

令和 2 年 7 月 13 日現在

機関番号：10101

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2017～2019

課題番号：17K15375

研究課題名(和文) イヌ腫瘍細胞株におけるがん幹細胞の分離およびmTOR阻害剤の放射線増感効果

研究課題名(英文) Isolation of cancer stem cells and radiosensitizing effects of mTOR inhibitors in canine tumor cell lines.

研究代表者

細谷 謙次 (Hosoya, Kenji)

北海道大学・獣医学研究院・准教授

研究者番号：50566156

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,000,000円

研究成果の概要(和文)：がん幹細胞(CSC)の存在は、がんの放射線治療において、癌細胞の残存・再発につながる重要な要因である。本研究では、犬の腫瘍細胞株を用いて、CSCの分離法を確立し、CSCの放射線抵抗性の機序を明らかとし、さらにCSCを放射線感受性にする薬剤の探索を目的とした。

Spheroid culture法にて分離した細胞を調べたところ、元の細胞よりもCSCの特徴を示すことが確認された。このCSCが多く含まれる細胞群は元の細胞よりも放射線抵抗性であり、機序としてミトコンドリアの機能亢進が認められた。ミトコンドリア機能を阻害する薬剤として、メトフォルミンがCSCに対して放射線増感効果があることが確認された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

従来、がん幹細胞の存在は議論のあるところであり、臨床の放射線治療においてはその存在は重要視されてきていなかった。本研究では複数の腫瘍細胞株においてがん幹細胞の存在が示され、それらを分離培養する手法も確立された。このCSCの放射線抵抗性の機序として、これまで注目されていなかったミトコンドリア機能亢進という機序が明らかになったことで、従来とは異なる新たな放射線増感戦略が立てられるものと思われる。実際に本研究においてミトコンドリア機能を阻害するメトフォルミンにCSC特異的な放射線増感効果が認められており、上記の理論が裏付けされている。今後は放射線治療に応用できる新たな放射線増感剤の探索が見込まれる。

研究成果の概要(英文)：Presence of cancer stem cells (CSCs) are thought to be one reason to explain local recurrence after radiation therapy for malignant tumor. The aims of this study were to establish isolation method of CSCs in canine tumor cell lines, to elucidate mechanism of radioresistance, and to identify agents to reverse CSCs' radioresistance.

We have shown the cells isolated by spheroid culture method express characteristics of CSCs. These CSC-rich population was shown to be more radioresistant than the original cell line, the mechanism for which was shown to be due to increased function of mitochondria in response to irradiation. Metformin, an anti-diabetic agent, was found to inhibit mitochondrial function and thereby reversing the radioresistance of CSCs.

研究分野：獣医腫瘍学

キーワード：イヌ がん幹細胞 放射線療法 メトフォルミン mTOR 増感剤

1. 研究開始当初の背景

悪性腫瘍に対する**放射線療法**は、人医療および獣医療での癌治療に不可欠な重要な治療法である。放射線治療後の見た目上の治療反応は通常劇的であり、CT/MRI 上での腫瘍塊の完全消失を見ることは珍しくない。それにも関わらず、悪性腫瘍においては、一旦消失した腫瘍組織の**再発**が頻繁に認められ、強度変調放射線治療 (IMRT) を用いた照射線量の増加などが試みられているが、治療成績の大きな改善は認められていない。

がん幹細胞 (Cancer Stem Cells: CSCs) とは、腫瘍組織中に 0.1% 未満の割合で存在する、幹細胞の特徴を有するサブセットである。CSCs は、正常組織の幹細胞と同様に、放射線や化学療法剤に対して**抵抗性**であり、これらの従来療法では多くの腫瘍が根治できない主要な原因と考えられている (図 1、2)。

CSCs の放射線抵抗性のメカニズムとして、幹細胞に特徴的な**独特な糖代謝系**や、細胞の生存や増殖にかかわる細胞内シグナル伝達経路 (**PI3K-Akt-mTOR 経路**) の増強などが提唱されているが、これらの経路の障害が CSCs の放射線感受性に与える影響を明らかにした報告はない。

