

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 25 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・医学部附属病院・特定准教授
氏名	原田 浩

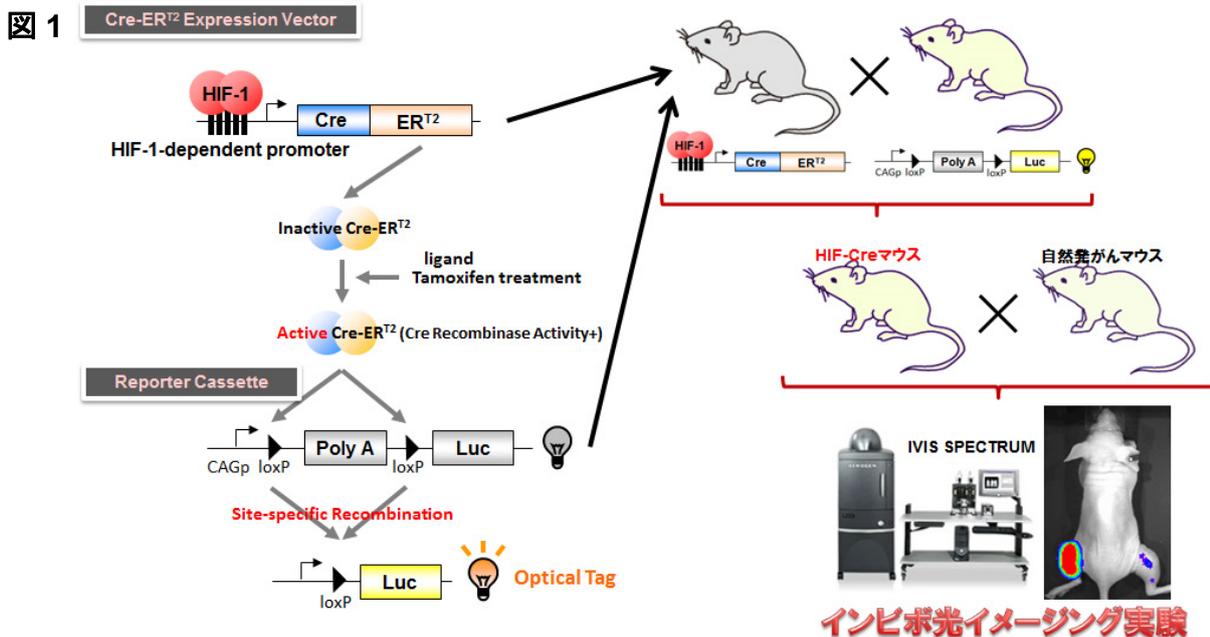
1. 当該年度の研究目的

<p>【テーマ 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】</p> <p>前年度までの研究で我々は、低酸素誘導因子 1(HIF-1)の活性が低い低酸素がん細胞(HIF-1 陰性低酸素がん細胞)が、有酸素がん細胞や HIF-1 陽性低酸素がん細胞と比較して放射線治療を有意に生き残ること、そしてこの細胞群が放射線治療後に HIF-1 活性を獲得して腫瘍血管に遊走し、最終的にがんの再発を導くことを解明した。本年は、(1)当該研究で構築した「治療抵抗性低酸素がん細胞に光標識を導入する Cre-loxP システム」を用いて遺伝子改変マウスを樹立し、(2)昨年までの研究で移植腫瘍を対象として明らかにした上述の再発機構が、自然発がんモデルにおいても機能しているのか否かを検証する系を確立する。</p> <p>【テーマ 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】</p> <p>①で樹立する遺伝子改変マウスを用いて、自然発症がん内部の低酸素環境ががん幹細胞様形質の誘導において重要な役割を担っているのか否かを、FACS とインビボ光イメージングシステムを用いて時間空間的に解析する系を確立する。また、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 HPF-1,2,3 につき、腫瘍増殖に対する機能と作用機序を解明する。同時に、当該遺伝子が HIF-1 によるがん幹細胞様形質の発現制御に作用するのかを解析する。</p> <p>【テーマ 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】</p> <p>「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「低酸素・低 pH 環境下で蛍光色素を活性化する技術」を利用して創出した新規イメージングプローブを、担がんマウスに投与、インビボイメージング実験を実施して、有用性を評価する。今後の開発に耐えうる候補物質を 1 つに絞り込む。</p>

