

機関番号：22701

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2008～2010

課題番号：20591500

研究課題名(和文) 3次元培養がん細胞を用いた、ギャップ結合から見た放射線抵抗性メカニズムの解明

研究課題名(英文) Elucidation of the mechanism for radioresistance from the viewpoint of gap junction using 3D-cultured cancer cells

研究代表者

鳥越 総一郎 (TORIGOE SOICHIRO)

横浜市立大学・医学研究科・客員研究員

研究者番号：：20264658

研究成果の概要(和文)：

頭頸部の培養がん細胞 HSC4・CAL27 は、いずれも mRNA レベルでは connexin43 の発現が見られたが、タンパクレベルでは発現が見られず、gap junction の機能が低下している可能性が考えられた。また、OSC-19・HSC-3 細胞において、低酸素下での培養ではγ線感受性の低下を認められたが、connexin 43 の発現量に有意な変化は見られなかった。

使用した細胞株においては connexin 43 と放射線感受性との明確な関連を見出せなかった。

研究成果の概要(英文)：

Since both HSC4 and CAL27, head and neck cancer cell lines, expressed connexin43 mRNA but exhibit no expression at protein level, hypofunction of gap junction was speculated. In another experiment, OSC-19 and HSC-3 cell lines showed decreased IR sensitivity under hypoxic culture condition, but no significant change in connexin43 protein. No obvious relationship was revealed between connexin43 and IR sensitivity in used cell lines.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2008年度	1,200,000	360,000	1,560,000
2009年度	1,200,000	360,000	1,560,000
2010年度	600,000	180,000	780,000
年度			
年度			
総計	3,000,000	900,000	3,900,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：内科系臨床医学・放射線医学

キーワード：がん・培養細胞・ギャップ結合・放射線・抵抗性

1. 研究開始当初の背景

癌治療、とくに頭頸部癌の治療は機能や形態の温存が求められ、放射線治療・化学療法への期待は近年急速に高まっている。しかし、進行癌や再発症例においては放射線治療・化学療法に対して抵抗性を示すものがあり、抵抗性メカニズムの解明と抵抗性の克服が大きな課題となっている。

放射線に直接曝露された細胞には、細胞死の亢進、姉妹染色分体交換、染色体不安定性、細胞内活性酸素種の増加、p53 細胞内含有量の増加など様々な生物効果が引き起こされる。しかし、このような生物効果は放射線に直接曝露された細胞のみならず近傍に存在する全く放射線が通過していない細胞(バイスタンダー細胞)にも観察される。

この現象はバイスタンダー効果と呼ばれ、細胞間シグナル伝達系によってもたらされると考えられている。

ギャップ結合は間隙を有した細胞間接着構造である。この構造を介して1000-1500Da以下の低分子物質は或る細胞から隣の細胞へ移動し、細胞間にシグナルを伝達する。ギャップ結合は細胞間シグナル伝達の場合として、バイスタンダー効果に関与しているとされる。HeLaやMCF-7などの株化腫瘍細胞をはじめ、ある種の腫瘍細胞ではコネクシン34の発現が見られないか、リン酸化によってギャップ結合が機能しておらず、バイスタンダー効果は観察されない。しかし、それらの細胞に非リン酸化コネクシン34を強制発現させるとバイスタンダー効果が現れ、放射線感受性が増強すると報告されている[*Otolaryngol Head Neck Surg.* 2006 Nov;135(5):736-43]。

一方、代表的な化学療法剤の一つであるシスプラチン(CDDP)の殺細胞効果においてもギャップ結合を介したバイスタンダー効果が深く関与していることが報告されている[*Proc Natl Acad Sci U S A.* 2004 Apr 20;101(16):6134-9]。それによれば、シスプラチンに曝露された細胞内でDNA修復蛋白の1つであるKu80依存的に致死シグナルが生じ、ギャップ結合を介するシグナル伝達によってバイスタンダー効果が得られると結論づけられている。

上記より、ギャップ結合の機能は放射線治療、化学療法との両面で重要な役割を担うと推察される。

ところで、以上の知見は一般的な平面培養から得られた結果である。臨床例のように3次元に増殖する腫瘍組織では平面に比べ隣接する細胞が多いため、ギャップ結合の果たす役割はより大きいと考えられる。