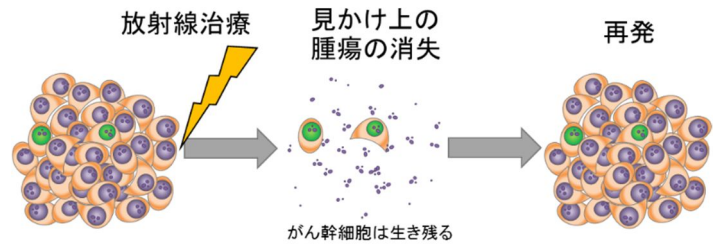


図 1. がん幹細胞 (緑) による再発様式の模式図

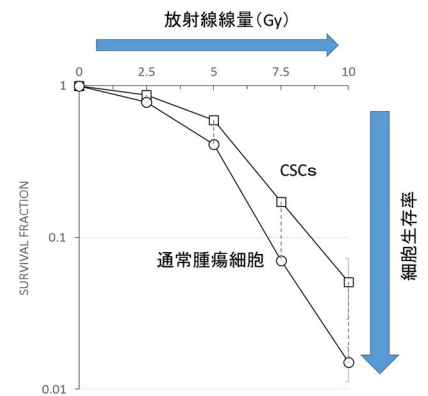


図 2. 放射線照射による通常腫瘍細胞と CSCs の生存率の変化

2. 研究の目的

上記の背景より、**CSCs を標的とした増感療法**が放射線治療成績の改善につながる可能性が期待される。そのため、本研究では、CSCs の放射線抵抗性の機序を明らかと系、糖代謝系および PI3K-Akt-mTOR 経路を標的とした治療薬の中から、CSCs の**放射線抵抗性をリバース**できる可能性のある薬剤を同定することを目的とした。そのために、

- (1) 各種腫瘍細胞株における CSCs の存在の証明と分離培養
- (2) 各種腫瘍細胞株 CSCs における遺伝子発現・細胞内シグナル伝達系異常の検出
- (3) *In vitro* における CSCs の放射線抵抗性メカニズムの解析
- (4) CSCs に対する Metformin およびその他の PI3K-Akt-mTOR 経路阻害剤による放射線

増感効果

- (5) 正常犬における PI3K-Akt-mTOR 阻害剤の薬物動態解析
- (6) 腫瘍罹患犬における Metformin/その他の mTOR 阻害剤と放射線療法の併用効果の検

討を実施することを計画した。

3. 研究の方法

(1) 細胞株

実験には、犬自然発生腫瘍 (6 種類) 由来の以下の細胞株 (計 12 細胞株) を用いた:

- ・骨肉腫 (POS、HMPOS)
- ・悪性黒色腫 (CMeC、MCM-N1)
- ・移行上皮癌 (MCTCC、LCTCC、MegTCC、MomoTCC)
- ・肥満細胞腫 (CoMS)
- ・組織球性肉腫 (DH82、CHS-4)
- ・肺腺癌 (CLAC)

(2) CSCs の分離培養法

上記 12 細胞株中 4 株 (HMPOS、CMeC、MegTCC、CLAC) を用いて、スフェア形成法 (特殊な成長因子の存在下で無血清培地で細胞を培養する手法) にて CSCs の分離培養を試みた。分離された細胞に対し、各種 CSC 分子マーカーの発現量をリアルタイム PCR 法を用いて定量した。また、こ

