

# がん治療における低酸素細胞 問題点とその利用

笹井 啓 資

新潟大学大学院医歯学総合研究科腫瘍放射線医学分野

## Hypoxic Cells in Malignant Tumors: Problem in Cancer Treatment or a New Target?

Keisuke SASAI

*Division of Radiation Oncology,  
Graduate School of Medical and Dental Sciences,  
Niigata University*

### Abstract

Hypoxic cells are radio- and chemo- resistant and are presented in a large proportion of human solid tumors. Many methods including direct measurement of tumor oxygenation by oxygen electrodes, immunohistochemical staining of nitroimidazoles or hypoxia related proteins, and detection using MRI or MRS, have been developed. Nitroimidazoles and nitrotriazoles can sensitize the response of hypoxic cells to irradiation. Tirapazamine, a bioreductive agent, is very toxic only to the hypoxic cells. Hypoxia stimulates angiogenesis and tumor development through the induction of proangiogenic proteins, such as vascular endothelial growth factor. A number of genes, including erythropoietin and various glycolytic enzymes, are also induced under hypoxic condition. Hypoxia-inducible factor 1 is a key protein in the process. New gene therapy vectors whose expression is selectively activated by a hypoxia have been developed. Although hypoxia is a major problem in cancer treatment, it is a new cancer treatment target.

**Key words:** hypoxia, hypoxic cell radiosensitizers, tirapazamine, hypoxia inducible factor 1

### はじめに

悪性腫瘍内に特異的に存在する低酸素状態は腫瘍の悪性度を高め、低酸素細胞は放射線治療や多

くの抗癌剤に対して耐性を示す。このように、低酸素状態は癌治療上の問題点であるが、逆に特異的な癌治療の可能性を含んでいる。

本稿では腫瘍内低酸素細胞分画の測定方法、癌

Reprint requests to: Keisuke SASAI  
Division of Radiation Oncology  
Graduate School of Medical and Dental Sciences  
Niigata University  
1-757 Asahimachi-dori,  
Niigata 951-8510 Japan

別刷請求先：〒951-8510 新潟市旭町通り1-757  
新潟大学大学院医歯学総合研究科腫瘍放射線医学分野  
笹井 啓 資

治療における低酸素細胞の問題点と克服方法、およびその利用について述べる。

### 低酸素細胞の問題点

実験的に細胞を低酸素状態 (0.5mmHg 以下) において低 LET 放射線 (光子や電子線) を照射した場合、常酸素状態 (20mmHg 以上) で放射線を照射した場合に比較して同一の効果を得るためには約3倍の照射線量が必要になる。この現象を酸素効果と呼ぶ。実際の腫瘍では、常酸素状態の細胞と低酸素状態の細胞が混在している。ヒト腫瘍では50%程度までの低酸素細胞分画が存在することが推定されており、この放射線抵抗性低酸素細胞の存在が放射線治療が十分効果を示さない原因の一つと考えられている。また、ブレオマイシンを初めとして多くの抗癌剤も低酸素細胞に対して効果が低い。さらに低酸素細胞、特に後述する慢性低酸素細胞はG0期にあるため、細胞周期依存性を示す抗癌剤の効果が著しく低下する。

低酸素環境は治療抵抗性の問題ばかりでなく、腫瘍の悪性度の増加面でも重要な役割を果たしている。細胞は低酸素環境に置かれると、HIF-1に代表されるタンパクを介し多くの遺伝子発現が起こる。HIF-1は $\alpha$ と $\beta$ の2つのsubunitからなるヘテロダイマーである。常酸素状態ではHIF-1 $\alpha$ はユビキチン化され分解される。低酸素状態では分解されずHIF-1 $\beta$ とダイマーを形成してHIF-1となり、VEGF, Erythropoietin, Glucose transporters など hypoxia response element を有する遺伝子の発現を促す。この結果、血管新生、嫌気性代謝、アポトーシス・ネクローシス、細胞周期の停止、細胞の分化、ストレスへの適応、細胞接触の変化などが起こる。この過程を通じて、腫瘍は治療抵抗性や易転移性を獲得する<sup>1)2)</sup>。

