

## 科学研究費助成事業（学術研究助成基金助成金）研究成果報告書

平成 25 年 6 月 19 日現在

機関番号：10101

研究種目：若手研究（B）

研究期間：2011～2012

課題番号：23791376

研究課題名（和文） 放射線の影響による浸潤能亢進の分子機序の解明

研究課題名（英文） Analysis of the molecular mechanism of radiation induced invasiveness

研究代表者

Nam JinMin (NAM JINMIN)

北海道大学・大学院医学研究科・特任助教

研究者番号：60414132

研究成果の概要（和文）：

多くの乳癌治療に放射線療法が用いられているが、治療後に浸潤癌としての再発に関わる分子メカニズムは、未だ解明されていない部分も多い。本研究では、非浸潤性乳癌細胞において、放射線照射後の浸潤能獲得過程に関わる分子の同定、および分子メカニズムの解析を、細胞の3次元培養モデルを用いた。乳腺上皮細胞の3次元培養実験系において、放射線照射後の浸潤能獲得に、 $\alpha 5 \beta 1$ -integrin と NF- $\kappa$ B のシグナルが関わっている可能性が示唆された。

研究成果の概要（英文）：

Radiation therapy is the common treatment for breast cancer, and the primary goal of therapy is to prevent invasive recurrence. The detailed molecular mechanism of invasive recurrence after radiation therapy is not well understood. This study investigated the effect of radiation on a three-dimensional culture model of non-invasive breast cancer, and identified important molecule and possible molecular mechanism underlying emergence of invasiveness. Our results suggest that  $\alpha 5 \beta 1$ -integrin via NF- $\kappa$ B signaling is an important mediator of invasive progression after radiation treatment on non-invasive breast cancer cells in three-dimensional extracellular matrix.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
交付決定額	3,300,000	990,000	4,290,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：内科系臨床医学・放射線科学

キーワード：放射線，乳癌，浸潤，インテグリン

## 1. 研究開始当初の背景

近年、多くの乳癌治療に放射線療法が用いられているが、乳癌はその原因となる分子や浸潤・転移等の分子メカニズムが複雑でかつ多種多様であり、放射線に対する影響も含め、未だ解明されていない部分も多い。放射線療法は、乳癌に対しても効果的で、乳癌治療の

際、放射線療法を併用することによって、外科的切除のみの場合に比べて再発率が半減されることが報告されている。しかし、放射線療法を行ったにもかかわらず再発した場合は、その約半分が、より悪性度の高い癌として浸潤能や転移能を獲得していることも報告されている。このことは、放射線照射に

よって効率よく治療できる乳癌と放射線に耐性を持ち、さらに浸潤・転移能が高くなり悪性度を増す乳癌があることを意味する。放射線療法によって効果的に完治できる乳癌と、放射線照射が逆に危険な乳癌を生検の段階で見分けることができる分子マーカーがあれば、乳癌治療の効率を向上させることが可能であると考えられるが、残念ながらそのような分子マーカーは未だよく分かっていない。放射線生物学の分野においても基礎研究が盛んに進められており、放射線の癌細胞への影響に関する知見が増えつつあるが、分子メカニズムに関して解明されていない点も多いため、実用化に結びつくまでは至らないと考えられる。

乳癌細胞における放射線生物学の基礎研究の一つとして、放射線照射後の乳癌細胞の生存に、細胞接着分子  $\beta 1$  インテグリン ( $\beta 1$ -integrin) が関わっており、 $\beta 1$ -integrin の阻害と放射線を組み合わせることで乳癌細胞に処理する事によって、単独処理に比べ効率よく細胞死を誘導することを、Park と Bissell らが報告している。これに関連する研究として、申請者は、 $\beta 1$ -integrin ヘテロダイマーのひとつである  $\alpha 5 \beta 1$ -integrin に注目し、浸潤性の高い乳癌細胞で  $\alpha 5 \beta 1$ -integrin が過剰発現している事、 $\alpha 5$ -integrin の遺伝子発現が乳癌患者の予後に関連している事を報告してきた。また、放射線照射によって  $\alpha 5 \beta 1$ -integrin タンパク質の細胞膜での発現が上昇し、放射線照射後の乳癌細胞生存に関わっている事、さらに、 $\alpha 5 \beta 1$ -integrin の阻害ペプチドと放射線照射を組み合わせる事によって、放射線単独で処理するよりも、より効果的に乳癌細胞に細胞死を誘導する事を報告している。しかし、浸潤・転移の様式や分子メカニズムが多様な乳癌の中で、 $\alpha 5 \beta 1$ -integrin の発現様式が放射線に対する感受性を見分けるマーカー分子になり得るかという点や、その後の詳細な分子メカニズムを解析するまでには至っていない。一方、 $\alpha 5 \beta 1$ -integrin は、乳癌の浸潤性・転移性に密接に関連している事で近年注目されつつあるが、同時に、細胞の運動や器官の形成・再生などの正常な機能にも重要な因子であるとも考えられている。したがって、放射線照射における  $\alpha 5 \beta 1$ -integrin の役割を解析する際には、 $\alpha 5 \beta 1$ -integrin そのものを解析するだけでなく、放射線照射によって活性化される  $\alpha 5 \beta 1$ -integrin の下流のシグナルの全体像を理解していく必要があると考えられる。

