

令和 2 年 6 月 30 日現在

機関番号：17701

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2017～2019

課題番号：17K10485

研究課題名(和文)放射線治療の予後判定の可能性(放射線抵抗性の獲得と癌の浸潤・転移との関連性)

研究課題名(英文)Prognostic prediction of radiotherapy (The relativeness of radioresistance and cancer invasion, metastasis)

研究代表者

犬童 寛子 (INDO, HIROKO)

鹿児島大学・医歯学域歯学系・准教授

研究者番号：00301391

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,200,000円

研究成果の概要(和文)：ラット扁平上皮癌細胞SCC-158を用い、スフェロイド(150, 300, 450um)を作製し、500mGy/日で10、20および30日間連続X線照射を行い、長期間放射線に暴露され生き残った細胞の癌の浸潤能や転移能について検討した。10、20および30日間照射群において、p53およびS100A4の発現は未照射群と比較して、10日で最も高く、P53のリン酸化についても同様の結果であった。これらの結果から、照射していく過程において抵抗性を獲得し、様々なシグナル伝達を経て癌の浸潤や転移能を獲得していくことが示唆された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

スフェロイドを作成し、腫瘍塊にX線照射を行うので、通常の2次元培養細胞よりも臨床に近い状態にて実験を遂行することができる。癌の放射線治療を行う上で、放射線抵抗性の獲得と癌の転移との関連性について明らかにすることは放射線治療が有効であるかどうか、また再発・後発転移するかどうかの予後の判定が可能になることが予測される。また放射線抵抗性の獲得の機序解明へとつながることも予想され、放射線治療研究分野への大いなる貢献が期待される。

研究成果の概要(英文)：A rat squamous cell carcinoma cell line SCC-158, of which p53 status is wild, was used in this study. Spheroids, of which diameter is (150, 300, 450) um were subjected to X-irradiation at the dose of 500mGy/day for 10, 20 and 30 days (10 days, 20 days and 30 days Groups). The survived cells were recovered and subjected to examine its characteristic cancer invasion and metastasis. Among the culture day group, the 10 days group showed the highest expressions of p53 and S100A4 that is related to metastasis, and also showed highest amount of p53 phosphorylation. These results may suggest that radio-resistance may be acquired during the irradiation process, leading to cancer invasion and metastasis.

研究分野：放射線

キーワード：放射線抵抗性 癌

## 様式 C-19、F-19-1、Z-19 (共通)

### 1. 研究開始当初の背景

癌の放射線治療において、放射線抵抗性の獲得は放射線治療の効果を低下させることにより、再発や後発転移に非常に大きな影響を及ぼす。S100A4 も、p53 の DNA 結合を抑制することでその機能を抑制すること、S100A4 のノックダウンでは p53 依存性の細胞周期停止、シスプラチン誘導アポトーシスが増加することが報告されている (Orre LM et al. Oncogene, 2013)。放射線や化学療法に対する抵抗性の研究は、これまで数多くなされておき、また癌の浸潤・転移に関する研究も数多くなされてきた。しかし、癌の転移と放射線抵抗性獲得との関連性についてはいまだよくわかっていない。放射線抵抗性を獲得した癌細胞は再発や転移の可能性が高くなることは容易に予測されるが、実際にその分子生物学的な解明はよくわかっていない。

### 2. 研究の目的

S100A4 は癌の浸潤にも関与し、その発現は p53 によって調整されているということが報告されている。本研究では、S100A4、p53 に着目し、放射線照射後、放射線抵抗性を獲得した細胞における癌の浸潤能や転移能を調べ、癌の転移と放射線抵抗性の関連性を明らかにし、放射線治療の予後判定の可能性について検討する。

