

令和 2 年 6 月 15 日現在

機関番号：32612

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2017～2019

課題番号：17K16483

研究課題名(和文)放射線照射後グリオーマ幹細胞の細胞間クロストークによる治療抵抗性の解析

研究課題名(英文)Analysis of radioresistance and intercellular crosstalk of postirradiation glioma stem cells

研究代表者

公田 龍一 (KOTA, Ryuichi)

慶應義塾大学・医学部(信濃町)・助教

研究者番号：00464834

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,100,000円

研究成果の概要(和文)：本研究は脳腫瘍細胞が放射線に抵抗する仕組みの中で、特に放射線照射によって増強される獲得放射線抵抗性の解明を目的とし、マウスグリオーマ幹細胞モデル細胞(iGSC)を用いて放射線抵抗性に寄与する因子を探索した。解析の結果、放射線照射によりiGSCが細胞老化に陥るとIGFBP3という分泌タンパクの発現が低下することが明らかになった。一般にIGFBP3が少ない環境においてはIGFのシグナルレベルが上昇することが知られており、より細胞生存に有利な状況となる。放射線照射で死滅しきれず生き残った腫瘍細胞は周囲の老化細胞が多い状況でより生存に適したフェノタイプを取ることが明らかになった。

研究成果の学術的意義や社会的意義

グリオブラストーマは極めて悪性度の高い治療困難な悪性脳腫瘍である。放射線治療の処方線量を増やすようなシンプルな手法では治療成績改善につながらないことが分かっている。そのため放射線治療抵抗性の要因を解除するようなアプローチが治療成績改善のために必要となる。本研究ではグリオーマ幹細胞に対する放射線照射により細胞老化が誘導され、分泌タンパクの一種であるIGFBP3の低下が生存しているグリオーマ幹細胞の放射線抵抗性に寄与していることが示された。これは新たな知見であり、今後悪性脳腫瘍に対する放射線治療の線量分割法を考慮する上で基礎的なバックボーンを与える知見となり得る。

研究成果の概要(英文)：The purpose of this study is to elucidate the acquired radiation resistance of brain tumor cells, which is enhanced by irradiation itself. In this study, murine glioma stem cells (iGSC) were used as model cells of human glioblastoma stem cells. As a result of the analysis, it was revealed that a single dose of 10Gy irradiation caused cellular senescence, and the expression of a secretory protein IGFBP3 was decreased. In general, it is known that the IGF signal is fortified in an environment with a low amount of IGFBP3. Also in iGSC, it was confirmed that the expression of phosphorylated Akt was increased downstream of IGF. These findings suggest that cellular survival signals are activated by a radiation-induced low IGFBP3 extracellular environment.

研究分野：放射線医学

キーワード：放射線抵抗性

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

グリオブラストーマは極めて悪性度の高い治療困難な悪性脳腫瘍である。近年試みられた線量増加試験では治療成績や患者 QOL を改善するに至らず、放射線治療自体の強度を高めるのみでは治療成績改善につながらないことが分かっている。そのため放射線治療抵抗性の要因を解除するようなアプローチ、放射線増感が治療成績改善のために必要となる。例えば腫瘍内の低酸素環境をターゲットとした高圧酸素療法の併用や低酸素増感剤を併用する取り組みがなされている。本研究では腫瘍細胞自体の放射線抵抗性の解除を目的とし、グリオーマ幹細胞に対する放射線照射により誘導される変化、特に細胞外に放出されて腫瘍細胞の自己複製能の上昇や放射線抵抗性に寄与する因子の探索を目的として開始された。

2. 研究の目的

腫瘍細胞に対して長期間にわたり反復して放射線照射を行うことで放射線抵抗性を獲得する現象は様々な癌種において先行研究が存在する。しかしながらその過程において短期的にどのような変化が生じているかは明らかになっていない。本研究は放射線に暴露された人工グリオーマ幹細胞が単回照射後にどのような短期的変化を起こし放射線抵抗性を発揮するに至るかを明らかにすることを目的として、主に細胞老化と周囲環境の変化に軸を置いて研究を行った。