これらの細胞が腫瘍形成能が高いことを確認するために、ヌードマウスへの接種実験を行った。

(3) CSCs の放射線感受性試験

上記実験で得られた細胞に線 (2.5-10Gy) を照射し、コロニー形成法にて生存曲線を作成した。

(4) CSCs の放射線抵抗性の機序解析

放射線照射時の CSCs の反応を、DNA 修復反応およびミトコンドリア機能を電子スピンリソナンス (ESR) 法にて評価した。

(5) CSCs の放射線抵抗性の機序解析

CSCs および親細胞株の AMPK/mTOR シグナル経路の変化の有無をリアルタイム PCR 法およびウェスタンブロット法にて解析した。

(6) メトフォルミンによる放射線増感効果

上記実験をメトフォルミン存在下にて実施し、同薬剤が CSCs の放射線抵抗性をリバーズするかを検討した。さらに、マウス移植モデルを用いて、in vivo におけるメトフォルミンの放射線増感効果を検証した。

(7) 犬腫瘍細胞株における mTOR 阻害薬の細胞毒性効果

上記放射線抵抗性と mTOR シグナル経路の関連性を検討するに先立って、mTOR 阻害薬 6 種類を用いて、犬腫瘍細胞株 12 株における細胞毒性効果/増殖抑制効果を検討した。また、その際に認められた mTOR 阻害薬感受性/抵抗性に関する因子の詳細な解析を実施した。

(8) CSCs の可視化に関する試み

個々の細胞が CSCs であるか、non-CSC であるかの識別を可能とするために、遺伝子導入により CSCs のみが蛍光を発色するような系の作出を試みた (図 3)。

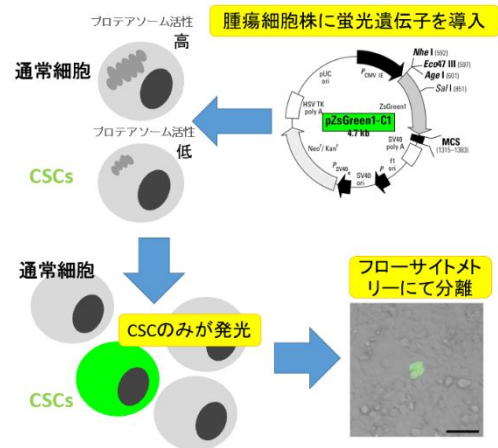
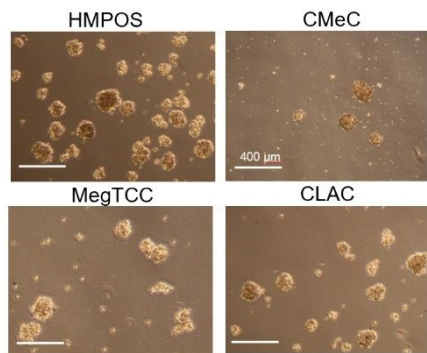


図 3 . 遺伝子導入により CSCs を可視化する模式図。

4 . 研究成果

(1) 犬腫瘍細胞株からの CSCs の分離培養

試行した 4 細胞株すべてにおいて、CSCs を多く含むスフェア細胞塊の形成に成功した (図 4a)。分離された CSCs では、幹細胞マーカーである CD133, Oct-4, Sox-2, c-myc, CD34 の高発現が確認された。



さらに、これらの細胞はマウスに移植した際に、 1×10^2 個という非常に少ない数の接種で腫瘍を形成した。

(2) CSCs の放射線感受性

スフェア形成法にて分離した CSCs 4 株は、いずれもそれぞれの親細胞株に比較して、有意な放射線抵抗性を示した (図 4b)。

(3) CSCs の放射線抵抗性の機序

CSCs では、放射線暴露後の DNA2 本差切断数が有意に少なく、これは細胞内におけるミトコンドリアの機能亢進に由来していることが判明した。特に、CSCs では照射後のミトコンドリアにおける電子伝達系の活性化を介して、酸素消費量を更新することで放射線抵抗性を示していることが示唆された。AMPK/mTOR シグナル経路に異常は認められず、CSCs の放射線抵抗性の機序に AMPK/mTOR 経路が関与している可能性は否定的であった。

