

学位請求論文の内容の要旨

領 域	放射線技術科学	分 野	
氏 名	長谷川 和輝		
(論文題目)	4-メチルウンベリフェロンによる放射線抵抗性癌細胞の放射線増感効果の検討		
主 査	敦賀 英知		
副 査	千葉 満		
副 査	吉野 浩教		
副 査	細川 洋一郎		
<p><b>【序論】</b>放射線治療は高精度線量計算技術の発展によって、非侵襲的に良好な局所制御が得られることから、手術や化学療法と並び、癌治療における重要な位置を占めている。しかし近年では、分割療法中に癌細胞集団の一部が放射線抵抗性を獲得し、再発や遠隔転移を引き起こすことが問題視されている。現在、放射線抵抗性細胞に有効な薬剤や治療戦略は確立されておらず、放射線治療の予後改善のためにはこの課題解決は急務である。放射線抵抗性の誘導は、放射線照射によるinterleukin (IL)-6やnuclear factor kappa B (NF-<math>\kappa</math>B)の発現上昇、superoxide dismutase (SOD)活性の増強による抗酸化活性によることが報告されている。一方で、ヒアルロン酸 (HA)合成阻害剤として知られている4-methylumbelliferone (4-MU)は、様々な癌細胞で抗腫瘍/転移効果を示すことが報告されている。さらに、X線照射及び4-MU併用は、IL-6やIL-1<math>\beta</math>などの炎症性サイトカインを抑制することで抗炎症効果を促進し、さらに抗酸化活性に関与する細胞間コミュニケーションを抑制することが示されている。これら先行研究の結果から、4-MUは放射線抵抗性細胞に対する放射線増感剤として期待される。そこで本研究では、長期的な分割照射により放射線抵抗性を獲得した口腔扁平上皮癌細胞株を使用し、4-MUの放射線増感剤としての効果を検討した。</p> <p><b>【方法】</b>ヒト口腔扁平上皮癌細胞株HSC2、HSC3それぞれに対して2 Gy/dayで1年以上分割照射を行い、放射線抵抗性を獲得した細胞株であるHSC2-R、HSC3-Rを樹立した。それぞれの細胞株に対して、4-MU投与による放射線感受性の変化をコロニー形成アッセイにより評価した。4-MUはdimethylsulfoxide (DMSO)に溶解し、使用濃度は500<math>\mu</math>Mとした。薬剤投与後に2 Gy X線照射 (150 kVp、20mA、0.5 mm Al + 0.3 mm Cu、1.0 Gy/min)を行い、10% FBS、1% penicillin/streptomycin含有RPMI1640培養液にて10-14日間培養後、細胞をメタノールで固定、ギムザ染色を行い、50細胞以上から成るコロニー数を計数</p>			

(注) 論文題目が外国語の場合は、和訳を付すこと。

【細則様式第1-2号続き】

した。次に、4-MUによる細胞遊走の変化を創傷治癒アッセイにより評価した。細胞をコンフルエントまで培養し、無血清培養液に交換後、細胞接着面を一直線に引っ掻き創傷を作成した。4-MU投与と同時に上皮成長因子 (EGF)/線維芽細胞成長因子 (bFGF) を外因的に20 ng/mlずつ投与し、0、6、12、24時間後の創傷幅を観察した。また、4-MU投与またはX線照射併用時の癌幹細胞マーカー発現、活性酸素種 (ROS)の平均蛍光強度 (MFI)及びSOD活性をフローサイトメトリー及びWST-SODアッセイで評価した。さらに、*Streptomyces hyaluronidase* (*St-Hyal*)投与による細胞外HAの除去あるいはsiRNAによるHA合成酵素 (HAS)のノックダウンによる影響を評価した。*St-Hyal*の使用濃度を決定するために、様々な濃度の*St-Hyal*を投与し、24時間後の培養上清中のHA濃度をELISAで測定した。標的とするHASは、qRT-PCR法によるmRNA発現測定により決定した。ノックダウン効率はウェスタンブロット法で確認した。

**【結果及び考察】**それぞれの細胞株に対する4-MU投与とX線照射併用時の放射線感受性の変化をコロニー形成アッセイで評価した。4-MU投与による細胞生存率は、コントロール細胞の生存率と比較して抑制されており、4-MUとX線照射併用はX線照射単独と比較して生存率を抑制した。しかしながら、4-MU投与による抗腫瘍効果は観察された一方で、放射線増感効果は誘導されなかった。また、4-MU投与時の細胞遊走能への影響を検証するために創傷治癒アッセイを行った結果、HSC2とHSC2-Rでは、12時間後、HSC3とHSC3-Rでは6時間後の時点で、それぞれのコントロールと比較して細胞遊走能が抑制された。また、EGF/bFGF投与下の細胞遊走率はそれぞれのコントロールと比較して増強されており、この場合でも4-MU投与によって細胞遊走が抑制されることが示された。