3. 研究の方法

研究は以下の段階で進化した。

- (1) 人工グリオーマ幹細胞の生存および自己複製能の評価
- (2) 人工グリオーマ幹細胞の自己複製能を向上させる分泌性因子の同定
- (3) 分泌性因子が放射線抵抗性を惹起するメカニズムの解明

4. 研究成果

平成 29 年度

(1) In vitro sphere formation assay

iGSC の sphere 形成能を培地を変えて評価。96well plate に 1 細胞播種し、sphere の形成された well の数をカウントする。この時に iGSC の通常培養に用いる NSM (neural stem cell media) と培養中の iGSC に照射して採取した培養上清で sphere 形成能に差があるかを比較をした。結果として、照射後の培養上清で顕著な自己複製能の向上が観察された (図 1 左)。

(2) Agarose-embedding colony formation assay

0.5% アガロース培地中に細胞を播種し、1 週間培養したのちに固定・染色し sphere をカウントした。アガロース培地とその上層に用いる液体培地は NSM と iGSC に照射して採取した培養上清の両者を用いて自己複製能の比較を行った。

結果、照射後の培養上清を用いることで顕著な自己複製能の向上が確認された。

次に NSM、共培養、培養上清の 3 者比較のセッティングでアガロース包埋した人工グリオーマ幹細胞に放射線照射を行い生存解析を行った。結果として、NSM 群に比較して、照射後の細胞との共培養および照射後の細胞の培養上清による培養では放射線抵抗性が観察された。これらの結果から、人工グリオーマ幹細胞に対する放射線照射により何らかの因子が放出されるかして周囲の細胞に影響を与え、自己複製能の向上、放射線抵抗性の向上が付与されることが示された (図 1 右)。

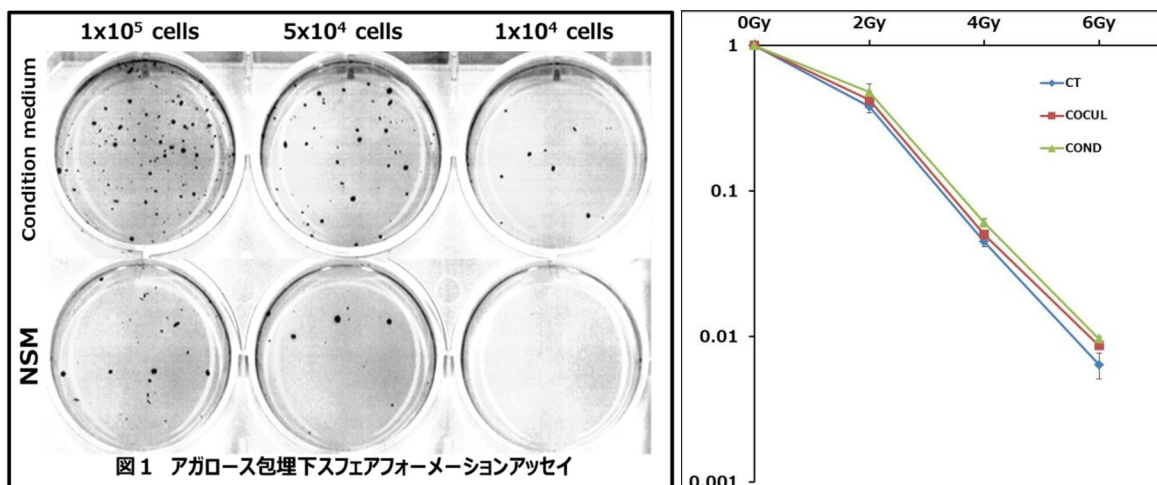


図 1 アガロース包埋下スフェアフォーメーションアッセイ

CT:通常培地 COCUL:照射後細胞との共培養 COND:培養上清

(3) 照射後人工グリオーマ幹細胞の態様

顕微鏡観察での形態から放射線照射は細胞老化を惹起していることが強く疑われたため、SA-bGAL 染色で細胞老化の観察を行った。Standard treat の培養皿に細胞外マトリックスを塗布して細胞接着を向上させ、5Gy、10Gy の放射線照射を行い、二日後に染色を行った。結果、5Gy 照射で約 80%、10Gy ではほぼ 100%の細胞で細胞老化が生じた (図 2)。

