 SAS を使用した。単層培養細胞、およびスフェロイドの低酸素分画を評価する目的でそれぞれの免疫組織染色を行ったところ、スフェロイドでは内部に hypoxia-inducible factor-1α (HIF-1α)陽性領域が検出された。また、Real-time PCR を用いて低酸素関連遺伝子の増幅を評価したところ、HIF-1α 依存性に活性化される carbonic anhydrase IX (CAIX)遺伝子が、単層培養細胞に比べスフェロイドで有意に発現していた (<math>P &lt; 0.01</math>)。次に、フローサイトメトリーを用いてそれぞれの構成細胞における ALDH<sup>high</sup> cells の割合を評価した結果、単層培養細胞と比較してスフェロイドにおいて有意に高値を示した (<math>26.83\% \pm 2.71\%</math> vs. <math>37.85\% \pm 1.39\%</math>, <math>P = 0.02</math>)。従ってスフェロイドは内部に低酸素分画を有し、また ALDH<sup>high</sup> cells の割合が増加していることが分</p>	

かった。続いて X 線照射後のコロニー形成能を評価したところ、スフェロイドは放射線抵抗性を示す傾向があった。スフェロイド内の低酸素分画や ALDH<sup>high</sup> cells の存在が、放射線抵抗性の背景にある可能性が考えられた。チラパザミンが ALDH<sup>high</sup> cells に与える効果を評価するために、40 μM のチラパザミン投与下でスフェロイドに 6 Gy の X 線照射を行い、24、48、および 72 時間後に、フローサイトメトリーを用いて残存する ALDH<sup>high</sup> cells の分画を分析した。また、照射 72 時間後のスフェロイドの凍結切片を作製し免疫組織染色を行うことで、HIF-1α 陽性領域および ALDH1 陽性領域を評価した。さらに X 線照射との併用におけるチラパザミンの抗腫瘍効果についてコロニー形成試験を用いて評価した。照射 72 時間後、X 線照射単独群ではスフェロイド内部に局在する HIF-1α 陽性領域において ALDH<sup>high</sup> cells は維持されたが、チラパザミン+X 線照射群ではこれらの ALDH<sup>high</sup> cells は減少した。さらにコロニー形成試験の結果、X 線照射とチラパザミンの併用はスフェロイドに対して相加的な細胞毒性効果を示した (X 線照射単独,  $0.061 \pm 0.016$ ; チラパザミン単独,  $0.222 \pm 0.090$ ; チラパザミン+X 線照射,  $0.008 \pm 0.003$ )。一方、単層培養細胞ではこの効果は認められなかった。X 線抵抗性の ALDH<sup>high</sup> cells をチラパザミンが減少させたことが、スフェロイドにおける相加的な抗腫瘍効果の背景にある可能性が考えられた。

低酸素腫瘍に対する放射線治療におけるチラパザミンの併用は、放射線抵抗性、再発および転移に関与する可能性のある ALDH<sup>high</sup> cells を制御し得る合理的なアプローチであると考えられた。