

## 学位論文内容の要旨

博士の専攻分野の名称 博士 (医 学) 氏名 池澤 靖元

### 学位論文題名

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)

【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  $\gamma$ -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で Notch が HIF を介して活性化されるとの報告があり、照射後に Notch が誘導される機序、さらには放射線治療における HIF 及び Notch pathway の関連性を検討した。

【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-1 $\alpha$  siRNA を用いて、HIF-1 $\alpha$  抑制が放射線照射後の Notch pathway に与える影響について検討した。Notch3 と HIF-1 $\alpha$  との結合に関し免疫沈降法を使用した。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<sub>50</sub> 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下培養を行ったところ、HIF-1 $\alpha$  は照射 6 時間後、Notch 3 及びその標的遺伝子である HEY1 が照射 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-1 $\alpha$  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-1 $\alpha$  を介して Notch3 活性化が生じる可能性が示唆された。*in vitro* では、低酸素環境下で放射線と YC-1 の同時併用において YC-1 単独と比較し YC-1 の IC<sub>50</sub> は低下したが、逐次併用ではその効果を認めなかった。GSI と放射線の併用において放射線照射 24 時間後に GSI を併用する逐次治療において GSI の IC<sub>50</sub> の低下を認めた。これら *in vitro* の結果を踏まえた *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 及び HIF-1 $\alpha$  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-1 $\alpha$  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-1 $\alpha$  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-1 $\alpha$  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 活性化は強く抑制された。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-1 $\alpha$  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。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 や HIF-1 $\alpha$  蛋白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 や HIF 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】** 今回の検討で低酸素下における放射線治療後、HIF を介して Notch pathway が活性化され GSI と YC-1 を用いて放射線治療時に Notch を抑制することでより高い腫瘍増殖抑制効果を得た。更なる実験データや臨床試験が必要ではあるが、今回の併用治療では重篤な副作用発現は認めず、放射線との併用は実現可能と考えられ、今後の新たな治療選択の一つとなりえると考えられた。