

**科学研究費助成事業 研究成果報告書**

平成 29 年 5 月 15 日現在

機関番号：37116

研究種目：研究活動スタート支援

研究期間：2015～2016

課題番号：15H06804

研究課題名(和文)放射線照射後のレドックスステータスの変化は脳腫瘍幹細胞の放射線抵抗性に寄与するか

研究課題名(英文)Energy and ROS metabolism in radioresistant brain tumor stem cells

研究代表者

孫 略(Sun, Lue)

産業医科大学・産業生態科学研究所・訪問研究員

研究者番号：40757704

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,300,000円

研究成果の概要(和文)：研究当初、放射線被ばく後のレドックス状態の変化に着目したが、本研究で用いた実験系ではレドックスの変化は認められなかった。また、放射線照射後に投与することで細胞の生存率をレスキューできる抗酸化物質を見出すには至らなかった。一方で、脳腫瘍幹細胞様細胞が特殊なエネルギー代謝機構を有しており、これが放射線抵抗性に関与することが示唆された。

研究成果の概要(英文)：First of this study, we focus on Redox metabolism before and after irradiation in brain tumor stem-like cells (btSLCs). However we did not find noticeable difference between them. Next, we focus on energy metabolism in btSLCs. We found that btSLCs displayed lower oxidative phosphorylation activity and higher and lactate production than parental cells. Our findings also indicate that btSLCs metabolism plays an important role in maintaining radioresistance, and provide greater insight into the development of metabolic targeting radiotherapy to disrupt btSLCs.

研究分野：脳神経外科学

キーワード：脳腫瘍 がん幹細胞 酸化ストレス 解糖系 ミトコンドリア呼吸 放射線抵抗性

### 1. 研究開始当初の背景

がん細胞の階層(ヒエラルキー)の頂点に立つがん幹細胞は、強い腫瘍形成能と放射線抵抗性を有し、放射線治療後の再発の原因であると考えられている。これまでにがん幹細胞の放射線抵抗性メカニズムとして、DNA 修復能が亢進している(Bao S et al., Nature 444, 2006)、抗酸化能(活性酸素種(ROS)除去能)が強い(Haraguchi N et al., JCI 120, 2010)などの報告がなされているものの、未解明な点が多く残されている。

これまでに、致死線量を照射したマウスにビタミン C(Sato T et al., PloS one 10.2, 2015)、抗酸化性ミネラル含有熱処理酵母類(特開 2007-176879)、トコフェロールおよびその誘導体(特開 2008137942)を投与することで、マウスの生存率が改善されることが知られていた。さらに近年、放射線を照射した培養細胞にビタミン C の誘導体である AA-2G を投与することで、細胞の生存率が改善されたという報告がなされた(Kobashigawa S et al., Radiation research 183, 2015)。これらの報告は、被ばく後の酸化ストレス状況が個体や細胞の生存に関与することを示唆するものである。

生体のエネルギー産生経路において、ミトコンドリアを利用した好氣的な代謝を抑制し、主として解糖系による嫌氣的なエネルギー代謝を行うことは、細胞にとって有害な活性酸素種(ROS)の発生を抑制することができるので、細胞の生存に有利に働くと考えられている。最近の研究で、造血幹細胞ではミトコンドリアの活性が低く抑えられ、解糖系によるエネルギー産生が高くなっており、代謝経路を解糖系からミトコンドリア呼吸に誘導すると幹細胞としての能力を失うことが報告されている(Takubo K et al., Cell Stem Cell 12, 2013)。またがん細胞においても、解糖系からミトコンドリア呼吸にシフトさせると腫瘍縮小効果をもたらすことが示されている。これらのことから、がん細胞のエネルギー産生経路を解糖系からミトコンドリアによる TCA 回路へ人為的にシフトさ

せることで、放射線や抗がん剤の効果を高めることができるのではないかと期待されている。

申請者はこれまでに、ヒト髄芽腫細胞株 ONS-76 に放射線を照射し、生残細胞の中から CD133 強陽性、スフィア形成能、放射線抵抗性を示す脳腫瘍幹細胞様細胞を 3 株(ONS-F8、B11、F11)樹立している(Sun L et al., JRR 54, 2013)。