2. 研究の実施状況

<p>【テーマ 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】</p> <p>「前年度までに確立した低酸素環境依存的 Cre-loxP システム」を利用して、遺伝子改変マウスを樹立した。このマウスと自然発がんマウスとを掛けあわせ、免疫組織染色実験とインビボ光イメージング実験を実施する系を確立した(図 1)。これにより、移植腫瘍と比較して臨床病態に近い自然発症がん内部で、治</p>

療抵抗性に関わる低酸素がん細胞が何処に局在し、腫瘍増殖過程や放射線治療後にどのような動態を示すのかを解明することが可能になった。

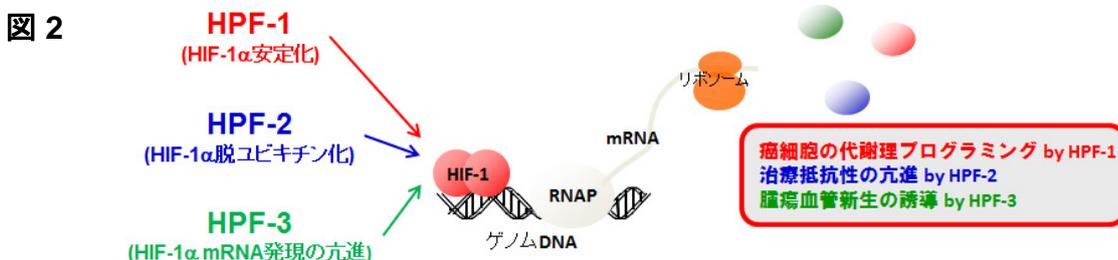


Harada et al. *Nature Communications*. 2012 より改編

【テーマ2: 低酸素環境における HIF-1 活性化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】

独自にスクリーニングした3つの新規 HIF-1 活性化遺伝子に関して、作用機序と腫瘍増殖への影響を評価した。(1)HPF-1 が HIF-1α タンパク質の安定化を介してがん細胞のエネルギー代謝リプログラミングを制御し、腫瘍増殖を亢進すること、(2)HPF-2 が HIF-1α の脱ユビキチン化を介してがんの転移能を亢進すること、(3)HPF-3 が HIF-1 遺伝子の転写 (HIF-1α mRNA の転写) を活性化して血管新生を誘導し、腫瘍増殖を促進することを明らかにした。また、HIF-1 活性化因子のスクリーニング実験をさらに繰り返すことによって、新規遺伝子 HPF-4 を同定することに成功した。また、HIFs の活性化によってがん肝細胞用形質が誘導されることを示唆するデータを得た。

①にて樹立した遺伝子改変マウスを利用して、自然発症がん内部で HIF-1 活性化細胞をトラッキングする系を確立した。がん幹細胞様形質獲得に対する上記新規遺伝子群の寄与を、FACS やインビボイメージングシステムを用いて検証する系を確立した。

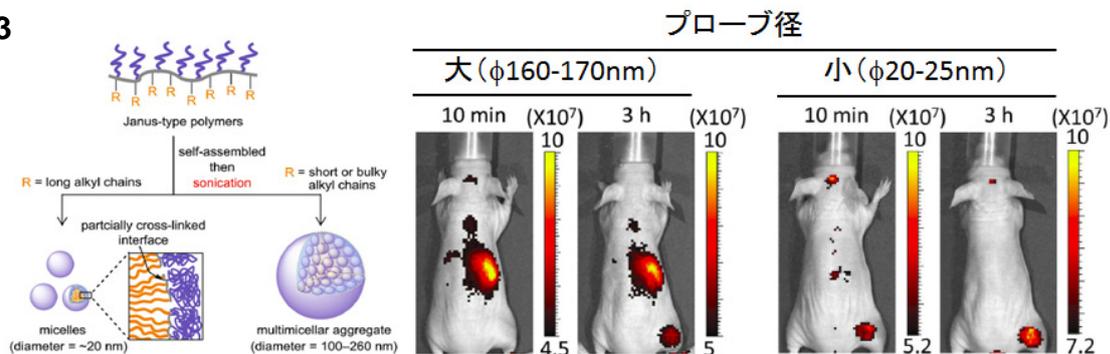


【テーマ3: 治療抵抗性がん細胞を可視化するイメージングプローブの開発】

前年度までに創出してきたプローブのサイズを最適化し、最終開発候補物質とすることを目指して研究を実施した。径の大きいプローブ (φ160-170nm) は血中滞留性が増大することによって緩やかに腫瘍に集積するものの肝集積が認められることを確認した。一方、プローブ径の小さいもの (φ20-25nm) は速やか

