

課題番号	LS071
------	-------

**先端研究助成基金助成金(最先端・次世代研究開発支援プログラム)
実施状況報告書(平成24年度)**

本様式の内容は一般に公表されます

研究課題名	放射線治療抵抗性がん細胞の腫瘍内局在・動態の解明とイメージングプローブの開発
研究機関・ 部局・職名	京都大学・学際融合教育研究推進センター 生命科学系キャリアパス形成ユニット・ 講師
氏名	原田 浩

1. 当該年度の研究目的

1. 生体光イメージングによる治療抵抗性分画の同定と動態解析

培養細胞を用いたこれまでの研究で、がん細胞の放射線抵抗性が細胞周期、低酸素環境、低グルコース、低 pH などをはじめとする要因の影響を受けることを確認してきた。また、各要因を定量化する手法を確立してきた。本年度は、これら要因が移植腫瘍内の複雑に入り組んだ微小環境下で如何に相俟ってがん細胞の放射線抵抗性を規定するのかを時空間的に解明する。そうして同定した治療抵抗性がん細胞に Cre-loxP システムで光標識を導入するシステムの確立を開始する。

2. 低酸素環境における HIF-1 活性制御メカニズムとがん幹細胞様形質誘導・維持メカニズムの解明

HIF-1 活性を“正”に制御する因子のスクリーニング実験で得た新規遺伝子につき、その腫瘍増殖に対する機能と作用機序を解明する。また、当該遺伝子が HIF-1 によるがん幹細胞様形質発現制御に作用するのかを解析する。

3. 治療抵抗性がん細胞を可視化するイメージングプローブの開発

前年度までに確立した「EPR 効果を利用してイメージングプローブを腫瘍部位にデリバリーする技術」と、申請者が持つ「低酸素・低 pH 環境下で蛍光色素を活性化する技術」を組み合わせ、イメージングプローブの候補物質を創出・最適化し、その有用性をインビボイメージング実験で評価する。

2. 研究の実施状況

1. 生体光イメージングによる治療抵抗性分画の同定と動態解析

腫瘍内の低酸素領域には、HIF-1 活性の程度が異なる2つの細胞群が存在する。そのうち HIF-1 陰性低酸素領域の中では、グルコース濃度の低下によって HIF-1 下流の細胞周期制御因子(p27^{kip1})の発現量が低下し、細胞周期が DNA 修復能の高い S 期に進行し、細胞が放射線抵抗性を獲得するというメカニズムを発見した(Fig. 1)。Cre/ER^{T2}-loxP システムを利用して当該細胞群の挙動解析を行った結果、これらの細胞群が実際に放射線治療を生き延びた後、HIF-1 活性を獲得して腫瘍血管へ向けて遊走し、がんの再発を引き起こす

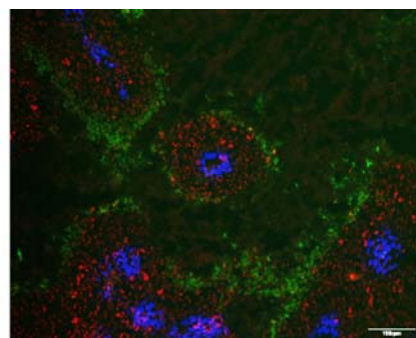


Fig. 1 血管(青)の遠位に存在する低酸素領域(緑)ではDNAが放射線障害(赤)を受けにくい。

というメカニズムを解明することに成功した。以上、平成 24 年度のみならず、25 年度の実施項目として設定していた目標をも完了した。

2. 低酸素環境における HIF-1 活性制御メカニズムとがん幹細胞様形質誘導・維持メカニズムの解明

前年度に得られた新規の HIF-1 活性化因子 HPF-1,2,3 がそれぞれ、「HIF-1 α タンパク質の安定化を介してグルコース代謝系を調整し、腫瘍増殖の亢進を導くこと」、「同じく HIF-1 α タンパク質の安定化を介して、がん細胞の転移能を亢進すること」、および「HIF-1 α mRNA の合成(転写)を活性化して、腫瘍血管新生を誘導すること」を解明することが出来た。また、HPFs の活性化による幹細胞様形質維持機構の存在を示唆するデータを得、平成 24 年度の実施項目として挙げていた目標を全て達成した。