### 2. 研究の目的

申請者らが樹立した脳腫瘍幹細胞モデルを用いて、

- (1) 脳腫瘍幹細胞の放射線照射前後のレドックス状態を解明し、放射線抵抗性への関与を明らかにする。
- (2) 脳腫瘍幹細胞のエネルギー代謝機構を解明し、放射線抵抗性との関連を明らかにする。

### 3. 研究の方法

解糖系活性の指標として、細胞外に排出される乳酸の量とグルコース取り込み量を市販のキットを用いて解析した。ミトコンドリアの酸化的リン酸化の活性の指標として、酸素消費速度(OCR)を測定した。安定なフリーラジカル化合物である LiNc-BUO と細胞懸濁液を混合密封して ESR で測定すると、酸素濃度に依存して ESR スペクトルの線幅が狭くなることが知られている。本研究では、LiNc-BUO と細胞懸濁液を 37°C でインキュベートしながら経時的に ESR スペクトルを取得し、スペクトルの線幅の変化から OCR を評価した。細胞内 ROS 量、ミトコンドリア ROS 量、核内酸化ストレスをそれぞれの特異的蛍光プローブを用いて解析した。蛍光プローブを細胞に取り込ませ、その蛍光強度をフローサイトメトリーによって解析し、平均蛍光強度を算出した。細胞内の抗酸化活性は Tempol 還元速度を指標として解析した。Tempol は安定ニトロキシラジカルであり、脂溶性が高く、細胞内で還元されて ESR シグナルを失う。本研究では、Tempol と細胞懸濁液を 37°C でインキュベートしながら経時的に ESR ス

ペクトルを取得し、スペクトルの強度の変化から Tempol 還元速度を算出した。メタボローム解析はヒューマン・メタボローム・テクノロジー株式会社に外注した。放射線照射後の細胞生存率はコロニー形成法により求めた。

#### 4. 研究成果

(1) はじめに、脳腫瘍幹細胞様の ONS-F8 と B11 と親株の ONS-76 のレドックス状態を比較した。F8とB11は、親株よりも細胞内 ROS の量、ミトコンドリア ROS の量が共に少なく、核内の酸化ストレスも低かった。還元型グルタチオンの量はほとんど同じであった。

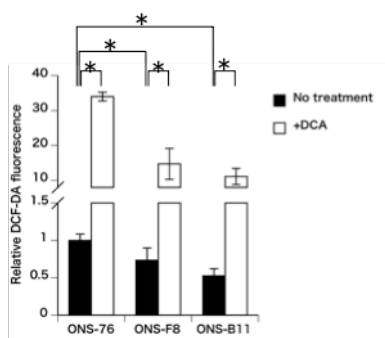


Fig1 細胞内 ROS 量

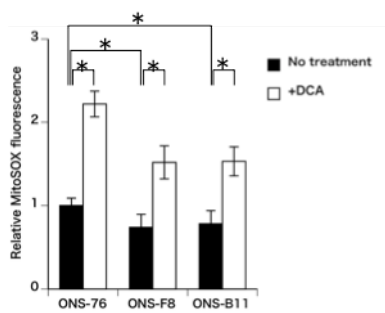


Fig2 ミトコンドリア ROS 量

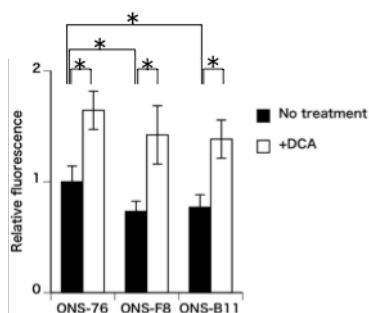


Fig3 核内酸化ストレス

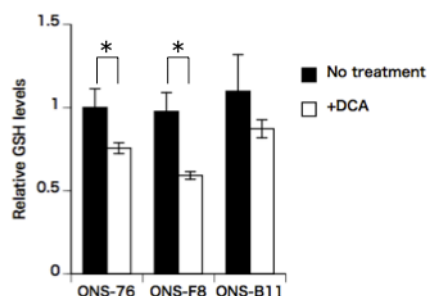


Fig4 還元型グルタチオン量

次に、F8 と 76 の放射線 8Gy 照射前後の Tempol の還元能を評価した。F8 は 76 より有意にスペクトル強度が減少する速度が遅く、還元能が弱いことが示された。一方で、放射線照射の前と後で、F8、76 共に有意な変化は見られなかった。