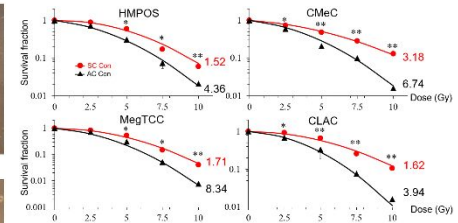


図 4 . (a) 無血清培地と特殊条件で分離培養した犬の CSCs と (b)放射線暴露後の生存曲線

(4) メトホルミンによる放射線増感効果

CSCs の放射線抵抗性は、メトホルミンを作用することで打ち消され、生存曲線が親細胞株のそれに近くなることが認められた (図5)。

メトホルミンのミトコンドリアの電子伝達系の活性化抑制効果によるものであり、メトホルミンによる AMPK/mTOR シグナル経路への影響は確認されなかった。このことは、CSCs に対して、選択的 mTOR 阻害剤 (Gedatolisib) および選択的ミトコンドリア Complex 1 阻害剤 (Rotenone) を作用させた検証でも同様であった (図6)。メトホルミンの放射線増感効果は、マウス移植モデルを用いた *in vivo* の試験においても確認された (図7)。

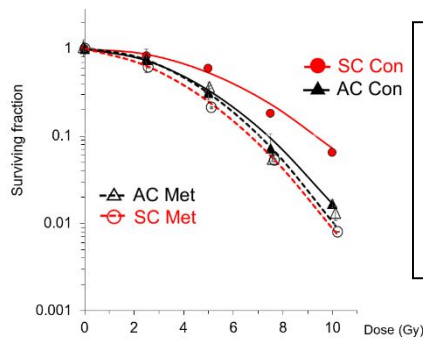


図5. 親細胞株 (AC) と CSCs-rich な細胞群 (SC) とのホウ砂線感受性の比較。メトホルミン (Met) の添加によって SC の感受性は AC に近似する。

