

令和元年6月11日現在

機関番号：10101

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2016～2018

課題番号：16K10380

研究課題名(和文)放射線による細胞外微小環境の変化と浸潤癌再発を抑制するためのターゲット分子の探索

研究課題名(英文)Molecular targets to suppress microenvironment changes and invasive cancer recurrence after radiotherapy

研究代表者

Nam JinMin (Nam, JinMin)

北海道大学・国際連携研究教育局・講師

研究者番号：60414132

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,600,000円

研究成果の概要(和文)：がん細胞における細胞外微小環境の変化とインテグリンの制御は、放射線治療後のがん細胞の生存や浸潤・転移と密接に関係している。放射線照射後に特異的に生じる分泌物はがん微小環境を変化させ、がんの放射線治療耐性や悪性化にも影響を与えていると考えられる。本研究では、放射線照射後に引き起こされるがん細胞の細胞外微小環境の変化に着目して、放射線治療後に浸潤癌として進行もしくは再発する際の分子メカニズムを解析した。インテグリンを標的とした増感剤が放射線照射後のがん細胞の生存や浸潤性を抑制することを見出した。さらに、放射線照射後の浸潤能亢進に、リソソームの機能や輸送が関与することが示唆された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

近年、多くの種類のがん治療に放射線が用いられており、放射線治療により予後が高くなることが報告されている。一方、副作用の軽減や治療効果の向上のために、治療に使用する照射線量を低くする目的での放射線増感剤の探索や、浸潤癌再発・転移の抑制を目指した分子メカニズム解明が必要とされ、放射線生物学的な基礎研究の発展が急務である。学術的意義：放射線照射後、細胞外微小環境の変化に関わる、細胞内の小胞輸送と浸潤性に関連した分子メカニズムの一端を見出した。社会的意義：がん細胞の放射線への耐性に関わる研究成果から、将来、放射線治療の発展に役立つ可能性が期待できる。

研究成果の概要(英文)：Integrins regulation and microenvironment changes are involved in cancer cell survival, invasion and metastasis. Radiation can remodel the microenvironment by secreted molecules which contribute to radioresistance and enhancing invasive activity in cancer cells. In this study, we focused on microenvironment after radiation treatment, and analyzed molecular mechanisms of invasive recurrence after radiotherapy. We found that integrin-binding radiation sensitizer decreased cancer cell survival and invasive activity after radiation in breast cancer cells. In addition, our data suggest that lysosomes function and trafficking are involved in invasive activity after radiation treatment.

研究分野：医歯薬学

キーワード：放射線 癌浸潤 小胞輸送 インテグリン がん微小環境

1. 研究開始当初の背景

近年、放射線は、多くのがんの治療に用いられており、放射線に対して感受性が高いがんにおいて、治療後の予後が高くなることが報告されている。一方で、放射線照射による副作用や、一部では、治療後に悪性度の高い浸潤癌として再発する例もある。従って、治療に使用する照射線量を低くするための放射線増感剤の探索や、浸潤癌再発の抑制を目指した分子メカニズム解明などの放射線生物学的な基礎研究の発展が急務である。

これまで、細胞表面レセプターの一つである $\alpha 5 \beta 1$ -integrin が、複数種類のがん細胞の表面で放射線照射後に発現が亢進し、がん細胞の放射線耐性に関わっていることが報告されている。また、我々のこれまでの研究では、放射線照射後の乳癌細胞において、 $\alpha 5 \beta 1$ -integrin のヘテロダイマーの一つである $\alpha 5 \beta 1$ -integrin の発現が上昇し、細胞外微小環境との相互作用を介して照射後のがん細胞の生存に寄与することを報告している。細胞外微小環境の要素を取り入れるため、細胞外マトリックス (Extracellular matrix; ECM) を用いた 3 次元細胞培養実験系による解析において、 $\alpha 5 \beta 1$ -integrin の阻害ペプチドと放射線照射を組み合わせることによって、放射線単独で処理するよりも、乳癌細胞の生存を効果的に抑制することを報告してきた (Nam et al, Cancer Research, 2010)。また、3 次元細胞培養系における初期段階の乳癌モデル (非浸潤性乳管癌: ステージ 0) を用いて、放射線照射後の浸潤性を伴った再発様態への転換には、基底膜構造の破壊が必須である事と、その後に $\alpha 5 \beta 1$ -integrin とそのリガンドである Fibronectin の発現と分泌の上昇が関与する事を見出している (Nam et al, Breast Cancer Research, 2013)。

