



Title	骨肉腫に対するヒアルロン酸合成阻害剤による放射線 増感効果と作用機序の検討
Author(s)	
Citation	令和6（2024）年度学部学生による自主研究奨励事業 研究成果報告書. 2025
Version Type	VoR
URL	<a href="https://hdl.handle.net/11094/101270">https://hdl.handle.net/11094/101270</a>
rights	
Note	

*The University of Osaka Institutional Knowledge Archive : OUKA*

<https://ir.library.osaka-u.ac.jp/>

The University of Osaka

## 令和6年度大阪大学未来基金「学部学生による自主研究奨励事業」研究成果報告書

ふりがな 氏名	ばんない あやか 坂内 彩香	学部 学科	医学部保健学科	学年	2年
ふりがな 共同 研究者氏名		学部 学科		学年	年
					年
					年
アドバイザー教員 氏名	高橋 豊	所属	医学系研究科 保健学専攻		
研究課題名	骨肉腫に対するヒアルロン酸合成阻害剤による放射線増感効果と作用機序の検討				
研究成果の概要	研究目的、研究計画、研究方法、研究経過、研究成果等について記述すること。必要に応じて用紙を追加してもよい。(先行する研究を引用する場合は、「阪大生のためのアカデミックライティング入門」に従い、盗作剽窃にならないように引用部分を明示し文末に参考文献リストをつけること。)				

### 1. 背景

放射線は照射技術の進歩により、がんの局所治療として重要な役割を果たしているが、未だに放射線が十分に効かない難治性腫瘍が存在し、骨肉腫や膀がんがその代表である。これらのがんでは、細胞外基質であるヒアルロン酸(HA)が蓄積していることが知られている。

ヒアルロン酸は生体の構成分子であり、高分子の状態では細胞外マトリックスの成分として、低分子の状態では炎症時や腫瘍など特定の状態で高発現している。美容の面においては肌の水分や弾力性を保つ役割をしているが、多くの腫瘍ではヒアルロン酸は過剰発現していて(Ito et al. BMC.2021)、特に骨肉腫では予後不良因子となっている(Clifford et al. Clin Cancer Res. 2015)。また、ヒアルロン酸は医薬品の浸透を著しく阻害しており(Provezano et al. BJC. 2016)、この蓄積しているヒアルロン酸が放射線や薬剤の効果を落としていると考えられる。

このようなヒアルロン酸に対するアプローチとして以下の3つの戦略が考えられる。

- ・ヒアルロン酸の合成を阻害する
- ・ヒアルロン酸によって誘導されるシグナル伝達経路を標的にする
- ・間質に存在するヒアルロン酸を枯渇させる

胆道疾患の治療薬である 4-Methylumbellifrone (4MU) はヒアルロン酸の合成阻害効果があり、腫瘍の治療効果を増強できる可能性がある。加えて、マクロファージの分極にも関与していることが報告されている。

マクロファージは腫瘍免疫において重要な役割を果たしている。がんと密接な関係を持つ腫瘍会合性マクロファージ(TAM)はシグナル伝達分子、サイトカインなど様々な因子によってがん微小環境で M1 マクロファージまたは M2 マクロファージのいずれかに分極する。M1 マクロファージは腫瘍抑制、免疫促進の性質を持ち、M2 マクロファージは腫瘍促進、免疫抑制の性質を持つ。多くの腫瘍において TAM は M2 マクロファージに分極しており、M1 マクロファージに分極させる戦略は骨肉腫において有望視されている。

以上の抗腫瘍効果と免疫細胞への 4MU の寄与が期待されるため、放射線治療抵抗性である骨肉腫の治療効果を増強できると仮説を立てた。本研究では4MUを用いて、マウス骨肉腫細胞(LM8)に対する放射線の増感効果と免疫応答及びマクロファージの分極に着目した検討を行った。