CSC 選択的な放射線増感効果は、

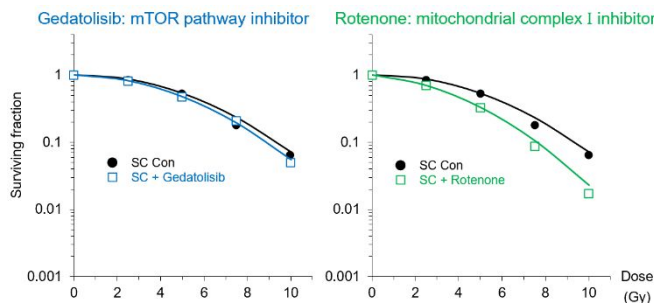


図6. mTOR 阻害剤およびミトコンドリア阻害剤の CSCs 増感効果の比較。

Metforminは照射後の再発を抑制する

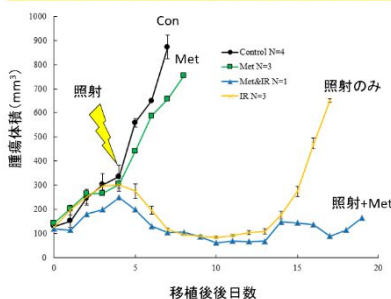


図7. 腫瘍移植マウスにおける放射線単独およびメトホルミン投与の効果。

(5) 犬腫瘍細胞株における mTOR 阻害薬の基礎的検討

犬腫瘍細胞株において、mTOR 阻害薬は濃度依存性に細胞毒性/増殖抑制効果を示した (図7)。

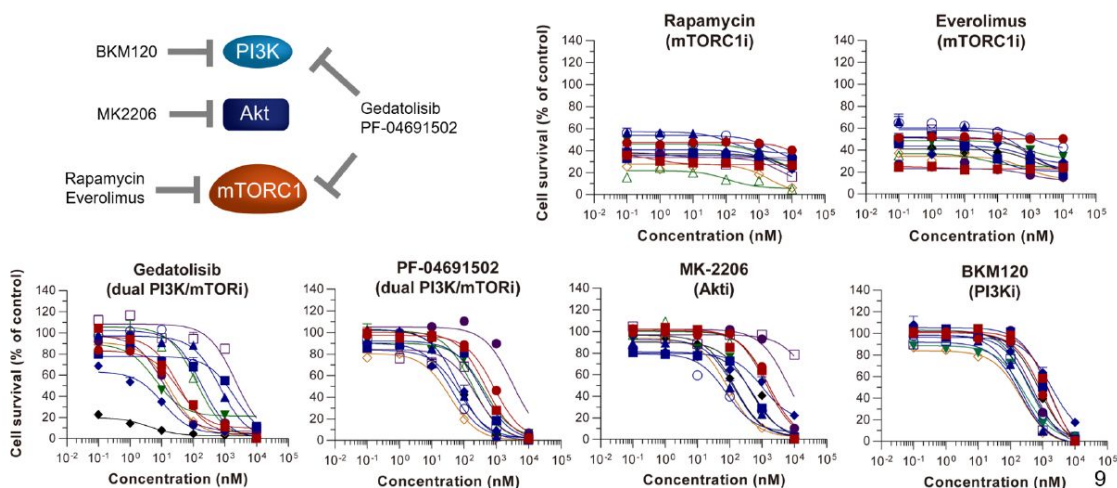


図7. 犬腫瘍細胞株における各種 mTOR 阻害薬の増殖抑制効果。

(6) 犬腫瘍細胞株における CSCs の可視化の試み

現在までに、犬骨肉腫細胞株および移行上皮癌細胞株の2株において、蛍光遺伝子の導入に成功し、CSCs と思われる一部の腫瘍細胞の蛍光発色を確認しており、これら発色細胞が CSCs の特徴を有するかを現在検証中である。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計1件（うち査読付論文 1件／うち国際共著 0件／うちオープンアクセス 0件）

1. 著者名 Deguchi T, Hosoya K, Murase Y, Koangyong S, Kim S, Okumura M.	4. 巻 17
2. 論文標題 Analysis of radiosensitivity of cancer stem-like cells derived from canine cancer cell lines.	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Veterinary and Comparative Oncology	6. 最初と最後の頁 119-129
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1111/vco.12452.	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