3. 治療抵抗性がん細胞を可視化するイメージングプローブ(診断薬)の開発

前年度までに創出した「両親媒性高分子型イメージングプローブ」につき、色素分子を有するユニットの配置と、主鎖-色素間のリンカー長を調節することで、最大の蛍光量を得ることに成功した(Fig. 2)。また、各種の腫瘍集積ドメイン(active-targeting agent)を用いて比較検討した結果、環状 RGD ペプチドを用いた場合にプローブの腫瘍集積能が最大になり、インビボイメージングにおいて良好なイメージング像を得ることに成功した(Fig. 3 右: RGD ペプチド)。以上、悪性腫瘍イメージングプローブの開発につき、平成 24 年度の目標を達成した。

Fig. 2

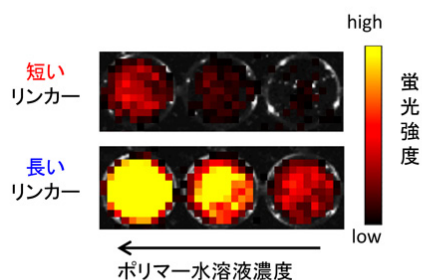
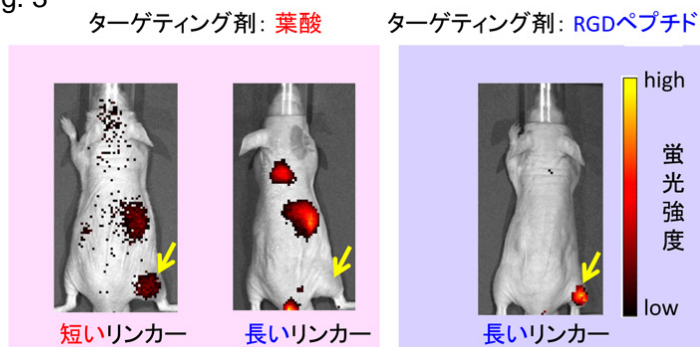


Fig. 3



3. 研究発表等

雑誌論文	(掲載済み一査読有り) 計 9 件 (*は責任著者を示す)
計 10 件	<ol style="list-style-type: none"> 1. Fujita M, Sasanuma H, Yamamoto KN, <u>Harada H</u>, Kurosawa A, Adachi N, Omura M, Hiraoka M, Takeda S, Hirota K. Interference in DNA replication can cause mitotic chromosomal breakage unassociated with double-strand breaks. <i>PLoS ONE</i>. 8:e60043. doi: 10.1371/journal.pone.0060043. 2013. http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23573231 (ISSN: 1932-6203) 2. Yoshimura M, Itasaka S, <u>Harada H</u>, Hiraoka M. Microenvironment and radiation therapy. <i>Biomed Res Intl</i>. 2013: 685308-685320. 2013. http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23509762 (ISSN: 2314-6141 online) 3. Yeom CJ, Goto Y, Zhu Y, Hiraoka M, *<u>Harada H</u>. Microenvironments and Cellular Characteristics in the Micro Tumor Cords of Malignant Solid Tumors. <i>Int J Mol Sci</i>. 13:13949-13965. 2012. http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23203043 (ISSN: 1422-0067) 4. Miki K, Nakano K, Matsuoka H, Yeom CJ, <u>Harada H</u>, Hiraoka M, Ohe K. Amphiphilic Brush-Like Copolymers Involving Hydrophobic Amino Acid- and Oligopeptide-Side Chains for Optical Tumor Imaging In Vivo. <i>Bull Chem Soc Jpn</i>. 85:1277-1286. 2012._ http://www.csj.jp/journals/bcsj/bc-cont/b12dec/85_20120220.html 5. *<u>Harada H</u>, Inoue M, Itasaka S, Hirota K, Morinibu A, Shinomiya K, Zeng L, Ou G, Zhu Y, Yoshimura