## 2. 材料と方法

### 2.1. 細胞

マウス骨肉腫細胞(LM8)とマウスマクロファージ細胞(Raw264.7)を用いた。

### 2.2. 細胞の照射

医学系研究科のガンマセルを用いて細胞へのガンマ線照射はアドバイザー教員により実施された。

### 2.3. 骨肉腫に対する4MUの抗腫瘍効果の検討

LM8細胞に対し、4MUが増殖能を50%に抑制する濃度(IC50)をCell Counting Kit 8を用いて算出した。

図1に実験スケジュールを示す。

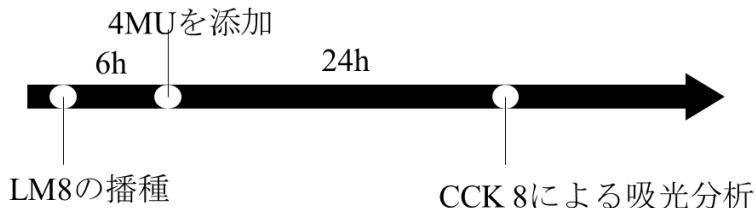


図 1. 4MU の抗腫瘍効果の検討

### 2.4. 4MUとガンマ線の併用による細胞死の検討

0 Gy、8 Gy のガンマ線照射と 4MU の併用による細胞のアポトーシスを Annexin V と Propidium Iodide の二重染色を行い、フローサイトメトリーで解析した。図2に実験スケジュールを示す。

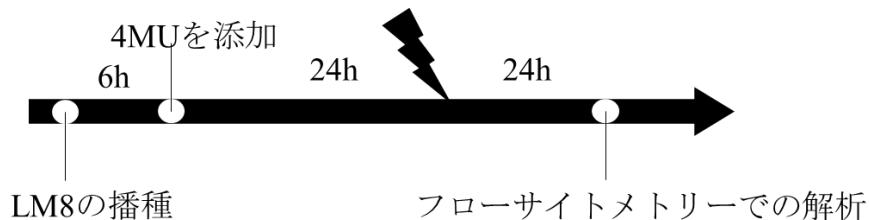


図 2 アポトーシスの解析の方法

### 2.5. 放射線増感効果の検討

LM8細胞に対し、IC50の濃度(0.5mM)の4MUと0 Gy, 2 Gy, 4 Gy, 8 Gy のガンマ線を照射した細胞を用いて、コロニーフォーメーションアッセイにて細胞生存率を算出した。その際、50個以上の細胞が集まったコロニーをカウントし、放射線単独群に対する4MU併用群における増感効果を算出した。図3に実験スケジュールを示す。

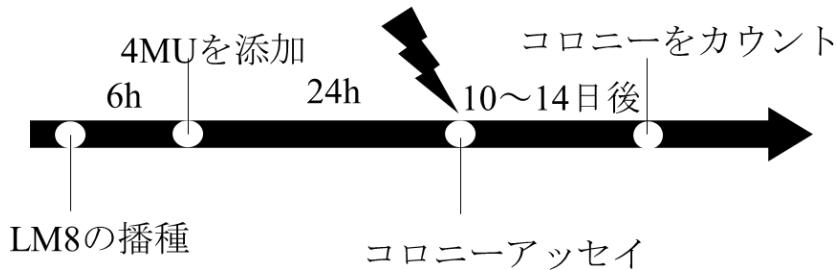


図 3. コロニーフォーメーションアッセイの方法

### 2.6. 4MUのガンマ線併用による免疫関連分子の検討

LM8細胞に対し 0.5mM の 4MU と 0 Gy, 8 Gy のガンマ線を照射した細胞を用いて、フローサイトメトリーにて Eat me シグナルに関連する Calreticulin、Don't eat me シグナルに関連する CD47 の発現を検討した。また、