このように、がん細胞による細胞外微小環境の変化は、がん細胞の生存や浸潤・転移に密接に関係していることから、放射線照射後に微小環境を変化させるタンパク質の分泌や輸送過程の変化は、がんの放射線治療耐性や悪性化にも影響を与えていると考えた。そこで本研究では、放射線照射後に引き起こされるがん細胞の細胞外微小環境の変化に着目して、放射線治療後に浸潤癌として進行もしくは再発する際の分子メカニズムを解析した。

2. 研究の目的

本研究では、放射線治療後の浸潤癌再発を防ぐための知見を得る事を目的とし、放射線照射後のがん細胞の浸潤能亢進に関わる分子の特定と、細胞外微小環境を変化させる分泌物の小胞輸送制御の分子メカニズムの解析を行った。

(1) 放射線効果の向上のため、放射線照射後の浸潤能を抑制する細胞外微小環境に関連した分子を標的にして、放射線増感効果や、浸潤能抑制効果を検証する。放射線照射後の乳がん細胞の生存や浸潤性獲得に関わっていることが知られている「インテグリン」を標的にした金ナノコロイドを用いて、放射線との併用効果を検討した。

(2) 放射線照射後に、がん細胞の生存と浸潤能獲得に有利に働く細胞外微小環境の形成に関わる分子メカニズムの一端を解明する。特に、がん微小環境の変化をもたらす、分泌物や分泌経路 (小胞輸送) の変化に着目して、解析を進める。

3. 研究の方法

(1) インテグリンを標的にしたがん細胞に対する放射線増感剤を作成し、放射線の効果を検証した。増感剤として、金ナノコロイド (20 nm) に RGD (インテグリン結合配列) 合成ペプチドを表面修飾することで、インテグリンを標的にすることを可能とした。がん細胞は、乳癌細胞株 (MDA-MB-231, Hs578T, SK-BR-3) を用いた。RGD 修飾金ナノコロイドの細胞内への取り込みと局在は共焦点レーザー顕微鏡により確認した。細胞への放射線照射は、X 線装置 (Cell Rad, 130 kV) を用いて行った。細胞の生存は、細胞数の計測や Cell Counting Kit-8 (CCK-8; Dojindo) を用いて測定した。DNA の 2 重鎖切断は、核内での γ -H2AX をマーカーとして、数を計測し、定量を行った。遺伝子発現の解析は、RNA を抽出後、マイクロアレイを行った (3D-Gene, Toray)。タンパク質発現は、ウェスタンブロットにより確認した。細胞の浸潤能は、マトリゲルインバージョンアッセイを用いて検討した。

(2) 放射線照射後、細胞外微小環境を変化させるタンパク質の分泌を制御する細胞内小胞輸送に着目した解析を行った。細胞は、MDA-MB-231 乳癌細胞株を用いた。細胞を用いた *in vitro* 実験では、ウェスタンブロットによるタンパク質の解析、マトリゲルインバージョンアッセイによる浸潤能測定、shRNA (small hairpin RNA) による特定分子の発現を抑制した細胞株を用いた解析、Venus を融合させた特定分子のトランスフェクションによる過剰発現などの実験系により検討を行った。小胞の細胞内局在は、共焦点レーザー顕微鏡により画像を取得後、細胞中心部の微小管形成中心 (MTOC; microtubule organizing center) からの距離により計測した。マウスの実験では、ルシフェラーゼ安定発現細胞株 (4T1-Luc マウス細胞株) を用いて、*in vivo*