様式19 別紙1

	<p>M, McKenna WG, Muschel RJ, Hiraoka M. Cancer cells that survive radiation therapy acquire HIF-1 activity and translocate towards tumour blood vessels. Nature Communications. 3:783 doi: 10.1038/ncomms1786. 2012. (前年度 in press であった論文) http://www.nature.com/ncomms/journal/v3/n4/full/ncomms1786.html (ISSN (online) 2041-1723)</p> <p>6. 小林稔, *原田浩. 低酸素ストレスと HIF. 生化学. 85:187-195. 2013.</p> <p>7. *原田浩. がんの再発機構が示す PET イメージングの方向性. Isotope News. 703:2-7. 2012.</p> <p>8. *原田浩. HIF とその調節系. 日本臨床. 増刊号. 分子標的薬. 113-118. 2012.</p> <p>9. 田邊一仁, 原田浩, 平岡真寛, 西本清一. 細胞内還元反応を活用した低酸素環境イメージング. 実験医学. 30:89-95.2012.</p> <p>(掲載済み一査読無し) 計 0 件</p> <p>(未掲載 = in press) 計 1 件</p> <p>10. Zhu Y, Zhao T, Itasaka S, Zeng L, Yeom CJ, Hirota K, Suzuki K, Morinibu A, Shinomiya K, Ou G, Yoshimura M, Hiraoka M, *Harada H. Involvement of decreased hypoxia-inducible factor 1 activity and resultant G1-S cell cycle transition in radioresistance of perinecrotic tumor cells. Oncogene. in press. http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22710721 (ISSN: 0950-9232)</p>
<p>会議発表 計 12 件</p>	<p>専門家向け 計 11 件</p> <ol style="list-style-type: none"> 1. 原田浩. 新規 HIF-1 活性化因子の治療標的としての有用性. 第 15 回癌治療増感研究シンポジウム. 招待講演. Feb. 9-10. 2013. 奈良. 国際がん治療増感研究協会主催 2. 原田浩. IDH3 は HIF-1α を安定化して腫瘍増殖を亢進する. 第 10 回がんとハイポキシア研究会. Dec 7. 2012. 横浜. がんとハイポキシア研究会主催. 3. 原田浩. 放射線腫瘍学における低酸素バイオロジー. 東京医科歯科大学キャンサーボード特別講演. Oct. 18. 2012. 東京. 東京医科歯科大学キャンサーボード主催. 4. Harada H. Cancer cells that acquire HIF-1 activity after radiation therapy predominantly cause local tumor recurrence. Radiation Research Society. Sep 30. 2012. 米国領プエルトリコ. 米国 Radiation Research Society 主催. 5. 原田浩. 放射線腫瘍学と低酸素バイオロジーの接点. 大阪大学第 11 回放射線治療セミナー(がんプロフェッショナル養成プラン特別講演). Sep 23. 2012. 大阪. 大阪大学がんプロフェッショナル養成プラン主催 6. Harada H. Cancer cells that acquire HIF-1 activity after radiation therapy predominantly cause local tumor recurrence; -An optical imaging research-. 日本癌学会における international session. 招待講演. Sep. 19. 2012. 札幌. 日本癌学会主催. 7. 原田浩. HIF-1 陰性低酸素がん細胞は S 期への細胞周期の移行により放射線抵抗性を獲得する. 第 55 回日本放射線影響学会学術総会. Sep 6. 2012. 仙台. 日本放射線影響学会主催. 8. 原田浩. がん細胞の動きを見る. 京都大学基礎物理学研究所主導研究会. Aug. 8. 2012. 京都. 京都大学基礎物理学研究所主催. 9. Harada H. Molecular Mechanisms behind Tumor Recurrence after Radiation Therapy; Lessons from Hypoxia Biology. the 31st Sapporo International Cancer Symposium 2012. 招待講演. Sapporo. July. 23-24. 2012. Sapporo Cancer Seminar Foundation 主催 10. 原田浩. HIF-1 陰性低酸素がん細胞は S 期への細胞周期の移行により放射線抵抗性を獲得する. 第 18 回国際がん治療増感研究会総会. 大阪. Jun 9. 2012. 国際癌治療増感研究協会主催 11. 原田浩. Molecular Mechanism behind Tumor Recurrence after Radiation Therapy. 京都大学大学院医学研究科・再生医療臓器再建医学コースミーティング. May 11. 2012. 京都. 京都大学大学院医学研究科大学院コース主催. <p>一般向け 計 1 件</p> <ol style="list-style-type: none"> 1. 原田浩. 『研究者の〇〇の話』. 出張京都大学アカデミックデイ. Mar 16-17. 2013. 科学技術フェスタ 2013@パルスプラザ京都
<p>図書 計 0 件</p>	<p>計 0 件</p>
<p>産業財産権 出願・取得状況 計 1 件</p>	<p>(取得済み) 計 1 件</p> <ol style="list-style-type: none"> 1. JP5093776-B2 (12 Dec 2012); EP2498426-A1 (12 Sep 2012); Kondoh S, Harada H, Hiraoka M, Yamada S, Hood D; Novel gene construct formed by integrating reporter gene into hypoxia responsive promoter, and integrating oxygen dependent degradation domain upstream to gene, useful for evaluating pathological