かつ特異的に腫瘍に集積することが明らかになった。以上、前年度までに実施した(1)低酸素応答性を担う官能基の最適化、(2)色素分子を有するユニットの配置、(3)主鎖-色素間のリンカー長、さらに(4)active-targeting agentの最適化と合わせ、本研究の目的通りに『イメージングプローブ開発候補物質』を創出、絞り込むことに成功した。

図 3



Miki et al. *Small*. in press.より改編

3. 研究発表等

<p>雑誌論文 計 7 件</p>	<p>(掲載済み一査読有り) 計 3 件</p> <ol style="list-style-type: none"> Zhao T, Zhu Y, Morinibu A, Kobayashi M, Shinomiya K, Itasaka S, Yoshimura M, Guo G, Hiraoka M, *Harada H. HIF-1-mediated metabolic reprogramming reduces ROS levels and facilitates the metastatic colonization of cancers in lungs. <i>Sci Rep.</i> 4:3793. 2014. http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24452734 (ISSN online: 2045-2322) Gaowa A, Horibe T, Kohno M, Sato K, Harada H, Hiraoka M, Tabata Y, Kawakami K. Combination of hybrid peptide with biodegradable gelatin hydrogel for controlled release and enhancement of anti-tumor activity in vivo. <i>J Control Release.</i> 176:1-7. 2014. http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24378440 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. <i>Oncogene.</i> 32:2058-2068.2013. http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22710721 (ISSN: 0950-9232) <p>(掲載済み一査読無し) 計 2 件</p> <ol style="list-style-type: none"> 原田浩. 光イメージングによる低酸素がん細胞の移植腫瘍内動態解析. 放影響ニュース. 75:6-7. 2013. http://www.rea.or.jp/kikaku/rea_news/rea_news_maim.htm 原田浩. 第 72 回 日本癌学会学術総会印象記. JASTRO Letter. 110: 34-35. 2013. <p>(未掲載) 計 2 件</p> <ol style="list-style-type: none"> Miki K, Hashimoto H, Inoue T, Matsuoka H, Harada H, Hiraoka M, Ohe K. Sonication-Induced Formation of Size-Controlled Self-Assemblies of Amphiphilic Janus-Type Polymers as Optical Tumor Imaging Agents. <i>Small</i>. in press. Ohnishi K, Tani T, Bando S, Kubota N, Fujii Y, Hatano O, Harada H. Plastic induction of CD133AC133-positive cells in the microenvironment of glioblastoma spheroid. <i>Int J Oncol.</i> in press.
<p>会議発表 計 21 件</p>	<p>専門家向け 計 18 件</p> <ol style="list-style-type: none"> Goto Y, Hiraoka M, Harada H. UCH-L1 functions in distant tumor metastasis as a deubiquitinating enzyme for HIF-1alpha. 第 16 回 癌治療増感研究シンポジウム Feb 7-8. 2014. [一般口演] 原田浩. 放射線腫瘍学における分子生物学的実験法. 日本放射線腫瘍学会 第 4 回生物学セミナー. Jan. 25. 2014. [招待教育講演] Harada H, Hiraoka M. Cancer cells that survive radiation therapy acquire HIF-1 activity and translocate towards tumor blood vessels. Keystone Symposia. Sensing and Signaling of Hypoxia:

	<p>Interfaces with Biology and Medicine. Jan 10. 2014. [ポスター発表]</p> <ol style="list-style-type: none"> 4. Goto Y, Hiraoka M, <u>Harada H</u>. UCH-L1 functions in distant tumor metastasis as a deubiquitinating enzyme for HIF-1alpha. Keystone Symposia. Sensing and Signaling of Hypoxia: Interfaces with Biology and Medicine. Jan 10. 2014. [ポスター発表] 5. <u>原田浩</u>, Zeng L、小林稔、後藤容子、広田喜一、南嶋洋司、平岡真寛. Aberrant expression of IDH3alpha promotes HIF-1-mediated aerobic glycolysis and angiogenesis and consequently enhances tumor growth. 第 11 回がんとハイポキシア研究会. Dec 12-13. 2013. [招待講演] 6. 後藤容子、Zeng L、谷本圭司、鳥井雅恵、戸井雅和、平岡真寛、<u>原田浩</u>. Ubiquitin C-terminal hydrolase-L1 (UCH-L1) provides a therapeutic opportunity to suppress cancer metastasis as a deubiquitinating enzyme for HIF-1alpha. 第 11 回がんとハイポキシア研究会. Dec 12-13. 2013. [ポスター発表] 7. <u>原田浩</u>. 新規低酸素誘導性因子 1(HIF-1)活性化因子の機能解析と治療標的としての有用性. 京都大学医学部附属病院 呼吸器外科セミナー. Dec. 9. 2013. [招待講演] 8. <u>原田浩</u>. 低酸素バイオロジーに基づく放射線治療の新展開. 北里大学がんプロセミナー. Nov. 23. 2013. [招待講演] 9. <u>原田浩</u>. 放射線生物学・最近の話題. 第 26 回 日本放射線腫瘍学会学術総会. Oct. 19. 2013. [教育講演] 10. <u>原田浩</u>. 低酸素がん細胞を治療標的とする根拠. 第 56 回日本放射線影響学会. Oct. 18. 2013. [招待講演・座長] 11. <u>Harada H</u>. Molecular Mechanism behind Tumor Radioresistance; Lessons from Hypoxia Biology. The 72nd Annual Meeting of the Japanese Cancer Association. Symposium #22: Toward the Improvement of Radiotherapy: Applications from the Molecular Biological Points of View. Oct 3-5. 2013. [招待講演] 12. 三木康嗣、橋本弘樹、井上達広、松岡秀樹、<u>原田 浩</u>、平岡真寛、大江浩一. 両親媒性 Janus ブラシ状ポリマーが形成する球状自己集合体の粒径制御と光腫瘍イメージングへの応用. 第 63 回高分子討論会. Sep 25. 2013. [ポスター発表] 13. <u>Harada H</u>, Zhu Y, Hiraoka M. Involvement of decreased HIF-1 activity and resultant G1-S cell cycle transition in radioresistance of perinecrotic tumor cells. The 59th Annual Meeting of Radiation Research Society. Sep 16. 2013. [ポスター発表] 14. <u>原田浩</u>. 低酸素バイオロジーで迫るがんの放射線抵抗性機構の解明. 第 42 回放射線による制癌シンポジウム. Jul. 5. 2013. [招待講演] 15. 井上実、朱宇熹、板坂聡、吉村通央、平岡真寛、<u>原田浩</u>. HIF-1 陰性低酸素がん細胞は S 期細胞周期移行により放射線抵抗性を獲得する. 第 19 回国際癌治療増感研究会. Jun 8. 2013. [ポスター発表] 16. 小林稔、曾麗華、後藤容子、井上実、板坂聡、吉村通央、平岡真寛、<u>原田浩</u>. IDH3 は HIF-1alpha を安定化して腫瘍増殖を亢進する. 第 19 回国際癌治療増感研究会. Jun 8. 2013. [ポスター発表] 17. <u>Harada H</u>, Zhao T, Zhu Y, Itasaka S, Hiraoka M. HIF-1 mediates metabolic reprogramming and supports distant tumor metastases. 第 19 回国際癌治療増感研究会. Jun 8. 2013. [招待講演] 18. <u>Harada H</u>. Molecular Mechanism behind Tumor Recurrence after Radiation Therapy; Lessons from Hypoxia Biology. The 3rd Asian Congress of Radiation Research. May 13. 2013. [招待講演・座長] <p>一般向け 計 3 件</p> <ol style="list-style-type: none"> 1. <u>原田浩</u>. 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. FIRST EXPO 2014. Feb 28. 2014. [ポスター発表] 2. <u>Harada H</u>. Metabolic Reprogramming of Cancer Cells; a Rational Target for the Diagnosis and Treatment of Cancers. FIRST Joint International Symposium; Overcoming Intractable Cancer-a new path to the future. Feb. 24. 2014. (一般向けの同時通訳付き) [招待講演] 3. <u>原田浩</u>、平岡真寛. 分子画像×動態追尾=究極の放射線治療. 京都大学アカデミックデイ 2013 -京都大学の研究者とあなたで語り合う日-. Dec 21. 2013. [座談会]
<p>図書 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 0 件</p> <p>(出願中) 計 1 件</p> <p>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 発明者: 原田浩、平岡真寛 特許出願人: 国立大学法人 京都大学</p>

