HOKKAIDO UNIVERSITY

Title	放射線治療感受性とHIF-1及びNotch pathwayの関連性の検討［全文の要約］
Author(s)	池澤, 靖元
Description	この博士論文全文の閲覧方法については、以下のサイトをご参照ください。　配架番号：2070 https://www.lib.hokudai.ac.jp/dissertations/copy-guides/
Degree Grantor	北海道大学
Degree Name	博士(医学)
Dissertation Number	甲第11198号
Issue Date	2014-03-25
Doc URL	https://hdl.handle.net/2115/55680
Type	doctoral thesis
File Information	Yasuyuki_Ikezawa_summary.pdf

Hokkaido University Collection of Scholarly and Academic Papers : HUSCAP

学位論文（要約）

放射線治療感受性と HIF-1 及び Notch pathway の関連性の検討

（ The analysis of the association of the radiosensitivity and HIF-1 and Notch pathway）

2014 年 3 月

北海道大学

池澤　靖元

【背景・目的】Notch pathway は癌細胞の増殖、浸潤と密接に関連しているシグナル伝達経路である。我々は非小細胞肺癌（NSCLC）において放射線照射により Notch 及びその標的遺伝子の発現の増強、さらに放射線と Notch inhibitor であるγ-secretase inhibitor (GSI)の併用療法による有意な腫瘍増殖の抑制を報告し、Notch pathway の活性化が放射線抵抗性に関連している可能性を示した。しかし放射線照射後に Notch が活性化される機序についての詳細な検討はなく、今回我々は放射線抵抗性の重要な因子としての HIF (Hypoxia Inducible Factor 低酸素誘導因子)に注目した。今までに低酸素環境下において癌幹細胞の維持において HIF-1α が Notch intracellular domain と結合し Notch1 を安定化し Notch の下流遺伝子の活性化を起こす報告やグリオブラストーマの細胞株で HIF-1α により Notch の活性化が起こり腫瘍の成長を促進するといった報告がある。このように HIF-1α と Notch pathway の関連性が示唆されており、今回我々は放射線照射後に Notch pathway が増強されるメカニズムに HIF-1α が関連している可能性を考慮し、照射後に Notch が誘導される機序として HIF 及び Notch pathway の関連性、さらに HIF および Notch の放射線治療感受性に対する影響を検討した。

【材料と方法】Notch を発現している 2 種類の NSCLC 細胞株（H460、HCC2429）を用いて実験を行った。低酸素環境下における放射線治療後の Notch 及び HIF pathway の変化をウエスタンブロット法及び real time RT-PCR 法を用いて検討した。また HIF-1α siRNA を用いて HIF-1α を抑制した場合に、放射線照射後の Notch pathway に与える影響について検討した。Notch3 と HIF-1α との結合に関し免疫沈降法を使用し検討した。低酸素環境下における放射線と GSI および HIF inhibitor (YC-1)併用による抗腫瘍効果の検討では *in vitro* では MTT assay を用いて IC_{50} の比較検討を行った。さらにヌードマウスに H460 腫瘍細胞を皮下注射しゼノグラフトマウスモデルを作成し、マウスを放射線照射、GSI、YC-1 投与単独または併用群に分けて治療を行い、腫瘍サイズの測定と腫瘍組織における Notch、 HIF 蛋白発現の検討をウエスタンブロット法や免疫染色法で行った。

【結果】放射線照射後に低酸素環境で培養を行ったところ、HIF-1α は照射 6 時間後をピークに発現が認められ、その後減弱した。ただ HIF-1α の発現に関しては未照射群との比較で照射による有意な発現の増強は認められなかった。Notch 3 は未照射群でも低酸素環境培養で発現の増強を認めたが、照射群では照射後 24 時間をピークに発現がさらに増強した。また Notch pathway の標的遺伝子である HEY1 mRNA 及び HIF