2. 研究の目的

まず3次元培養癌細胞(スフェロイド)において同様の実験を行い(②)、3次元癌細胞におけるギャップ結合機能と放射線感受性の関係を明らかにする。次に、我々はコネクシン34について、open reading frame 全長を含む動物細胞発現用発現ベクターおよびその一部を欠失させた優性抑制型発現ベクターを保有している。そこで、3次元培養した上記の各細胞においてコネクシン34のタンパク発現量・リン酸化状態・細胞内局在について調べた後、HeLaなどコネクシン34タンパク発現のない株については野生型の発現ベクターを、非リン酸化(=機能型)コネクシン34を優位に発現している株については

優性抑制型発現ベクターあるいはsiRNAを強制発現させることにより、コネクシン34タンパク発現量・リン酸化状態と放射線感受性との関連を明らかにする(③)。更に、放射線感受性を低下させる因子としてよく知られている低酸素・低pHの環境下で細胞を3次元培養し、上記阻害剤やコネクシン34の発現ベクター/siRNAを用いてギャップ結合機能と放射線感受性との関係を明らかにする(④)。低酸素についてはストレス蛋白の一種であるHIF-1 α (hypoxia-inducible factor)と放射線抵抗性との関連が知られているが、HIF-1 α は転写因子でもあるので、HIF-1 α タンパク発現量とコネクシン34の発現量・リン酸化の関連についても検討する(⑤)。また、我々はCDDP(シスプラチン)耐性頭頸部癌細胞株を保有しており、その株を材料として同様の実験を行い、薬剤耐性とギャップ結合機能との関連を検討する(⑥)。

3. 研究の方法

実験1 平面培養・3次元培養頭頸部癌細胞におけるギャップ結合阻害剤添加による放射線(γ 線)感受性の検討

今回我々はSAT, CAL27, HSC4, UM-SCC6, UM-SCC23, UM-SCC81Bといった頭頸部癌細胞、およびコントロールとしてコネクシン34タンパクを発現していないHeLa細胞、コネクシン34タンパクを発現し、細胞間接着因子の研究によく使われるMDCK細胞を用いる。頭頸部癌細胞については、抗コネクシン34抗体を用いたWestern blottingで内在性コネクシン34タンパクの発現量およびリン酸化状態を確認しておく。通常、コネクシン34タンパクはリン酸化の程度に応じ3本程度の移動度の異なるバンドとして認められるので、発現量とリン酸化状態を同時に評価できる。ギャップ結合阻害剤はlindaneまたはoleamideを用い、細胞増殖に影響せず、かつ結合機能阻害効果の得られる100 μ M前後の最終濃度で使用する。ギャップ結合阻害の成否は、細胞をカッターナイフ等で傷つけた直後にlucifer yellowなどの染色液を添加し、蛍光顕微鏡下で蛍光の広がりを観察することにより評価する(scrape loading assay)。各細胞株における放射線(γ 線)感受性はコロニー形成法を用いた生存率測定により評価する。即ち、平面培養では細胞を10cmディッシュに蒔き、細胞間接着が最大限に発達するようコンフルエントな状態まで培養を続けた後、 γ 線照射装置(現有設備:GammaCell140)により1-10Gyの範囲で線量

を変えて照射し、トリプシン-EDTA により細胞を剥がした上で細胞数をカウントし、500-1000 個を 6cm ディッシュに植え直し、7-10 日間さらに静置培養した後、クリスタルバイオレット染色によりコロニーを染色し、細胞数 50 個以上の集団をコロニーとしてカウントする。3 次元培養細胞は市販のプラスチック培養機器(住友ベークライト社製セルタイトスフェロイド)を用いて上記細胞株を静置培養することにより自然に得られる。一定サイズの細胞凝集塊(スフェロイド)が出来た後、上記と同様に γ 線を照射する。照射後、ギャップ結合を介した細胞間シグナル伝達に概ね十分とされる 2 時間程度静置した上、トリプシン処理により細胞をばらばらにしてカウントし、上記と同様にコロニー形成法により感受性を評価する。

