

細則様式第 1－2 号

学位請求論文の内容の要旨

領 域	放射線技術科学領域	分 野	
氏 名	嵯峨 涼		
(論文題目) Regulation of radiosensitivity in human fibrosarcoma cells by 4-methylumbelliferone (4-メチルウンベリフェロンによるヒト線維肉腫細胞の放射線感受性調節)			
主 査	中村 敏也		
副 査	敦賀 英知		
副 査	千葉 満		
副 査	細川 洋一郎		
<p>【序論】</p> <p>放射線治療の技術発展により、原発性固形腫瘍に対する線量投与は高精度に行うことが可能となった。しかし、放射線照射に耐性を有する残存癌細胞は、再発または遠隔転移を引き起こし、予後不良に繋がる。4-メチルウンベリフェロン (4-MU)は、ヒアルロン酸合成阻害効果によって、前立腺癌や肝臓癌など様々な癌細胞に対し、抗腫瘍及び抗浸潤効果を示すことが報告されている。また、4-MUはinterleukin (IL) -6及び-8などの炎症性サイトカインを抑制することも示されている。癌細胞における炎症性サイトカインの主要な調節因子であるnuclear factor kappa B (NF-κB)の発現上昇は、アポトーシスや放射線治療に対し抵抗性を獲得することに繋がる。さらに、IL-6は癌幹細胞と密接に関連していることから、治療標的として注目されている。そこで、抗炎症効果を有する4-MUを放射線治療と併用することで、遠隔転移を防ぐだけでなく、放射線抵抗性細胞の感受性を向上することができると考えた。以前の研究により、ヒト線維肉腫細胞HT1080に対する2 Gy X線照射及び100 μM 4-MU併用は、コロニー形成能や転移能の指標であるmatrix metalloprotease (MMP)-2及び-9を抑制することを見出した。しかし、これらの効果機序は不明である。そこで本研究では、HT1080細胞における4-MUの放射線と併用した際の抗腫瘍効果及び抗浸潤効果に関連する因子を同定するために、網羅的なmRNA発現を解析した。</p>			

(注) 論文題目が外国語の場合は、和訳を付すこと。

【方法】

ヒト線維肉腫細胞HT1080に対して、4-MU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dimethyl sulfoxide (DMSO)に溶解し、使用濃度は500 μ Mとした。X線照射は、4-MUを投与した後に0-6 Gy (150 kVp、20 mA、0.5 mmAl + 0.3 mmCu、1.0 Gy/min)照射し、10 % FBS、1 % penicillin/streptomycin含有RPMI1640培養液にて10-14日間培養した。培養後は、メタノールで固定した後にギムザ染色を行い、コロニー数をカウントした。また、4-MU投与またはX線照射併用時におけるmRNA発現変動をcDNAマイクロアレイにより評価した。4-MU投与または2 Gy X線照射処理から24時間後の細胞を回収しトータルRNAを抽出後、mRNAの網羅的発現解析を行った。mRNA発現のデータはingenuity pathway analysis® (IPA)によるシグナル伝達経路解析を行い、4-MUによる影響を検証した。シグナル伝達経路を構成する遺伝子の内、4-MUにより影響を受けている遺伝子はリアルタイムPCR法により再現性を検討した。また、培養上清中の炎症性サイトカインの濃度はELISA法により定量を行った。

【結果及び考察】

ヒト線維肉腫細胞HT1080に対する4-MU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法により検証した。0-6 Gy X線照射した細胞生存率と比較すると、4-MU併用群では各線量間で有意に細胞生存率が減少した。4-MU併用した際の細胞死増強効果を確認するために、annexin V及びPI染色によりアポトーシス細胞を測定した。Annexin V及びPI陽性細胞の割合は4-MU投与または2 Gy X線照射処理から6時間後に最も増加し、2 Gy X線照射単独 (9.12 ± 0.52 %)及び4-MU単独投与 (10.13 ± 0.03 %)に比べて併用群で有意にアポトーシス細胞が増加した (12.58 ± 0.23 %)。これらの結果から、4-MUがHT1080に対するX線照射の致死効果を向上させることが示唆された。

続いて、4-MU及びX線照射併用時の網羅的なmRNA発現を調べるためにマイクロアレイ解析を行った。コントロールに比べて変動があった遺伝子の数はそれぞれ4-MU単独で2,873、2 Gy X線照射単独で4,085、併用で3,179だった。IPAによるシグナル伝達経路解析により変動した遺伝子を既知のシグナル伝達経路に当てはめた際に、その経路を活性化するのかどうかをz-scoreにて判定した。その結果、2 Gy X線照射単独で

【細則様式第 1－2 号続き】

IL-6やIL-8及びToll-like receptor signalingのような炎症に関わる伝達経路が活性化されている一方で、4-MUが投与されると不活性化されることが明らかとなった。さらに上流遺伝子解析の結果より、炎症に関わる遺伝子の中でも特にIL-1 α 及びIL-1 β が抑制されていることが明らかとなった。マイクロアレイ解析結果の再現性として、IL-1 α 、IL-1 β 及びIL-6のmRNA発現をリアルタイムPCR、培養上清中の濃度をELISAにて測定した。X線照射単独処理群におけるIL-1 α 及びIL-1 β のmRNA相対発現量はコントロール群と比べて約2倍増加した一方で、4-MUが投与されると約4割まで減少した。培養上清中のIL-1 β 濃度はmRNA発現と同様の傾向を示した。しかし、IL-1 α の培養上清中濃度は、mRNA発現傾向とは逆に4-MU投与群でコントロール群の約3倍上昇した。4-MU処理または2 Gy X線照射から24時間後のみの測定のため、IL-1 α が4-MUにより安定化しているのか、もしくは24時間以内にmRNA発現が著しく増加しているのかは不明である。IL-6のmRNA相対発現量は2 Gy X線照射するとコントロール群と比較して1.7倍上昇したが、4-MU投与により0.8倍減少した。培養上清中のIL-6濃度も同様の傾向を示した。これらの結果から、4-MUはIL-1 β 産生の抑制を介して、X線照射により誘導されるIL-6発現及び産生の増加を抑制することが示唆された。

ヒアルロン酸はヒアルロニダーゼや酸化ストレスによって切断され、マクロファージの活性を刺激し、ヒアルロン酸/CD44の相互作用を介してIL-1 β のような炎症性サイトカイン放出を促進することが報告されている。また、IL-1 β 及びTumor necrosis factor (TNF) α はSOD2を誘導し、細胞内で生成した活性酸素を分解することが示されている。X線照射による主な細胞殺傷作用は、活性酸素種 (ROS) またはフリーラジカルを生成し、間接的または直接的にDNA鎖を切断することである。したがって、4-MUによるIL-1 β 抑制効果は、細胞内にROSの蓄積を促すことによって放射線の殺傷効果を向上している可能性が示唆された。

以上の結果より、4-MUは炎症性サイトカインIL-1 β 及びIL-6の産生を阻害することによって、HT1080細胞の放射線感受性を向上させたことから、放射線治療の有効性は4-MUとの併用により増強できる可能性が示唆された。

【細則様式第 1－2 号続き】

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	Regulation of radiosensitivity by 4-methylumbelliferone via suppression of interleukin-1 in fibrosarcoma cells
著 者 名	Ryo Saga, Kazuki Hasegawa, Kosho Murata, Mitsuru Chiba, Toshiya Nakamura, Kazuhiko Okumura, Eichi Tsuruga, Yoichiro Hosokawa
掲載学術誌名	Oncology Letters
巻, 号, 項	17: 3555-3561
掲載年月日	2019 年 2 月 6 日