続いて、放射線照射後に抗酸化物質を投与して生存率が回復するか解析した。抗酸化物質の濃度はコロニー形成法で細胞毒性が観察されない濃度とした。Table 1 の通り 8 種類の抗酸化物質を試したが、放射線照射後投与することで生存率を変化させる化合物は存在しなかった。Kobashigawa らは、正常線維芽細胞に放射線照射後に AA-2G を投与することで、生存率が上昇したと報告しているが (Kobashigawa S et al., Radiation research 183, 2015)、我々の実験系では再現できなかった。

これらの結果から、本研究で用いた系では放射線照射後のレドックスバランスの変化が明確でなく、放射線抵抗性との関連も乏しいと考えた。

Table 1 本研究で使用した抗酸化物質

ビタミン C	トロロックス
NAC	コエンザイム Q10
AA-2G	APM
MnTBAP	EUK-8

(2) ミトコンドリア ROS がミトコンドリア呼吸と関連があるとの報告があったので、76、F8、B11 のエ

エネルギー代謝に着目し解析を行った。

酸素消費量と乳酸排出量を解析したところ、F8とB11は76より酸素消費量が低く、乳酸排出量が高かった。一方で、三者にグルコースの取り込み量の違いは見られなかった。さらにメタボローム解析の結果から、F8は76に比べ、ピルビン酸がアセチル CoA よりも乳酸に変換されている可能性が示唆された(Table 2)。

以上の結果から、脳腫瘍幹細胞様細胞は、解糖系の代謝を変化させることでミトコンドリア呼吸を抑制している可能性が示唆された。

Table 2 76 と F8 の中間代謝物の量

	ONS-F8 /ONS-76	P value (Welch's t test)
PEP	5.2	0.003
Pyruvic acid	0.75	N.A.
Intracellular lactic acid	1.3	0.7
Acetyl CoA	0.78	N.A.
Citric acid	0.87	0.03

次に、ピルビン酸→アセチル CoA の変換を促進する DCA を投与して、代謝と放射線抵抗性への影響を調べた。DCA を投与することで、細胞内 ROS、ミトコンドリア ROS、核内酸化ストレスがいずれも上昇した。コロニー形成法による放射線感受性の評価により、DCA に放射線増感効果があることがわかった。さらに、F8、B11 は76 より増感率が高いことがわかった。また DCA による増感メカニズムは、間接効果の増加ではなく、DNA 修復能の阻害にあることがわかった。

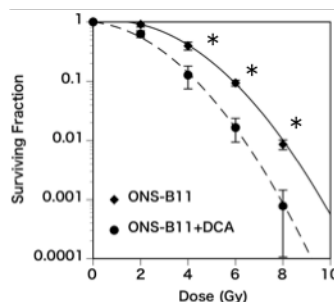
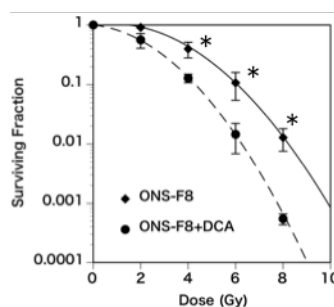
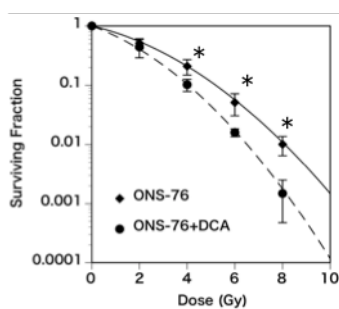