発癌過程においてp53の変異が起こった細胞と、野生型p53を有する細胞が腫瘍内で混在していると考えられる。低酸素状態に曝露されると野生型p53を有する腫瘍細胞のみが容易にアポトーシスを起こして消滅していく<sup>3)</sup>。結果として、腫瘍内ではアポトーシスを起こしにくい変異型p53

を有する細胞が優位となっていく。このように低酸素環境が、腫瘍の悪性度を増す原因の一つと考えられている。

### 低酸素細胞形成のメカニズム

腫瘍細胞内に存在する低酸素細胞が形成されるメカニズムには2通りが考えられる。すなわち急性の低酸素細胞 (acuteあるいはperfusion-limited hypoxia) および慢性の低酸素細胞 (chronicあるいはdiffusion-limited hypoxia) である (図1)<sup>4)</sup>。

#### 1. 急性の低酸素細胞

腫瘍内の血流が一過性に変化し、ある血管の支配領域に血液が一時的に供給されなくなるため起こる低酸素状態である<sup>5)</sup>。血流が再開されれば再び常酸素状態に戻るため、急性の低酸素細胞が多い腫瘍では再酸素化が速やかに起こると考えられる。

#### 2. 慢性の低酸素細胞

ThomlinsonとGrayが肺癌組織で血管から離れた細胞が壊死を起こしていることを発見した<sup>6)</sup>。腫瘍内では、腫瘍細胞の増殖が急速に起こるため、血管の増殖が腫瘍の増殖に追いつかなくなる。従って毛細血管の周囲は酸素が豊富にあるが、血管から離れると酸素がdiffusionされなくなるため細胞の死が起こる。この壊死層の内側にまだ壊死には陥っていないが極めて酸素の少ない細胞が存在する。この細胞は、それより内側の細胞が放射線により壊死に陥れば酸素が到達するので再酸素化され放射線感受性が上昇する。低酸素細胞分画の多い腫瘍では腫瘍細胞の潜在的倍加時間が短い事が報告されている。これも増殖の早い腫瘍では、血管の増殖と腫瘍の増殖に不均衡が生じやすく低酸素細胞が増殖するためと考えられている<sup>7)</sup>。

### 低酸素細胞分画の測定方法

#### 1. 実験腫瘍における放射線生物学的方法

マウスに移植された実験腫瘍の低酸素細胞分画は、放射線生物学的方法により比較的簡単に、し

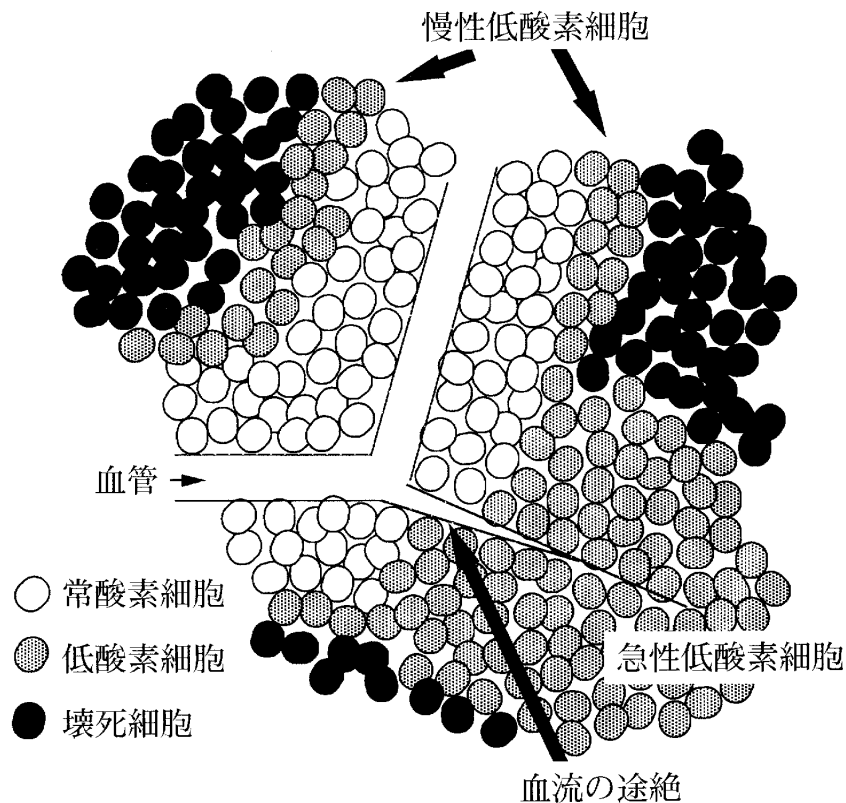


図1 低酸素細胞形成のメカニズム

かも正確に測定することができる。主な方法としては Paired survival curve 法, Clamped tumor growth delay 法, および Clamped tumor control (TCD 50) 法が上げられる<sup>8)</sup>。