pathway の標的遺伝子である VEGF 蛋白に関しても照射後低酸素培養 24 時間後に発現の増強を認めた。他の Notch family 及び標的遺伝子の HES1 の増強は認めなかった。この放射線照射による Notch pathway の増強に関して、siRNA を用いて HIF-1α を抑制すると放射線未治療群と比較して放射線治療群においてより強く Notch3 および HEY1 が抑制された。これらの結果から放射線照射後 HIF-1α を介して Notch3 活性化が生じる可能性が示唆された。HIF-1αと Notch3 の結合を検討するために免疫沈降を行った。H460 及び HCC2429 細胞に対して放射線照射施行後低酸素培養を行い、抗 HIF-1α 抗体で免疫沈降し 1 次抗体として NICD3 抗体を用いたウエスタンブロット法によって、明らかな結合を認める事ができなかった。*in vitro* での低酸素環境下で放射線と YC-1 の併用効果に関して MTT assay を施行したところ、同時併用スケジュールでは YC-1 単独と比較し YC-1 の IC_{50} は低下したが逐次併用スケジュールではその効果を認めなかった。次に GSI と放射線の併用に関しては、低酸素環境下において放射線照射 24 時間後に GSI を併用する逐次併用においても、通常酸素環境下同様 GSI の IC_{50} の低下を認めた。さらに Fa-CI plot 作成による GSI と YC-1 の相加・相乗効果の検討を行ったところ照射の有無にかかわらず両薬剤の相乗効果を認めた。これら *in vitro* の結果を踏まえ、*in vivo* の検討において YC-1 と GSI 2 剤併用は放射線治療感受性を増強し腫瘍増殖を有意に抑制した。その際の腫瘍組織において、放射線照射による Notch3 の発現増強は YC-1 と GSI 2 剤の併用治療により最も減弱した。また併用治療においてマウスの体重減少などの副作用は認めなかった。

【考察】HIF は放射線抵抗性の重要な要因として多数報告されている転写因子である。また低酸素状態において HIF-1α と Notch pathway の関連性を示唆する報告が散見される事より、放射線照射後に Notch pathway が増強されるメカニズムへの HIF-1α の関連性を検討した。*in vitro* の検討において、低酸素環境下で siRNA により HIF-1α を抑制すると放射線未施行群では Notch3・HEY1 の発現は変化なかったが、放射線施行群で Notch3 及び HEY1 活性は強く抑制された。さらに YC-1 投与により放射線未施行時には Notch3 の発現抑制を認めなかったが、放射線照射により活性化した Notch3 発現は抑制された。これらの結果より放射線照射後 HIF-1α を介し Notch pathway が活性化されると考えられた。YC-1 は放射線増感作用があることが報告されており放射線との併用療法がしばしば検討される。その際に放射線との併用において YC-1 を適切なタイミングで投与し HIF の発現を抑制することが重要であり、逆に不適切なタイミングでは効果が減弱するという報告がある。本研究でも *in vitro* におい

て放射線と YC-1 の併用スケジュールを検討した際に、同時併用群が他の逐次治療群よりもより高い併用効果を示した。また放射線との併用治療における投与スケジュールの重要性は GSI に関しても同様であり、以前我々は GSI に関して通常酸素下において照射 24 時間後に GSI を投与する逐次スケジュールのほうが他のスケジュールと比較してより高い腫瘍増殖抑制効果を示す事を報告したが、今回低酸素環境下における逐次治療スケジュールの検討でも同様に増殖抑制効果を示した。これらを踏まえた *in vivo* での検討でも GSI・YC-1 を併用した場合にもっとも強い放射線感受性を認めた。その際の腫瘍組織の検討において、GSI・YC-1 の併用が放射線照射により活性化された Notch3 蛋白の発現を最も抑制したことから、放射線治療によって増強した Notch の抑制が放射線感受性を高めることが示唆された。このような報告は今までになく今回の結果から放射線治療時の Notch-HIF pathway が治療標的なりうることが考えられた。

【結論】肺癌細胞株における放射線照射後の Notch Pathway の増強に関し siRNA を用いて HIF-1α を抑制した細胞において、放射線未照射群と比較して放射線照射群において Notch3 およびその標的遺伝子の HEY1 がより強く抑制された事や、放射線とこれらいずれか単剤を併用した場合より両者を併用した場合に Notch3 の発現がより強く抑制されたことから、放射線照射によって Notch3 が増強される機序に HIF-1α の関連が示唆された。抗腫瘍効果に関して、GSI と YC-1 を併用することで Notch 発現肺癌細胞に対して高い放射線感受性を示した。その際放射線照射による Notch 発現の増強は両者の併用治療にてより強く減弱していた。これらの結果から放射線照射にこれら 2 剤を併用する治療は非小細胞肺癌患者の新たな治療戦略の 1 つとなる可能性が考えられた。