Imaging System (IVIS Imaging System, Perkin Elmer) の発光シグナルの強度測定により、腫瘍の大きさと転移を検討した。

4. 研究成果

(1) インテグリン高発現細胞株 (MDA-MB-231 細胞, Hs578T 細胞) において、RGD 修飾金ナノコロイドは、効率良く細胞内に取り込まれた (図 1)。また、インテグリン (alpha5-integrin, alphav-integrin) と RGD 修飾金ナノコロイドの共局在も共焦点レーザー顕微鏡で確認した (図 2)。RGD 修飾金ナノコロイドと X 線 (4 Gy) を組み合わせて処理したところ、X 線単独処理に比べて、MDA-MB-231 細胞の生存数が減少した (細胞数計測、および、CCK-8 測定)。さらに、RGD 修飾金ナノコロイドと X 線 (4 Gy) の組み合わせ処理によって、DNA の 2 重鎖切断の増加も確認できた。

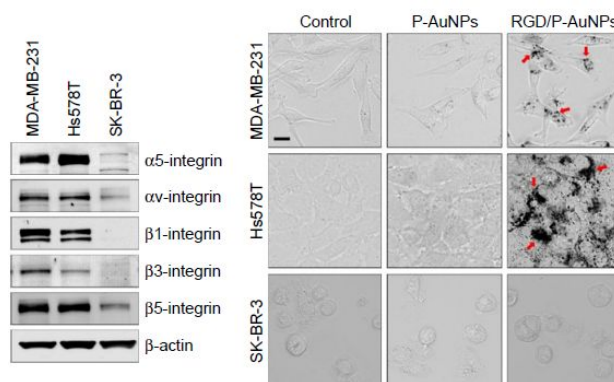


図 1 乳癌細胞株におけるインテグリンの発現 (左) と RGD 修飾金ナノコロイドの細胞内への取り込み

X 線照射後に生き残った MDA-MB-231 細胞における浸潤能の亢進を、RGD 修飾金ナノコロイドの処理によって抑制することができた。遺伝子解析では、放射線照射により増加するフィブロネクチン (FN1) の発現が、RGD 修飾金ナノコロイドによって抑制される結果が得られた。以前の研究により、放射線照射後に生じるフィブロネクチンの発現・分泌の増加がインテグリンのシグナルを促進し、放射線照射後の生存や浸潤能獲得に関わることを見出し (Cancer Research, Nam et al., 2010; Breast Cancer Research, Nam et al., 2013)、その結果とも一致する。本研究で用いた RGD 修飾金ナノコロイドは、放射線照射後のフィブロネクチンの発現抑制と ERK の活性 (インテグリンの下流のシグナル) を抑制することが確認できた。

共焦点レーザー顕微鏡によって、RGD 修飾金ナノコロイドはインテグリンと共に、MDA-MB-231 細胞内の後期エンドソームや「リソソーム」にて高い割合で共局在が確認された。このことから、放射線照射後の浸潤能亢進にリソソーム機能が関連することが示唆された。

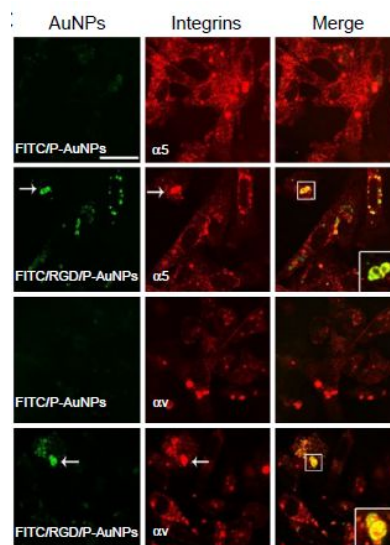


図 2 RGD 修飾金ナノコロイドとインテグリンの共局在

(2) リソソームの機能が放射線照射後の浸潤能亢進に与える影響を詳細に解析した。特に、リソソームの分泌過程に着目して検討を進めた。まず、リソソームの阻害剤によって、放射線照射後の MDA-MB-231 細胞の浸潤能が抑制されることを確認した。また、放射線照射によって、リソソームのエキソサイトーシス (細胞小胞が中心部から周辺部へ移動する動き) が促進されることを見出した。関連分子を特定し、shRNA による安定的なノックダウン細胞を用いて、放射線によって亢進される浸潤能への影響を確認した。引き続き、放射線照射後に生き残った細胞を用いたマウスの *in vivo* イメージング実験系によって、*in vitro* 実験結果の検証を行っている。