### 3. 研究の方法

ラット扁平上皮癌細胞 SCC-158 を、スフェロイド作製用超低着表面 96well プレート (Corning, 7007) に 1000、5000 または 10000 cells/well で播種し、それぞれ直径 150、300、450  $\mu\text{m}$  のスフェロイドを作製した。作製したスフェロイドに対して X 線照射装置 (MBR-1505R, 日立メディコ) を用いて、1Gy/min の線量率で 500mGy の X 線を照射した (120kV、3.8mA、37°C に設定したホットプレート上にて)。照射回数は 500mGy/日 で 10、20 および 30 日間 (5Gy、10Gy、15Gy) 毎日行った。既定の日数の照射をし終わった段階でスフェロイドを各々回収し、細胞分散液 Accumax (エムエステクノシステムズ) を用いて細胞を分散させた。通常の培養条件下で分散させた細胞を一定期間培養し、生き残った細胞を回収した。

スフェロイド内部細胞の形態変化については、電子顕微鏡にて観察した。

上記方法にて回収した細胞と X 線未照射群の細胞について、p53 および S100A4 の mRNA 発現を RT-PCR にて検討した。タンパクレベルでは p53 および S100A4、VEGF、HIF-1 の発現と p53 のリン酸化について、ウェスタンブロットにて検討を行なった。

### 4. 研究成果

スフェロイド (直径 150、300、450  $\mu\text{m}$ ) の内部性状を確認するために、電子顕微鏡にてスフェロイドの内部細胞を観察したところ、直径 450  $\mu\text{m}$  のスフェロイドにおいて明らかな形態変化がみられた (図-1)

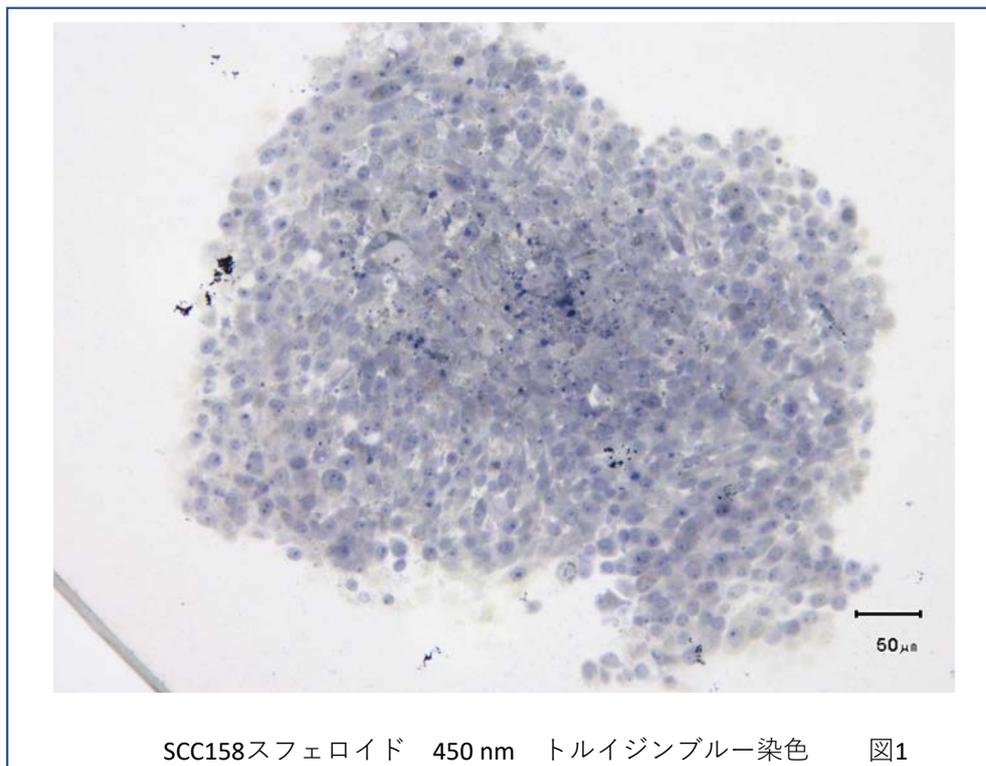
長期間放射線に暴露されて生き残った細胞は癌の浸潤能や転移能があがるのかどうかを検討するために、10、20 および 30 日間照射群と未照射群における p53 および S100A4 の mRNA 発現、タンパクレベルでは p53 および S100A4 の発現と p53 のリン酸化について検討した。その結果、p53 および S100A4 の発現は未照射群と比較して、10 日間照射群がその発現量は最も高く、20 日、30 日間照射群になるにつれて減少していた (図 2-a)。P53 のリン酸化についても同様の結果であった (図 2-b)。