がん細胞において高発現しているヒアルロン酸受容体の CD44 の発現をフローサイトメトリーにより解析した。図 4 に実験スケジュールを示す。

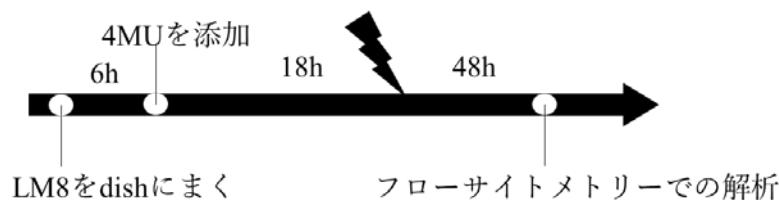


図 4. フローサイトメトリーによる解析の方法

#### 2.7. 4MU とガンマ線併用によるマクロファージの分極の検討

LM8 細胞に対し 0.5 mM の 4MU と 0 Gy, 8 Gy のガンマ線を照射した細胞を用いて、フローサイトメトリーにてマクロファージの分極を解析した。この際、M2 マクロファージの検出に CD206 抗体、M1 マクロファージの検出に CD86 抗体を用いた。また、マクロファージ上の Fc 受容体と抗体の Fc ドメインが結合することによる偽陽性を防ぐために Fc block 試薬を用いた。図 5 に実験スケジュールを示す。

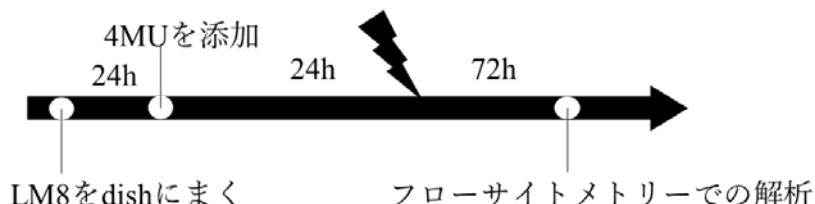


図 5. マクロファージの分極の検討

### 3. 実験結果と考察

#### 3.1. 4MU の IC<sub>50</sub> の検討

図 6 に 4MU の濃度による細胞生存率を示す。

4MU の IC<sub>50</sub> は 0.41mM となった。研究室での先行研究では、0.5mM であることが確認されており、それと同等であると判断し、以降の検討は 0.5mM で行った。

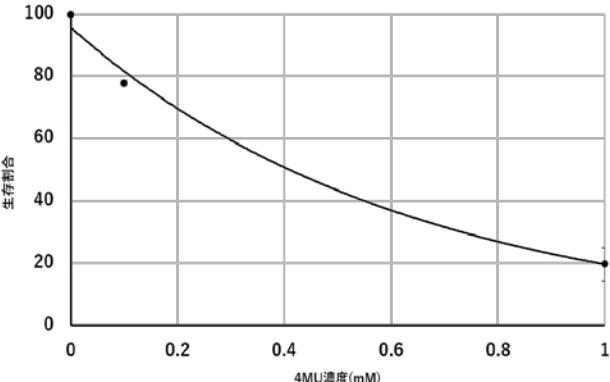


図 6 4MU の濃度による細胞生存率

$p=0.03$

#### 3.2. 4MU と放射線併用による細胞死の検討

図 7 にアポトーシスの解析結果を示す。

0 Gy では 8 Gy ともに 4MU を添加することでアポトーシスが増えた。放射線単独でもアポトーシスを増加したが、8 Gy の放射線と 4MU を併用することで単独治療よりも 3 倍以上アポトーシスが誘導された。この結果より放射線と 4MU を併用することでアポトーシスを促進し、骨肉腫細胞を細胞死に導くことが示された。