< 引用文献 >

- Giaccia AJ., Molecular radiobiology: the state of the art.(2014) *J Clin Oncol*, 32(26):2871-8.
- Nam JM, Chyng Y, Hsu HC, Park CC., 1 integrin targeting to enhance radiation therapy. (2009) *Int J Radiat Biol*, 85(11): 923-8.
- Eke I, Zscheppang K, et al., Simultaneous 1 integrin-EGFR targeting and radiosensitization of human head and neck cancer. (2015) *J Natl Cancer Inst*, 107(2).
- Nam JM, Onodera Y, Bissell MJ, Park CC, Breast cancer cells in three-dimensional culture display an enhanced radioresponse after coordinate targeting of integrin alpha5beta1 and fibronectin.(2010) *Cancer Res*, 70: 5238-48.

- Nam JM et al., 1 integrin via NF- B signaling is essential for acquisition of invasiveness in a model of radiation treated in situ breast cancer. (2013) *Breast Cancer Res*, 15(4):R60
- Eke I, Cordes N., Radiobiology goes 3D: how ECM and cell morphology impact on cell survival after irradiation. (2011) *Radiother Oncol*, 99(3):271-8.
- Onodera Y, Nam JM, et al., Arf6-driven cell invasion is intrinsically linked to TRAK1-mediated mitochondrial anterograde trafficking to avoid oxidative catastrophe. (2018) *Nat Commun*. 11;9(1):2682.

5 . 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計 2 件)

- Wu PH, Onodera Y, Ichikawa Y, Rankin EB, Giaccia AJ, Watanabe Y, Qian W, Hashimoto T, Shirato H, Nam JM. Targeting integrins with RGD-conjugated gold nanoparticles in radiotherapy decreases the invasive activity of breast cancer cells. *International Journal of Nanomedicine*, 査読有, 2017,12: 5069-5085
DOI: 10.2147/IJN.S137833.
- Rankin EB, Nam JM, Giaccia AJ. Hypoxia: Signaling the metastatic cascade. *Trends in Cancer*, 査読有, 2016, 2 (6), p295-304
DOI: 10.1016/j.trecan.2016.05.006

〔学会発表〕(計 3 件)

- 呉乗修, 小野寺康仁, 白土博樹, 南ジンミン. 乳癌細胞における放射線照射後のリソソームのエキソサイトーシスと浸潤能亢進. 第 77 回日本癌学会学術総会, 大阪, 2018.9.27-29. (国内)
- Wu PH, Onodera Y, Giaccia AJ, Le QT, Shirato H, Nam JM. Radiation increases invasive activity of breast cancer cells via altering lysosome exocytosis. AACR Annual Meeting 2018 (米国癌学会年会) Chicago, 2018.4.14-18. (国際)
- Wu PH, Onodera Y, Ichikawa Y, Rankin EB, Giaccia AJ, Watanabe Y, Qian W, Hashimoto T, Shirato H, Nam JM. Targeting integrins with RGD-conjugated gold nanoparticles in radiation therapy. 日本放射線腫瘍学会第 30 回学術大会, 大阪, 2017.11.17-19. (国内)

6 . 研究組織

(1)研究分担者

研究分担者氏名: 森岡 裕香

ローマ字氏名: (MORIOKA, Yuka)

所属研究機関名: 北海道大学

部局名: 遺伝子病制御研究所

職名: 講師

研究者番号 (8 桁): 00360264

(2)研究協力者

研究協力者氏名: 小野寺 康仁

ローマ字氏名: (ONODERA Yasuhiro)

科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属されます。