続いて、4-MU投与による抗腫瘍効果機序を評価するために、癌幹細胞マーカーとして知られているCD44/CD24発現およびROS MFIをフローサイトメトリーで評価した。癌幹細胞様分画割合はコントロールと比較して4-MU投与によって抑制された。4-MU投与によってCD44 MFIは抑制され、CD24 MFIは増強された。また、放射線抵抗性の獲得によって細胞内ROSレベルは抑制された。ROSレベルは4-MU投与直後から増強が確認され、その効果は投与後24時間まで持続した。次にSOD活性レベルをWST-SODアッセイによって評価したところ、HSC2-R、HSC3-RでのSOD活性はHSC2とHSC3と比較して増強されており、X線照射によってさらに増強されることが示された。興味深いことに、HSC2とHSC3のSOD活性は4-MU投与に影響されなかった一方で、HSC2-R、HSC3-Rでは、コントロールと比較して抑制された。また、すべての細胞株で、X線照射単独と比較して4-MU投与併用によってSOD活性は抑制された。これらの結果から、4-MU投与は放射線抵抗性細胞に対して放射線増感効果を誘導しないが、癌幹細胞様表現型の抑制と酸化ストレスを活性させることで抗腫瘍効果を増強し、放射線抵抗性細胞を効果的に抑制できる可能性が示唆された。

4-MUによる放射線増感効果がHAの阻害によるものであるかを検討するために、*St-Hy*

al投与による細胞外HA除去あるいはsiRNAによるHASノックダウンを実施した。St-Hyal投与後24時間の培養上清中のHA濃度をELISAで測定したところ、検出限界以下であり、細胞外HAが完全に除去されていることが示された。そこで、他の研究をもとに、使用濃度を100 TRU/mLと決定した。また、siRNAでノックダウン標的とするHASを決定するために、それぞれの細胞株におけるHAS1-3 mRNA発現をqRT-PCR法で測定した。すべての細胞株でHAS1は検出限界位以下であり、HAS2発現よりもHAS3発現が高いことが示された。HAS3発現はHSC2、HSC3と比較してHSC2-R、HSC3-Rで高発現しており、4-MU投与によって発現が抑制されていたことから、siRNAノックダウンの標的をHAS3とした。それぞれの処理による放射線感受性の変化をコロニー形成アッセイで評価したところ、St-Hyal投与では細胞生存率が変化しなかった一方で、HAS3ノックダウンによる細胞生存率は、コントロールの細胞生存率と比較して抑制されており、HAS3ノックダウンによって放射線増感効果が増強されることが示された。さらに、HAS3ノックダウンによって、癌幹細胞様表現型の割合、CD44/CD24発現は、4-MU投与と同様の結果を示した。さらに、HAS3ノックダウンとX線照射併用はX線照射単独と比較して、SOD活性レベルを抑制しており、これらの結果は、HAS3が放射線抵抗性に寄与する重要な因子である可能性を示唆している。

口腔扁平上皮癌細胞ではCD44(+)/CD24(-)表現型が癌幹細胞様細胞であると報告されている。また、CD44は細胞膜上でシスチン-グルタミントランスポーターであるxCTを安定化させることで、ROSに対する防御機構を増強している。一般的にCD44のHA結合ドメインは細胞外に存在するため、HA/CD44相互作用には細胞外HAが主であり、下流のAkt経路を刺激することでCD44発現がさらに増強されるというフィードバックループが報告されている。しかし、St-Hyal投与によってCD44発現に影響がなかったことから、このシグナルフィードバックループが断ち切れず、CD44による抗酸化活性や癌幹細胞様特性が維持された可能性が考えられる。一方で、HAS3ノックダウンはCD44発現を抑制し、このフィードバックループを破綻させたことで放射線増感効果を誘導している可能性が示唆された。さらにHASは細胞内にもHAを合成し、細胞内にもHA結合ドメインを有する受容体であるRHAMMとの相互作用によって腫瘍形成を促進することが示されている。さらに、HAS3自体がTNF- $\alpha$ と相互調節ループを形成し、NF- $\kappa$ Bを介したシグナルを伝達することも報告されており、これらの知見は、HAS3により合成された細胞内HAとの相互作用あるいはHAS3の直接的な作用が放射線抵抗性に寄与していることを示唆している。

以上の結果から、放射線抵抗性細胞の放射線増感効果の増強には4-MU投与のみでは不十分であるが、HAS3を標的とすることによって酸化ストレス増強と癌幹細胞様表現型抑制を介した放射線増感効果が誘導される可能性が示唆された。

学位論文のもととなる研究成果としての筆頭著者原著

論文題目	4-methylumbelliferone enhances radiosensitizing effects of radioresistant oral squamous cell carcinoma cells via hyaluronan synthase 3 suppression
著者名	Kazuki Hasegawa, Ryo Saga, Kentaro Ohuchi, Yoshikazu Kuwahara, Kazuo Tomita, Kazuhiko Okumura, Tomoaki Sato, Manabu Fukumoto, Eichi Tsuruga, Yoichiro Hosokawa
掲載学術誌名	Cells
巻, 号, 項	11 巻 23 号 3780 項
掲載年月日	2022 年 11 月