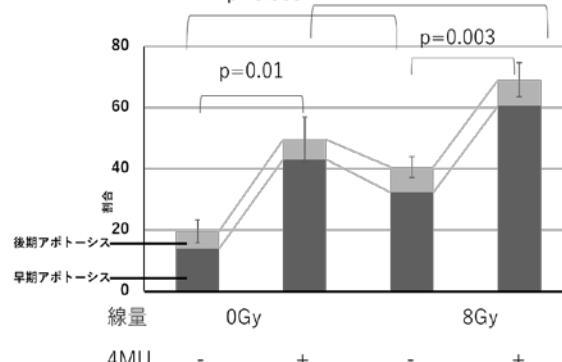


図 7 アポトーシスの変化

次に、放射線と4MUの併用による長期の生存率を解析するために、コロニーフォーメーションアッセイを行い、4MUの増感効果を検討した。図8にその結果を示す。2Gyと4Gyでは4MUと放射線の併用による有意差は見られなかったが、8Gyでは4MUにより生存率を減少した( $p<0.01$ )。4MUの併用により、高線量領域で放射線増感効果があることが示された。

### 3.3. 4MUと放射線の併用による免疫関連分子の発現の変化

図9にフローサイトメトリーによる、CalreticulinとCD47の発現についての結果を示す。

CD47の発現量は照射又は4MU投与により変化しなかった。一方、Calreticulinの発現量は放射線の照射により増加した。また。

4MUを加えることで0Gyで約3.3倍、8Gyでは約3.2倍増加した。

この結果により腫瘍が発するDon't eat meのシグナルが放射線と4MUを併用することによって著明に増加することが示され、マクロファージの貪食を促す可能性が示唆された。

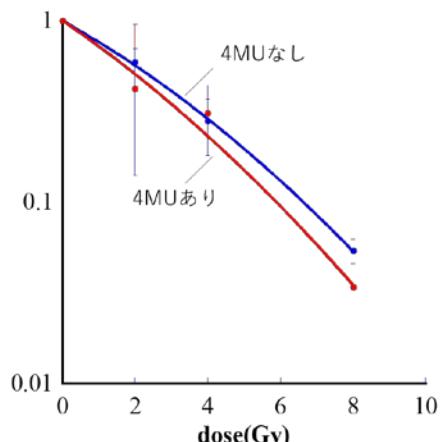


図8. 放射線増感の結果

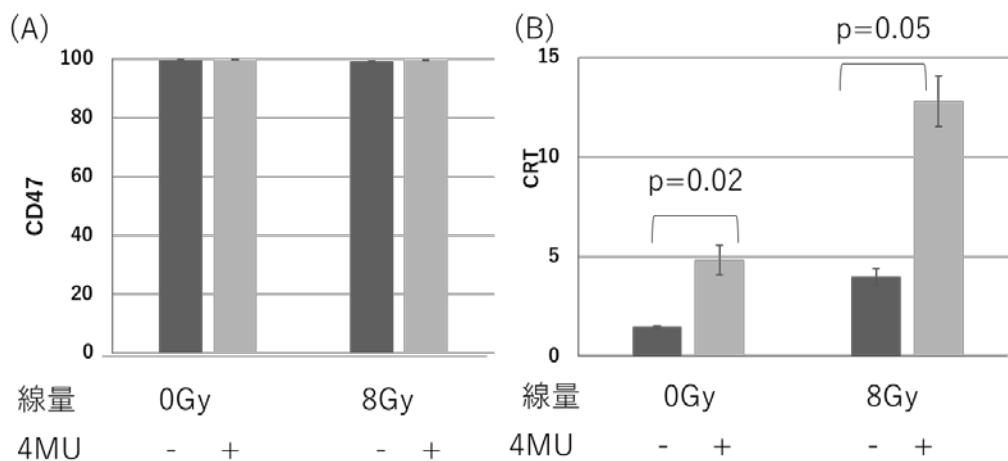


図9. フローサイトメトリーによる各シグナルの発現 CRT; Calreticulin

また、ヒアルロン酸受容体であるCD44の発現を以下の図10に示す。

4MUの投与又は放射線により変化はなかった。4MUが細胞増殖を抑制していることから、PI3K、Akt経路が抑制されていることなどが考えられ、今後これらも検討する。