〔学会発表〕 計16件（うち招待講演 0件／うち国際学会 11件）

1. 発表者名 Tatsuya Deguchi, Kenji Hosoya, Yusuke Murase, Sangho Kim, Masahiro Okumura
2. 発表標題 Metformin radiosensitizes cancer stem-like cells but not non-stem cells in canine osteosarcoma cell line by AMPK/mTOR-independent mechanism.
3. 学会等名 Veterinary Cancer Society Annual Meeting (国際学会)
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 出口辰弥、細谷謙次、金 尚昊、山本久美子、房 知輝、安井博宣、稲波 修、奥村正裕
2. 発表標題 メトホルミンのイヌ骨肉腫細胞株由来のCancer stem-like cellsにおける放射線増感効果の解析
3. 学会等名 第21回癌治療増感研究シンポジウム 2019年2月
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Deguchi T, Hosoya K, Murase Y, Kim S, Okumura M.
2. 発表標題 Metformin radio-sensitizes cancer stem-like cells but not no-stem cells in canine osteosarcoma cell line by AMPK/mTOR-independent mechanism.
3. 学会等名 2018 Veterinary Cancer Society (VCS) Annual Conference (国際学会)
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 Deguchi T, Hosoya K, Murase Y, Kim S, Okumura M.
2. 発表標題 Metformin radio-sensitizes cancer stem-like cells derived from canine osteosarcoma cell line.
3. 学会等名 The 6th Sapporo Summer Seminar for One Health (SaSSOH) (国際学会)
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 出口辰弥、細谷謙次、村瀬優介、金 尚昊、奥村正裕
2. 発表標題 メトホルミンのイヌ骨肉腫細胞株由来のCancer stem-like cellsに対する放射線増感効果の解析
3. 学会等名 第161回日本獣医学会学術集会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 Yusuke Murase, Kenji Hosoya, Takachika Sato, Sangho Kim, and Masahiro Okumura
2. 発表標題 Gedatolisib (PF-05212384), a dual PI3K/mTOR inhibitor, induces anti-tumor activity and P-glycoprotein is involved in the resistance in canine tumors in vitro
3. 学会等名 The 6th Sapporo Summer Symposium for One Health (国際学会)
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 Yusuke Murase, Kenji Hosoya, Takachika Sato, Sangho Kim, and Masahiro Okumura
2. 発表標題 Gedatolisib (PF-05212384) induces anti-tumor activity against various types of canine tumor in vitro
3. 学会等名 第77回日本癌学会学術総会 (The 77th Annual Meeting of the Japanese Cancer Association) (国際学会)
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 Yusuke Murase, Kenji Hosoya, Takachika Sato, Sangho Kim, and Masahiro Okumura
2. 発表標題 Gedatolisib (PF-05212384), a dual PI3K/mTOR Inhibitor, induces anti-tumor activity and P-glycoprotein and is involved in the resistance in canine tumors in vitro
3. 学会等名 Veterinary Cancer Society Conference 2018 (国際学会)
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 Tatsuya DEGUCHI, Yusuke MURASE, Sangho KIM, Kenji HOSOYA and Masahiro OKUMURA
2. 発表標題 Analysis of cancer stem-like cells derived from canine cancer cell lines.
3. 学会等名 The 5th annual meeting of Sapporo Summer Seminar for One Health (国際学会)
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 出口辰弥、細谷謙次、村瀬優介、金 尚昊、奥村正裕
2. 発表標題 イヌの腫瘍細胞株由来Cancer stem-like cellsの放射線反応性の解析
3. 学会等名 第160回日本獣医学会学術集会
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 出口辰也、細谷謙次、山本久美子、房 知輝、安井博宣、稲波 修、金 尚昊、奥村正裕
2. 発表標題 メトホルミンのイヌ骨肉腫細胞株由来Cancer stem-like cellsにおける放射線増感効果の解析
3. 学会等名 第22回菅原・大西記念癌治療増感シンポジウム
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 出口辰弥、細谷謙次、金 尚昊、山本久美子、房 知輝、安井博宣、稲波 修、奥 村 正裕
2. 発表標題 イヌ骨肉腫細胞株由来Cancer stem-like cellsのミトコンドリアの放射線反応性の解析
3. 学会等名 第72回酸化ストレス学会学術集会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Koangyong Sung, Kenji Hosoya, Yusuke Murase, Tatsuya Deguchi, Sangho Kim, Takafumi Sunaga, Masahiro Okumura
2. 発表標題 Establishment of the visualization system for cancer stem cells with low proteasome activity in a canine osteosarcoma cell line.
3. 学会等名 SaSSOH (7th Sapporo Summer Symposium for One Health) 2019 (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Yusuke Murase, Kenji Hosoya, Takachika Sato, Tatsuya Deguchi, Sangho Kim, Takafumi Sunaga, Masahiro Okumura
2. 発表標題 ABCB1-mediated acquired resistance to a dual PI3K/mTOR inhibitor gedatolisib in canine tumor cell lines
3. 学会等名 Veterinary Cancer Society 2019 (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Yusuke Murase, Kenji Hosoya, Takachika Sato, Tatsuya Deguchi, Sangho Kim, Takafumi Sunaga, Masahiro Okumura
2. 発表標題 ABCB1-mediated acquired resistance to a dual PI3K/mTOR inhibitor gedatolisib in canine tumor cell lines
3. 学会等名 The 7th Sapporo Summer Seminar for One Health 2019 (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 村瀬優介、細谷謙次、 出口辰弥、 金尚昊、 奥村正裕
2. 発表標題 ABC1-mediated acquired resistance to a dual PI3K/mTOR inhibitor gedatolisib in a canine transitional cell carcinoma cell line
3. 学会等名 第78回日本癌学会学術総会（国際学会）
4. 発表年 2019年

〔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
--	---------------------------	-----------------------	----