様式19 別紙1

	<p>出願番号： 2013-521531（本出願の元になったPCT出願番号： PCT/JP2012/064964） 移行日： 2013年12月10日 移行国： 日本(PCT出願を経て日本への移行申請済み)</p>
Webページ (URL)	<p>京都大学 医学部付属病院 放射線治療科 原田研究室ホームページを準備した。 http://radiotherapy.kuhp.kyoto-u.ac.jp/biology/ 京都大学アカデミックデイ 2013におけるアウトリーチ活動を報告したウェブページを準備した。 http://radiotherapy.kuhp.kyoto-u.ac.jp/biology/20131221_Academicday.pdf 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」を準備し、随時アップデートした。 http://radiotherapy.kuhp.kyoto-u.ac.jp/biology/NEXT%20Program.html)</p>
国民との科学・技術対話の実施状況	<p>今年度はアウトリーチ活動を3回実施した。</p> <p>1. FIRST EXPO 2014・FIRST シンポジウム「科学技術が拓く2030年へのシナリオ」 実施日：平成26年2月28日～3月1日 場 所：ベルサール新宿グランド(東京都新宿区) 対象者：広く一般国民(延べ来場者数 327名) 内 容：FIRSTプログラムとNEXTプログラムがともに平成25年度で終了するにあたり、各研究者が進めてきた研究開発の内容、および成果を広く発信することを目的に開催された。FIRSTプロジェクトの各研究者による研究概要や成果のプレゼンテーションをはじめ、有識者や著名人をゲストに迎えての特別セッション、研究を担う様々な立場の方をお招きしてパネルディスカッションを行うFIRSTシンポジウム“「科学技術が拓く2030年」へのシナリオ”、NEXTプログラム研究者のポスター展示・意見交流会、FIRSTの中心研究者と高校生や大学生等の若者と語り合う「FIRSTサイエンスフォーラム」など、さまざまなイベントが複合的に実施された。 URL: http://first-pg.jp/expo2014/</p> <p>2. FIRST Joint International Symposium; Overcoming Intractable Cancer-a new path to the future. 実施日：平成26年2月24日～25日 場 所：札幌パークホテル 対象者：広く一般国民(一般国民向けに同時通訳付き) 内 容：FIRSTプログラムに採択された「持続的発展を見据えた『分子追跡放射線治療装置』の開発」と「ナノバイオテクノロジーが先導する診断・治療イノベーション」の共同国際シンポジウム。日本人の死因の第一位である「がん」の克服を目指して異なる方面から研究開発を進めてきた2課題が、持続的な発展を目指す方策の提言を行う事を目的としております。本NEXTプログラムの研究課題が、がんの放射線治療抵抗性機構の解明を一つの目的としていることもあり、ジョイント開催となった。 講演内容: Harada H. Metabolic Reprogramming of Cancer Cells; a Rational Target for the Diagnosis and Treatment of Cancers. URL: http://www.c-linkage.co.jp/first-joint/</p> <p>3. 京都大学アカデミックデイ 2013 -京都大学の研究者とあなたで語り合う日- 実施日：平成25年12月21日 場 所：京都大学百周年時計台記念館 対象者：広く一般国民(延べ来場者数 529名) 内 容：市民や研究者、文系、理系を問わず、誰もが学問の楽しさ・魅力に気付くことができる「対話」の場となることを目指して開催された。科学・技術に関わる本学の研究者と国民が直接対話することで、本学の研究活動をわかりやすく説明するとともに、国民の声を本学における研究活動に反映させることも目的として開催された。 URL: http://www.kura.kyoto-u.ac.jp/event/19</p>
新聞・一般雑誌等掲載計0件	なし
その他	なし

4. その他特記事項

平成25年度 公益財団法人 放射線影響協会 放射線影響研究奨励賞を受賞。受賞研究タイトルは、「細胞の低酸素応答が放射線感受性に及ぼす影響の解析」である。

実施状況報告書(平成25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	88,000,000	28,000,000	0	0
間接経費	34,800,000	26,400,000	8,400,000	0	0
合計	150,800,000	114,400,000	36,400,000	0	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	67,261	28,000,000	0	28,067,261	28,067,261	0	0
間接経費	19,650,000	8,400,000	0	28,050,000	28,050,000	0	0
合計	19,717,261	36,400,000	0	56,117,261	56,117,261	0	0

3. 当該年度の執行額内訳

(単位:円)

	金額	備考
物品費	13,381,983	マウス、試薬等
旅費	3,001,033	第59回放射線研究学会年次学術集会、Keystone Symposia2014会議等
謝金・人件費等	7,801,203	研究員、実験補助人件費
その他	3,883,042	実験動物飼育費、組織標本作成費等
直接経費計	28,067,261	
間接経費計	28,050,000	
合計	56,117,261	

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
				0		
				0		
				0		