Fig5 DCA による放射線増感作用

研究当初、放射線被ばく後のレドックス状態の変化に着目したが、本研究で用いた実験系ではレドックスの変化は認められなかった。また、放射線照射後に投与することで細胞の生存率をレスキューできる抗酸化物質物質を見出すには至らなかった。一方で、脳腫瘍幹細胞様細胞が特殊なエネルギー代謝機構を有しており、これが放射線抵抗性に関与することが示唆された。

## 5. 主な発表論文等

[雑誌論文] (計 5 件)

- ① [Lue Sun](#), Takashi Moritake, Kazuya Ito, Yoshitaka Matsumoto, Hironobu Yasui, Hidehiko Nakagawa, Aki Hirayama, Osamu Inanami, Koji Tsuboi. Metabolic analysis of radioresistant medulloblastoma stem-like clones and potential therapeutic targets. PLoS ONE 12(4): e0176162, 2017 査読あり
- ② [Lue Sun](#), Takashi Moritake, Masaoki Kohzaki, Akira Ootsuyama and Ryuji Okazaki. Energy and ROS Metabolism in Radioresistant Brain Tumor Cells. Free Radical Biology and Medicine 100 (2016):S131. 査読あり
- ③ 孫略、盛武敬、香崎正宙、岡崎龍史；包括的代謝解析による放射線抵抗性がん幹細胞の特性解析；日本放射線影響学会第 1 回放射線ワークショップ講演論文集、2015 年、pp66-67 査読なし

研究者番号:40757704

- ④ Shoko Yamada, Lue Sun, Masashi Kawamoto and Shokei Yamada. SPINDLE CELLS IN EARLY C6-GBM GROWTH ARE STEM CELLS – FUNCTIONAL STUDY WITH MITOCHONDRIAL VOLUME FOR THERAPEUTIC PURPOSE. Neuro Oncol (2015) 17 (suppl 5): v64. 査読あり
- ⑤ Shoko Yamada, Lue Sun and Shokei Yamada. A ROLE OF SPINDLE CELLS IN GLIOBLASTOMA GROWTH. Neuro Oncol (2015) 17 (suppl 3): iii14. 査読あり

[学会発表] (計 6 件)

- ① Yuzei Wang, Lue Sun, Xiaokang Li, Koji Tsuboi. A Combined Local Treatment with Anti PD-1 Antibody and Bone Marrow Derived Dendritic Cells after X-ray Irradiation to Subcutaneous Melanoma in a Murine Model. The 2017 ASCO Annual Meeting. Chicago, USA. June 2-6, 2017,
- ② Lue Sun, Takashi Moritake, Masaoki Kohzaki, Akira Ootsuyama and Ryuji Okazaki, Energy and ROS Metabolism in Radioresistant Brain Tumor Cells. The Society for Redox Biology and Medicine's 23rd Annual Meeting. San Francisco, USA. November 16-19, 2016
- ③ Lue Sun, Energy and ROS metabolism in radioresistant brain tumor stem cells. Loma Linda University Medical Center, California, USA. November 9, 2016
- ④ 孫略、盛武敬、香崎正宙、岡崎龍史:包括的代謝解析による放射線抵抗性がん幹細胞の特性解析、日本放射線影響学会第 1 回放射線ワークショップ、富山大学五福キャンパス黒田講堂(富山県・富山市)、10 月 16-17 日、2015 年
- ⑤ 孫略、盛武敬、香崎正宙、岡崎龍史:髄芽腫幹細胞のエネルギー代謝機構と放射線抵抗性、第 52 回放射線影響懇話会、かごしま県民交流センター(鹿児島県・鹿児島市)、8 月 29 日、2015 年
- ⑥ 孫略、伊東一也、盛武敬:X 線照射により発生する遅延性 ROS が細胞の生存に与える影響の解析、第 68 回日本酸化ストレス学会学術集会、かごしま県民交流センター(鹿児島県・鹿児島市)、6 月 11-12 日、2015 年

## 6. 研究組織

### (1)研究代表者

孫 略(SUN, Lue)

産業医科大学産業生態科学研究所・訪問研究員

### (4)研究協力者

YAMADA, Shokei