## 2. 腫瘍内酸素分圧の測定

低酸素細胞分画を、腫瘍の酸素分圧から類推する方法がある。電極を用いる腫瘍内酸素分圧測定法は1960年代から試みられていた<sup>9)</sup>。近年、この分野の研究が進み、ドイツ エッペンドルフ社により直径200—350 $\mu$ m ステンレス針内に12 $\mu$ mの金電極を埋め込んだ組織内酸素分圧測定装置(pO<sub>2</sub> Histogram 6650)が開発された<sup>10)</sup>。米国やヨーロッパ諸国で実験腫瘍およびヒトの癌について酸素分圧の測定が盛んに行なわれている。この装置の特徴として1) 電極が極めて小さくかつ反応時間が1秒と短くアーチファクトを最小にできる。2) 腫瘍内の小さな部分の酸素分圧を測定できる。3) ステンレス針内に電極があるのでヒトに対しても安全に使用できる強度がある。および、

4) マイクロマニピュレーターにより少しずつ前進と後退を繰り返すことにより腫瘍内をくまなく測定でき、腫瘍内酸素分布を求めることができる点などがあげられる。ヒト乳癌<sup>10)</sup>、子宮頸癌や軟部組織原発の肉腫を用いた研究では、同一部位の腫瘍でも患者間で酸素分圧の分布に大きな差異があることが知られている。例えば、ヒト子宮頸癌では酸素分圧の中央値で4—29mmHg、乳癌でも3mmHgから62mmHgの分布が報告されている<sup>10)</sup>。子宮頸癌、頭頸部腫瘍などで放射線治療を含む種々の治療成績と酸素分圧に相関が報告されている<sup>11)–14)</sup>。

## 3. ニトロアゾールを用いる方法

ニトロアゾール化合物は、本来、低酸素細胞の放射線感受性を増加させる薬剤（低酸素細胞放射線増感剤）として開発されてきた。残念ながら、現在まで実用化されたものはないが、本邦で開発されたドラニダゾールは臨床治験が進行中である。ニトロアゾール化合物は低酸素状態で生体内

高分子と共有結合を形成し細胞内で長く留まるようになる。ヒト腫瘍で低酸素細胞分画を検出するためにはニトロアゾールを放射性同位元素でラベルし、腫瘍摘出後オートラジオグラフを撮影する古典的方法とポジトロン放出核種である $^{18}\text{F}$ でラベルしPETで検出する方法などがある。CCI-103Fのようなフッ素原子を有する化合物ではMRでの検出も試みられている。もう一つの方法としては、ニトロアゾール化合物にたいする抗体を使用し抗体シンチあるいは免疫組織染色法で低酸素分画を染色して検出する方法である。低酸素細胞増感剤として開発されたpimonidazole<sup>15)</sup>や、EF5 [2-(2-nitro-1H-imidazole-1-yl)-N-(2,2,3,3,3-pentafluoropropyl)acetamide]<sup>16)</sup>に対するモノクロナール抗体が用いられている。これらの中で最も臨床研究が進んでいるものは、 $^{18}\text{F}$  fluoromisonidazole による低酸素細胞のPETによる検出方法であり、頭頸部腫瘍で低酸素細胞の画像化が行われている。