様式19 別紙1

	<p>condition of ischemic disease. (出願中) 計 1 件 1. PCT/JP2012/064964 (公告番号:WO2012176651 A1; 発明者:原田浩、平岡真寛; 出願人:国立大学法人京都大学) 発明の名称:「新規抗腫瘍剤及び新規抗腫瘍剤のスクリーニング方法」 出願日: 2012年6月12日</p>
Web ページ (URL)	<p>原田研究室ホームページ: http://radiotherapy.kuhp.kyoto-u.ac.jp/biology/ 国民との対話(出張:京都大学アカデミックデイ)実施状況の公開: http://www.science-festa.jp/introduction/kyoto-u.html http://radiotherapy.kuhp.kyoto-u.ac.jp/biology/report_130411.pdf</p>
国民との科学・技術対話の実施状況	<p>2013年3月16日～17日に開催された科学技術フェスタ(京都パルスプラザ: http://www.science-festa.jp/; 参加者総数5,958名)において、京都大学は『出張 京都大学アカデミックデイ』と題するブースを出展した。ここで本研究代表者は「研究者の〇〇の話」とのタイトルで対談を行い、幼稚園のお子さんから一般社会人の方々などを対象に研究成果を噛み砕いて紹介した。また、研究者を身近に感じて頂くために、研究者の生活スタイルや考えていること等についても対談形式で紹介した。当該アウトリーチ活動の様子を以下のホームページで公開した。 http://www.science-festa.jp/introduction/kyoto-u.html; http://radiotherapy.kuhp.kyoto-u.ac.jp/biology/report_130411.pdf</p>
新聞・一般雑誌等掲載計 2 件	<p>【新聞報道】 ①メディカルトリビューン (2012年7月26日 33面 放射線治療後のがん再発メカニズムを解明) 【テレビ報道】 ①韓国 KBS テレビ (2013年3月3日 KBSドキュメンタリー “Cancer”)</p>
その他	<p>研究室のホームページ内に、研究成果を噛み砕いて紹介するページを順次更新した。 http://radiotherapy.kuhp.kyoto-u.ac.jp/biology/NEXT%20Program.html 韓国の国営テレビ(KBS)の取材を受け、その模様が KBSドキュメンタリー“Cancer”で報道された。</p>

4. その他特記事項

特になし

実施状況報告書(平成24年度) 助成金の執行状況

本様式の内容は一般に公表されません

1. 助成金の受領状況(累計)

(単位:円)

	①交付決定額	②既受領額 (前年度迄の 累計)	③当該年度受 領額	④(=①-②- ③)未受領額	既返還額(前 年度迄の累 計)
直接経費	116,000,000	46,000,000	42,000,000	28,000,000	0
間接経費	34,800,000	13,800,000	12,600,000	8,400,000	0
合計	150,800,000	59,800,000	54,600,000	36,400,000	0

2. 当該年度の収支状況

(単位:円)

	①前年度未執 行額	②当該年度受 領額	③当該年度受 取利息等額 (未収利息を除 く)	④(=①+②+ ③)当該年度 合計収入	⑤当該年度執 行額	⑥(=④-⑤) 当該年度未執 行額	当該年度返還 額
直接経費	30,265	42,000,000	0	42,030,265	41,963,004	67,261	0
間接経費	13,800,000	12,600,000	0	26,400,000	6,750,000	19,650,000	0
合計	13,830,265	54,600,000	0	68,430,265	48,713,004	19,717,261	0

3. 当該年度の執行額内訳

(単位:円)

	金額	備考
物品費	17,188,073	ガス混合装置、バイオハザードセイフティキャビネット、バイオメディカルフリーザー、実験試薬、実験動物、細胞培養用試薬など
旅費	2,761,887	研究成果発表、共同研究合わせ旅費(米国放射線科学会議、ウブサラ大学での会議、日本癌学会など)
謝金・人件費等	13,384,362	博士研究員、技術員の人件費
その他	8,628,682	論文投稿料、研究外注費、研究機器保守・修理費用、研究資材運搬・輸送量、学会参加費など
直接経費計	41,963,004	
間接経費計	6,750,000	
合計	48,713,004	

4. 当該年度の主な購入物品(1品又は1組若しくは1式の価格が50万円以上のもの)

物品名	仕様・型・性能 等	数量	単価 (単位:円)	金額 (単位:円)	納入 年月日	設置研究機関 名
ガス混合装置 O2濃 度制御可能タイプ	トクケン社製 MIGM/OL-02T	1	1,417,500	1,417,500	2012/11/1	京都大学
バイオハザードセイフティキャ ビネットClass II Type A2	エスコ社製 AC-2N7	1	727,650	727,650	2013/3/22	京都大学
				0		