(4) 自己複製能を向上させる分泌性因子の同定

照射後人工グリオーマ幹細胞の分泌性因子として エキソソーム、 サイトカイン、 代謝基質を考えたが Biochemical analyzer (BP400, Nova Biomedical 社) を用いた培養上清の代謝基質測定では有意な因子を同定できなかった。次に液性因子の探索の目的でマイクロアレイ解析を行った。対象群に比較して放射線照射によって 2 倍以上発現が上昇あるいは低下している遺伝子をスクリーニングし、GSEA (Gene set enrichment analysis) 及びネットワーク解析を行ったところ、分泌タンパクとしては IGFBP3 の低下が認められた。

さらに ELISA 法により発現レベルでの確認を行ったところ、IGFBP3 の発現低下がみられたが、IGF1 の発現量は照射の有無で変化なかった (図 3)。



図2 SA-bGAL染色(10Gy照射後48時間)

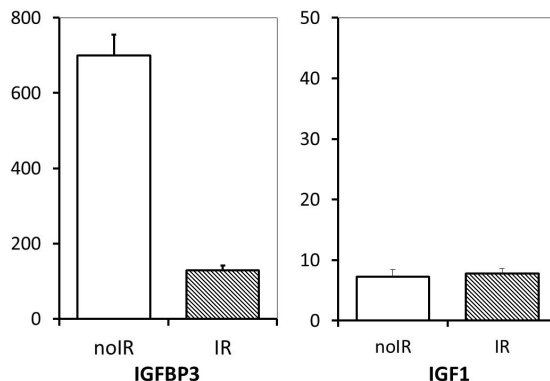


図3 ELISA法による培養上清中のIGF1およびIGFBP3の濃度[ng/ml]

(5) リコンビナント IGFBP3 の添加による放射線抵抗性の変化

0.5%アガロース培地中に細胞を播種し、NSM、放射線照射後の培養上清、放射線照射後の培養上清にリコンビナント IGFBP3 を添加したものの 3 者で細胞生存率の比較実験を行った。結果、放射線培養上清に IGFBP3 を添加したものでは NSM と同等の生存率を示し、照射後の培養上清による放射線抵抗性の付与はキャンセルされた。このことから IGFBP3 の低下が生存率に寄与していることが示唆された。

平成 31 年度 (令和元年度)

(6) 免疫プロット法による AKT シグナルの確認

IGFBP3 は IGF と複合体を形成して血中での安定化に寄与することが知られている。一方で複合体を形成することは IGF の受容体への結合能の低下を招き IGF シグナル自体は減弱する。実験 5 で得られた結果を追試する目的で IGF の下流で働く AKT のシグナルを確認した。照射後のコンディションメディウムで培養したサンプル、そして同じコンディションメディウムにリコンビナント IGFBP3 を添加して調整した培地で培養したサンプルを 3 サンプルずつ用意し、免疫プロット法によりリン酸化 AKT の発現をみた。結果、コンディションメディウムに比して IGFBP3 を添加したサンプルではリン酸化 AKT の発現レベルが低く生存シグナルとして差が生じていることが示唆された (図 4)。

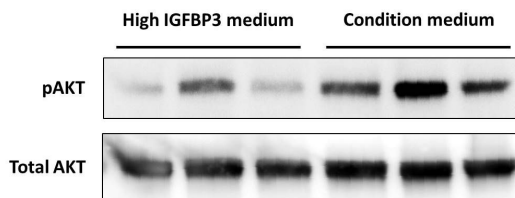


図4 免疫プロット法 リン酸化AKTの発現

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
--	---------------------------	-----------------------	----