#### 4. その他の方法

以上述べてきた代表的な低酸素細胞検出方法とは別にいくつかの研究段階の腫瘍内低酸素細胞検出方法を紹介する。

##### 1) MRS

核磁気共鳴スペクトロスコープを用いて低酸素細胞分画を予測する試みもなされている。主な対象核種としては $^1\text{H}$ 、 $^{19}\text{F}$ 、 $^{32}\text{P}$ があげられる。 $^1\text{H}$ や $^{19}\text{F}$ については先にも述べたがフッ素化ニトロイミダゾールを検出する事で、低酸素細胞に共有結合したこれらの化合物の濃度から低酸素細胞を検出しようとするものである。 $^{32}\text{P}$ を用いる方法は、腫瘍内リン酸代謝産物濃度から、腫瘍内の低酸素細胞分画を推定する方法である。Liらは、種々の実験腫瘍を用い放射線生物学的に求めた低酸素細胞分画とphosphocreatine/無機リン比が最も良い相関を示したと報告している<sup>17)</sup>。他の研究者も種々のリン酸代謝産物をMRSを用いて検出することで低酸素細胞分画の推定を行っている。

##### 2) コメットアッセイ法

放射線照射後の細胞をアガロースゲル内に包埋後、細胞を溶解する。このゲルを電気泳動すると、

障害の程度に従ってDNAが泳動される。このDNAを蛍光色素で発色させると個々の細胞に対応して彗星のような形態が観察される。この彗星の尾部を画像解析装置で解析測定することにより個々の細胞のDNA障害の程度を測定することができる。低酸素細胞は正常な酸素状態の細胞に比較して放射線抵抗性であり、放射線照射後のDNA障害が少ない事実は既に知られている。カナダのOliveらは、このDNA障害の違いをコメットアッセイ法を用いて検出し、実験腫瘍の低酸素細胞分画を測定している<sup>18)</sup>。本方法は、細胞を培養することなく比較的簡便に施行できる特徴がある。

##### 3) $^{62}\text{Cu}$ 化合物を用いポジトロンエミッションCTにて検出する方法

心あるいは脳血流測定の目的で既に臨床使用されているポジトロン化合物 [ $^{62}\text{Cu}^{++}$ ] PTSM 類縁化合物である [ $^{62}\text{Cu}^{++}$ ] diacetyl bis (N4-methylthiosemicarbazone) ([ $^{62}\text{Cu}^{++}$ ] ATSM) は低酸素細胞内で $^{62}\text{Cu}^{++}$ が $^{62}\text{Cu}^{+}$ に還元されることにより銅が細胞内に停滞することが知られている。この $^{62}\text{Cu}$ をポジトロンエミッションCTで検出することにより生体内低酸素細胞の分布を求めることが可能である。既に、虚血状態においた脳および心に於て低酸素細胞の存在が検出されている。 [ $^{62}\text{Cu}^{++}$ ] ATSM をヒト腫瘍内低酸素細胞分画の測定されつつある<sup>19)</sup>。

##### 4) HIF-1 $\alpha$ および低酸素状態で誘導される遺伝子産物

HIF-1 $\alpha$ あるいはその下流に発現する種々のタンパク発現と放射線に対する反応や、腫瘍の予後に関する報告がなされている<sup>20)</sup>。

#### 低酸素細胞と薬剤

臨床で使用されている制癌剤の多くは常酸素状態で有効に作用するものが多い。酸素分圧の低下による効果の低下ばかりでなく、pHの低下、病変への薬剤到達の低下、アポトーシスの減少、増殖機能の低下、ストレスタンパクの発現などが薬剤の効果低下の原因と考えられる<sup>11)</sup>。