本研究では、再構成基底膜 (マトリゲル等) による 3 次元細胞培養実験系を用いて解析を行った。生体内の癌細胞は、プラスチックディッシュ上の 2 次元単層状の形態ではなく、3 次元の環境で増殖し、立体的な形態を

形成する。また、細胞外の微小環境による影響も含めて、3 次元培養の環境は細胞にとって生体内により近い条件だと考えられる。例えば、乳腺上皮細胞に 3 次元培養を用いた場合、乳房様構造が形成されカゼイン分泌などの組織特異的機能が回復する。近年までの放射線生物学における解析の多くは、2 次元のプラスチックディッシュでの培養を用いて行われてきた。しかし、2 次元培養した細胞と 3 次元培養した細胞を比較すると、細胞の形態だけでなく、 $\alpha 5 \beta 1$ -integrin 等の分子の発現量が異なり、それによって放射線に対する影響も異なると考えられる。したがって、2 次元の培養系においては、放射線の影響に関与する重要な分子を見落とす可能性があり、将来的に応用を視野に入れた *in vitro* の解析をする系としては、生体内の環境に近い 3 次元培養がより理想的と考えられる。したがって、放射線照射によって活性化されるシグナルの全体像を理解するため、実際の癌の状態や環境に近い、3 次元細胞培養実験系を用いた本研究を計画した。

## 2. 研究の目的

本研究は、乳癌細胞における放射線の影響とその分子メカニズムを理解することによって、多種多様な乳癌の中から放射線治療に適した乳癌を見分けるための分子マーカーを同定し、さらに放射線療法後の再発を防ぐための分子標的の候補を得ることを目的とする。

(1) 3 次元培養を用いた *in vitro* 解析により、放射線照射後に浸潤性が亢進する乳癌細胞を用いた実験系を構築する。

(2) 放射線照射後も生き残った乳癌細胞において、放射線影響による浸潤能亢進に関する分子メカニズムの一端を解明する。

## 3. 研究の方法

(1) 乳癌細胞株の 3 次元培養モデルを用いた解析: 再構成基底膜 (ラミニンリッチ細胞外マトリックス) の 3 次元培養を用い、放射線照射によって浸潤能が亢進する実験系を構築する。照射には、X 線 (150 kV, 20 mA) を用い、2 Gy-8Gy の線量を検討した。照射後、TdT-mediated dUTP nick end labeling (TUNEL) 法や、アポトーシスのマーカー Cleaved Caspase-3 の免疫染色等を用いて、死細胞の検討を行った。

(2) X線の照射後、生き残った乳癌細胞の浸潤能測定には、Matrigel Chemoinvasion AssayやMatrix (Gelatin) Degradation Assay等を用いて定量を行う。3次元培養した乳癌細胞は、X線照射後に、3次元ゲルから取り出した。3次元から取り出した細胞を用いて浸潤能を測定する。

(3) 放射線照射によって浸潤能が亢進する乳癌細胞を用い、照射後の $\alpha 5 \beta 1$ -integrinのタンパク質発現を解析する。さらに、 $\alpha 5 \beta 1$ -integrinを阻害することによって、放射線照射による浸潤能に及ぼす影響を検討する。また、 $\alpha 5 \beta 1$ -integrinの発現調節に関わる分子メカニズムを、免疫染色や免疫沈降法等を用いて検討する。