### 3.4. 4MUと放射線併用によるマクロファージの分極に及ぼす影響

図11に分極したマクロファージの発現の結果を示す。

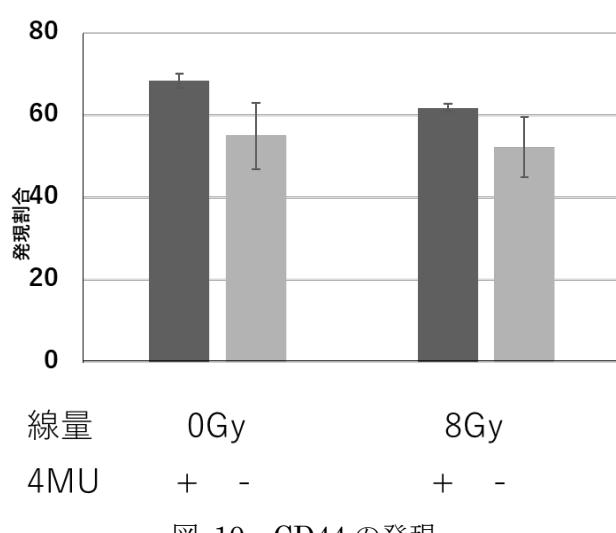


図10 CD44の発現

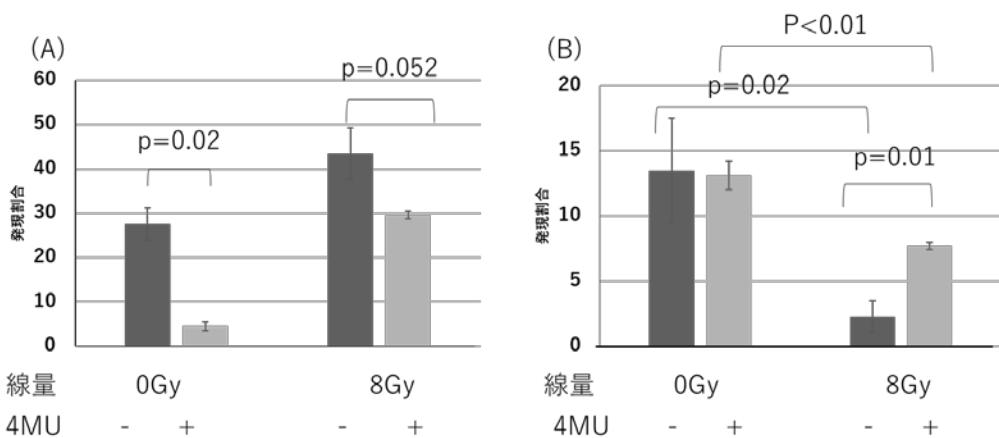


図 11 マクロファージの分極((A):M2 (B):M1)

マクロファージの M2 への分極は、放射線を照射することによって増加する傾向にあった。しかし、4MU を併用することにより、0 Gy で約 16%、8Gy で約 14% 減少した(図 11 (A))。一方、M1 への分極は、4MU を併用することにより、8 Gy で約 3.4 倍に増加した。これらの結果から 4MU を併用することで免疫を抑制する M2 マクロファージは減少し、免疫を促進する M1 マクロファージの増加を促すことが示唆された。したがって **4MU** は腫瘍内のヒアルロン酸を合成阻害する役割だけでなく、マクロファージの分極によって腫瘍を抑制させる効果がある可能性が示唆された。今後マクロファージの貪食能を評価する予定である。

#### 4. 結論

4MU は骨肉腫細胞に対し放射線増感作用があり、放射線と 4MU の併用により腫瘍免疫応答を促進する可能性が示唆された。また、放射線で増加したマクロファージの M2 への分極を抑制することが示唆された。以上より、4MU と放射線の併用は、元来放射線抵抗性である骨肉腫に対し、有効な治療法になる可能性がある。