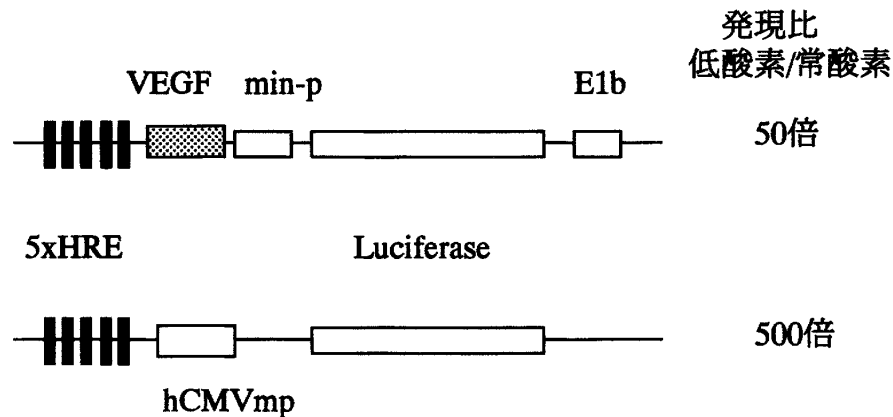


図2 低酸素特異的発現ベクターの例

しかし、マイトマイシンCのように低酸素状態でより有効に作用するものも存在する。最近では、低酸素細胞のみに作用する Tirapazamine のような bioreductive agent と呼ばれる薬剤も開発されている。Tirapazamine は、低酸素細胞環境で還元されることにより、ラジカルとなってDNA鎖を切断し細胞毒性を呈する薬剤で、低酸素細胞に対する毒性は常酸素細胞の数十倍から数百倍といわれる<sup>21)</sup>。この薬剤の利用は、低酸素細胞を有する悪性腫瘍の特異的治療法として注目される。単剤で用いるより、他の抗癌剤や放射線と併用効果が記載されており、現在、Tirapazamine とシスプラチンの併用効果に関して欧米でトライアルが進行している<sup>22)</sup>。

#### HIF-1 を介す遺伝子発現の応用

先にも述べたが、HIF-1 を介して多くの遺伝子が低酸素環境で特異的に発現する。Shibata らは、これを利用して低酸素環境下で特異的に発現するベクターを開発した<sup>23)24)</sup>。図2に代表的発現ベクターを示す。酸素濃度0.02%の低酸素状態に18時間の暴露で、常酸素状態に比較し500倍の発現を達成した。このことはルシフェラーゼに変えて治療遺伝子を組み込む腫瘍特異的遺伝子治療の可能性を示唆している。

#### ま と め

腫瘍の低酸素細胞は放射線に対して感受性が低く、低酸素環境は腫瘍細胞の悪性度を増す方向に作用する事が知られてきた。さらに、低酸素細胞は、抗癌剤などの薬剤にたいする感受性にも影響する。低酸素細胞を克服する目的で低酸素細胞に特異的な毒性を有する Tirapazamine などの薬剤が開発されてきた。さらに、低酸素環境で特異的に発現する遺伝子の応用が試みられている。

#### 参 考 文 献

- 1) Semenza GL: Regulation of mammalian O<sub>2</sub> homeostasis by hypoxia-inducible factor 1. *Annu Rev Cell Dev Biol.* 15: 551-578 1999.
- 2) Höckel M and Vaupel P: Tumor hypoxia: definitions and current clinical, biologic, and molecular aspects. *J Natl Cancer Inst.* 93: 266-276 2001.
- 3) Graeber TG, Osmanian C, Jacks T, Housman DE, Koch CJ, Lowe SW and Giaccia AJ: Hypoxia mediated selection of cells with diminished apoptotic potential in solid tumors. *Nature* 379: 88-91 1996.
- 4) Hall EJ: The oxygen effect and reoxygenation in *Radiobiology for Radiologist*, 4th ed. pp133-