#### 4. 研究成果

(1) 乳癌細胞の3次元培養モデルを用いて、X線照射後に浸潤能が亢進する細胞株を特定するための解析を行った。いくつかの乳腺上皮細胞を検討し、Aktを過剰発現させた乳腺上皮細胞による非浸潤性乳癌細胞系を用いて解析を進めた。Akt過剰発現細胞において、照射後Cleaved caspase-3の抗体を用いて免疫染色した結果、基底膜に接していない内部の細胞に、より多くの死細胞が観察された。

さらに、8GyのX線照射後に生き残った細胞において、基底膜の構造が破れ、極性を失っており、非照射株と比べて悪性度の高い形態を示す事が確認された。

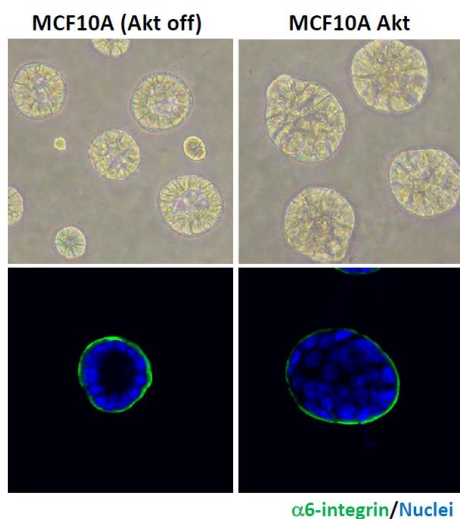


図1. 乳腺上皮細胞の3次元培養

(2) Aktを過剰発現した乳腺上皮細胞株にX線を照射し、生き残った細胞を用いて、Matrigel Chemoinvasion Assayを行った。その結果、X線を照射した群において、照射していない群と比較し、浸潤能の増加が認められた(図2)。

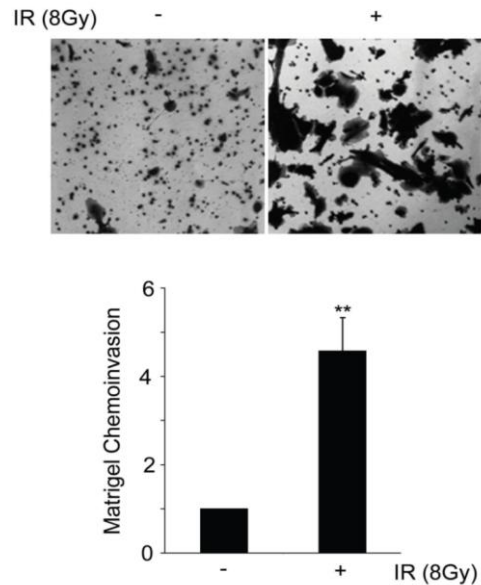


図2. X線照射による浸潤能亢進

(3) X照射後に生き残った細胞を、1個の細胞から再度3次元細胞外基質において増やし直した実験系において、 $\alpha 5 \beta 1$ -integrinと、 $\alpha 5 \beta 1$ -integrinのリガンドであるfibronectinのタンパク質の発現が、X照射群で増加している事が確認された。

また、転写因子NF- $\kappa$ Bの核移行が、 $\beta 1$ -integrinの発現調節に関わっている事、発現亢進した $\beta 1$ -integrinがNF- $\kappa$ Bの核移行に関わり、これらの分子の間で、feedback制御が存在する可能性が示唆された。NF- $\kappa$ Bの核内の局在は、細胞から核分画を抽出した実験や、免疫染色によって確認した。

X線照射によって誘導された浸潤能は、 $\alpha 5 \beta 1$ -integrinの抗体(AIIB2, PID6)や、NF- $\kappa$ Bの阻害剤で処理によって抑制される事を確認した。

これらの結果から、乳腺上皮細胞の3次元実験系において、放射線照射後の癌細胞の浸潤能獲得に、 $\alpha 5 \beta 1$ -integrinとNF- $\kappa$ Bのシグナルが関わっている可能性が示唆された。