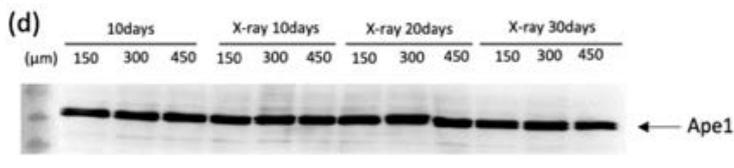
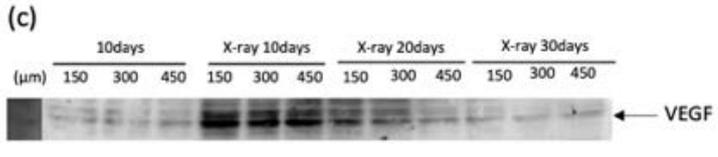
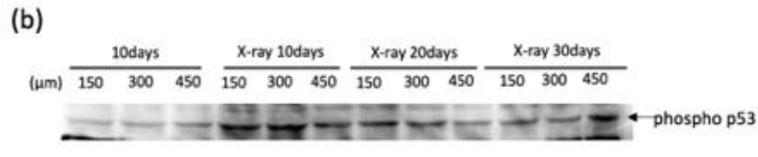
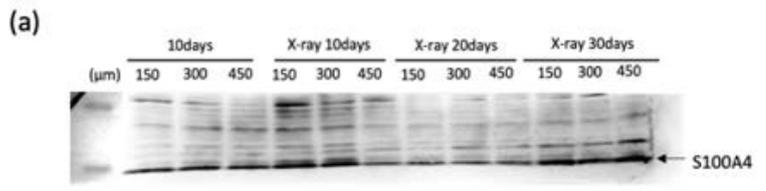
これらの結果から、P53 は細胞周期、アポトーシスなどを始め、様々なシグナル伝達関与しており、10 日間照射群では放射線障害に対するシグナル伝達として働いているが、20 日、30 日間照射群になるにつれ、放射線障害に対して順応していく可能性が考えられた。

電顕で直径  $450\ \mu\text{m}$  のスフェロイドにおいて明らかな形態変化がみられたことから、血管内皮細胞増殖因子 (VEGF) と低酸素誘導因子 (HIF-1) について調べたところ、HIF-1 については 10、20 および 30 日間照射群、いずれの群も未照射群と比較して変化は見られなかったが、VEGF については、S100A4 と同様、10 日で最も高く、20 日、30 日になるにつれて減少していた (図 2-c)。APE1 の高発現が放射線抵抗性に関与しているとの報告があり、放射線抵抗性に関連する遺伝子によって放射線抵抗性を獲得されるのかどうかを調べるために、APE1 の発現量をウェスタンブロットにて検討したところ、この実験系ではスファロイドの大きさ、照射日数を変えてもコントロール群との間に有意差はみられなかった (図 2-d)。

スフェロイドに X 線照射を行うので、通常の 2 次元培養細胞よりも臨床に近い状態にて実験を遂行することができ、電顕にて内部の細胞性状の変化を知ることができた。

放射線抵抗性の獲得についてはまだ検討する余地が残っているが、照射していく過程において抵抗性を獲得し、様々なシグナル伝達を経て癌の浸潤や転移能を獲得していくことが示唆された。





5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計0件

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
研究分担者	末永 重明  (Suenaga Shigeaki)  (00136889)	鹿児島大学・医歯学域附属病院・講師   (17701)	
研究分担者	長澤 大成  (Nagasawa Taisuke)  (50773925)	鹿児島大学・医歯学域歯学系・助教   (17701)	
研究分担者	馬嶋 秀行  (Majima Hideyuki)  (60165701)	鹿児島大学・医歯学域歯学系・教授   (17701)	
研究分担者	伊藤 紘  (Ito Hiromu)  (80793934)	鹿児島大学・医歯学域歯学系・助教   (17701)	