- 152, J.B. Lippincott Company, Philadelphia, 1994.
- 5) Brown JM: Evidence for acutely hypoxic cells in mouse tumours, and a possible mechanism of reoxygenation. *Br J Radiol* 52: 650-656 1979.
- 6) Thomlinson RH and Gray LH: The histological structure of some human lung cancers and the possible implications for radiotherapy. *Br J Cancer* 9: 539-549 1955.
- 7) Nordsmark M, Hoyer M, Keller J, Nielsen OS, Jensen OM and Overgaard J: The relationship between tumor oxygenation and cell proliferation in human soft tissue sarcomas. *Int J Radiat Oncol Biol Phys* 35: 701-708 1996.
- 8) Moulder JE and Rockwell S: Hypoxic fractions of solid tumors: Experimental techniques, methods of analysis, and a survey of existing data. *Int J Radiat Oncol Biol Phys* 10: 695-712 1984.
- 9) Cater DB and Silver I: Quantitative measurements of oxygen tension in normal tissues and in the tumours of patients before and after radiotherapy. *Acta Radiol* 53: 233-256 1960.
- 10) Vaupel P, Schlenger K, Knoop C and Höckel M: Oxygenation of human tumors: Evaluation of tissue oxygen distribution in breast cancers by computerized O<sub>2</sub> tension measurements. *Cancer Research* 51: 3316-3322 1991.
- 11) Höckel M, Schlenger K, Aral B, Mitze M, Schaffer U and Vaupel P: Association between tumor hypoxia and malignant progression in advanced cancer of the uterine cervix. *Cancer Research* 56: 4509-4515 1996.
- 12) Nordsmark M, Overgaard M and Overgaard J: Pretreatment oxygenation predicts radiation response in advanced squamous cell carcinoma of the head and neck. *Radiother Oncol* 41: 31-39 1996.
- 13) Brizel DM, Scully SP, Harrelson JM, Layfield LJ, Bean JM, Prosnitz LR and Dewhirst MW: Tumor oxygenation predicts for the likelihood of distant metastases in human soft tissue sarcoma. *Cancer Res* 56: 941-943 1996.
- 14) Brizel DM, Sibley GS, Prosnitz LR, Scher RL and Dewhirst MW: Tumor hypoxia adversely affects the prognosis of carcinoma of the head and neck. *Int J Radiat Oncol Biol Phys* 38: 285-289 1997.
- 15) Kennedy AS, Raleigh JA, Perez GM, Calkins DP, Thrall DE, Novotny DB and Varia MA: Proliferation and hypoxia in human squamous cell carcinoma of the cervix: first report of combined immunohistochemical assays. *Int J Radiat Oncol Biol Phys* 37: 897-905 1997.
- 16) Lord EM, Harwell L and Koch CJ: Detection of hypoxic cells by monoclonal antibody recognizing 2-nitroimidazole adducts. *Cancer Research* 53: 5721-5726 1993.
- 17) Li SJ, Jin GY, Fish BL and Moulder JE: Correlation of radiobiologically assays of hypoxic fraction with phosphorus-31 magnetic resonance spectroscopy across multiple tumor lines. *Radiation Research* 145: 43-45 1995.
- 18) Olive PL, Vikse CM and Durand RE: Hypoxic fractions measured in murine tumors and normal tissues using the comet assay. *Int J Radiat Oncol Biol Phys* 29: 487-491 1994.
- 19) Dehdashti F, Grigsby PW, Mintun MA, Lewis JS, Siegel BA and Welch MJ: Assessing tumor hypoxia in cervical cancer by positron emission tomography with <sup>60</sup>Cu-ATSM: relationship to therapeutic response - a preliminary report. *Int J Radiat Oncol Biol Phys* 55: 1233-1238 2003.
- 20) Bos R, van der Groep P, Greijer AE, Shvarts A, Meijer S, Pinedo HM, Semenza GL, van Diest PJ and van der Wall E: Levels of hypoxia-inducible factor-1 $\alpha$  independently predict prognosis in patients with lymph node negative breast carcinoma. *Cancer* 97: 1573-1581 2003.
- 21) Zeman EM, Brown JM, Lemmon MJ, Hirst VK, and Lee WW: SR-4233: A new bioreductive agent with high selective toxicity for hypoxic mammalian cells. *Int J Radiat Oncol Biol Phys* 12: 1239-1242 1986.

- 22) von Pawel J, von Roemeling R, Gatzemeier U, Boyer M, Elisson LO, Clark P, Talbot D, Rey A, Butler TW, Hirsh V, Olver I, Bergman B, Ayoub J, Richardson G, Dunlop D, Arcenas A, Vescio R, Viallet J and Treat J: Tirapazamine plus cisplatin versus cisplatin in advanced non-small-cell lung cancer: A report of the international CATAPULT I study group. Cisplatin and Tirapazamine in Subjects with Advanced Previously Untreated Non-Small-Cell Lung Tumors. *J Clin Oncol* 18: 1351-1359 2000.
  - 23) Shibata T, Akiyama N, Noda M, Sasai K and Hiraoka M: Enhancement of gene expression under hypoxic conditions using fragments of the human vascular endothelial growth factor and the erythropoietin genes. *Int J Radiat Oncol Biol Phys* 42: 913-916 1998.
  - 24) Shibata T, Giaccia AJ and Brown JM: Development of a hypoxia-responsive vector for tumor-specific gene therapy. *Gene Ther* 7: 493-498 2000.
-