## 5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文] (計3件)

- ① Nam JM, Ahmed KM, Costes S, Zhang H, Onodera Y, Olshen AB, Hatanaka KC, Kinoshita R, Ishikawa M, Sabe H, Shirato H, Park CC:  $\beta 1$ -integrin via NF- $\kappa$ B signaling is essential for acquisition of invasiveness in a model of radiation treated in situ breast cancer. *Breast Cancer Res*, 2013, in press, 査読有
- ② Onodera Y, Nam JM, Sabe H: Intracellular trafficking of integrins in cancer cells. *Pharmacol Ther*, in press, 査読有, doi: 10.1016/j.pharmthera.2013.05.007.
- ③ Onodera Y, Nam JM, Hashimoto A, Norman JC, Shirato H, Hashimoto S, Sabe H: Rab5c promotes AMAP1-PRKD2 complex formation to enhance  $\beta 1$  integrin recycling in EGF-induced cancer invasion. *J Cell Biol*, 2012, 25:197(7):983-96, 査読有, doi: 10.1083/jcb.201201065.

[学会発表] (計8件)

- ① Nam JM, Ahmed KM, Costes S, Zhang H, Sabe H, Shirato H, Park CC: Targeting beta1 integrin suppresses invasive recurrence in a three-dimensional model of radiation treated ductal carcinoma in situ, ASTRO 54<sup>th</sup> Annual meeting, 2012.10.28-31, Boston Convention and Exhibition Center (USA)
- ② Kinoshita R, Nam JM, Hosoda M, Kubota KC, Tanino M, Hashimoto A, Ito YM, Tanaka S, Sabe H, Shirato H: Co-overexpression of GEP100 With EGFR correlates with early recurrence after breast conservation therapy (BCT), ASTRO 54<sup>th</sup> Annual meeting, 2012.10.28-31, Boston Convention and Exhibition Center (USA)
- ③ Nam JM, Ahmed KM, Costes S, Zhang H, Sabe H, Shirato H, Park CC: Inhibition of integrin suppresses invasive recurrence in a 3D model of radiation treated DCIS, The 10<sup>th</sup> International Symposium for Future Drug Discovery and Medical Care, 2012年10月3日, Hokkaido University (Sapporo)
- ④ 南ジンミン, Ahmed Kazi, Costes

Sylvain, Zhang Hui, 佐邊壽孝, 白土博樹: 非浸潤性乳管癌の3次元培養細胞モデルにおける放射線の影響と再発に関わる分子機序の解析, 第71回日本癌学会学術総会, 2012年9月19日-21日, ロイトン札幌・さっぽろ芸文館・札幌市教育文化会館(北海道)

- ⑤ 小野寺康仁, 南ジンミン, 橋本あり, 白土博樹, 橋本茂, 佐邊壽孝: 癌浸潤における AMAP1-PRKD2 複合体によるインテグリンリサイクリングとその制御機構, 第71回日本癌学会学術総会, 2012年9月19日-21日, ロイトン札幌・さっぽろ芸文館・札幌市教育文化会館(北海道)
- ⑥ Nam JM, Zhang H, Sabe H, Shirato H, Park CC. Targeting integrin signaling to suppress invasive recurrence post-ionizing radiation in a 3D cell culture model of ductal carcinoma in situ, AACR specific conference: Advances in breast cancer research, 2011.10.12-15, The Fairmont San Francisco (USA)
- ⑦ Nam JM, Zhang H, Sabe H, Shirato H, Park CC: Targeting integrin signaling to suppress invasive recurrence post-ionizing radiation in a 3D cell culture model of ductal carcinoma in situ, The 9<sup>th</sup> Symposium for Future Drug Discovery and Medical Care, 2011.9.30, Hokkaido University (Sapporo)
- ⑧ Nam JM, Onodera Y, Shirato H, Bissell MJ, Park CC. Coordinate upregulation of  $\alpha 5 \beta 1$ -integrin and fibronectin by malignant breast cells in three dimensional cultures can be specifically targeted to enhance radiotherapy, 第63回日本細胞生物学会大会, 2011.6.27-29, 北海道大学(札幌)

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

Nam Jin-Min (NAM JINMIN)

北海道大学・大学院医学研究科・特任助教  
研究者番号: 60414132

### (2) 研究分担者

なし

### (3) 連携研究者

なし

### (4) 研究協力者

小野寺 康仁 (ONODERA YASUHIRO)

北海道大学・大学院医学研究科・助教

研究者番号: 90435561