実験 2 3 次元培養癌細胞でのコネクシン 43 タンパク発現量・リン酸化状態・細胞内局在の検討

コネクシン 43 タンパク発現量は通常の抗コネクシン 43 抗体を用いた Western blot でバンド(*)の濃度(全バンドの濃度の合計)として測定する。(*)はリン酸化状態を反映して移動度の異なるものが 3 つほど見られることが知られており、リン酸化は低移動度のものを測定することにより評価する。また、リン酸化特異的抗コネクシン 43 抗体も市販されており、適宜それを利用する。細胞内局在はカバーガラス上に蒔いた細胞を 4%パラホルムアルデヒド溶液で固定、0.5%Triton X-100 で permeabilize した後、一次抗体、蛍光二次抗体を用いて染色し、蛍光顕微鏡下(当施設内の機器を借用)に評価する。

実験 3 野生型・優性抑制型コネクシン 43 発現ベクター、siRNA 導入後の 3 次元培養癌細胞を用いた、正常酸素分圧・通常 pH 環境下におけるギャップ結合機能と放射線感受性の関連の検討

野生型・優性抑制型コネクシン 43 発現ベクターは既に作成済である。また、siRNA は業者に委託して発現ベクターを合成し、安定発現株を得た上で実験する。細胞へのベクター導入には市販のリポフェクション試薬を用いる。平面培養細胞に各々の発現ベクターを発現させた上で 3 次元培養し、それを用いて上記ギャップ結合阻害剤添加による放射線感受性の変化を検討する。放射線感受性はコロニー形成法で評価する。

実験 4 野生型・優性抑制型コネクシン 43 発現ベクター、siRNA 導入後の 3 次元培養癌細胞を用いた、低酸素・低 pH 環境下におけるギャップ結合機能と放射線感受性の関連の検討

低酸素環境は新規にマルチガスインキュベーター(SANYO 社製)を購入し、空気を一定割合 N_2 で置換することにより達成する。低 pH は液体培地中の炭酸塩含量を増すことで作り出す。それぞれの環境下で、実験 3 と同様の方法によりギャップ結合機能と放射線感受性の関連につき検討する。

実験 5 3 次元培養癌細胞を用いた、低酸素環境下における HIF-1 α タンパク発現量とコネクシン 43 発現量・リン酸化の関連の検討

低酸素環境の達成方法は上記 4 と同様。数種の癌細胞株から 3 次元培養細胞を作成、低酸素下で一定期間培養後タンパクを抽出し、抗 HIF-1 α 抗体および抗コネクシン 43 抗体を用いた Western blotting によりそれぞれの発現量およびコネクシン 43 のリン酸化程度を測定し、相互の関連につき細胞種間で比較検討する。

実験 6 3 次元培養 CDDP(シスプラチン)耐性癌細胞でのギャップ結合機能と薬剤耐性の関連の検討

既に作成保有している CDDP 耐性癌細胞を用い、ギャップ結合阻害剤添加または野生型・優性抑制型コネクシン 43 発現ベクター、siRNA 導入後に 3 次元培養する。一定期間培養後、薬剤耐性の変化につき軟寒天培地中でのコロニー形成法により検討する。

4. 研究成果

頭頸部癌細胞株 3 種を用いた scrape loading assay では、gap junction inhibitor である lindane (50 μ M・100 μ M) 処理で control と比較し、明らかな拡散の制限を認めなかった。次に、コントロールとして平面培養時の MDCK 細胞および頭頸部癌細胞株 2 種につき、lindane 添加による γ 線感受性の変化を調べたところ、lindane 処理による γ 線感受性の変化は見られなかった。

RT-PCR および Western blotting による mRNA・蛋白レベルでの connexin43 の発現を調べたところ、mRNA レベルでは MDCK・HSC4・CAL27 いずれでも発現が見られたのに対し、

蛋白レベルでは2種の異なる1次抗体を用いた結果、1つの抗体ではMDCKのみ、他の抗体ではHSC4のみに発現を認めた。CAL27はいずれの抗体でもconnexin43の発現が見られなかった。以上の結果から、使用した頭頸部癌細胞株では、いずれもgap junctionの機能が無いか低下している可能性が考えられた。

次に、放射線抵抗性因子として知られる低酸素・低PHの環境下におけるギャップ結合の機能及び薬剤耐性におけるギャップ結合の機能について明らかにするため、低酸素下における頭頸部癌細胞の蛋白発現について解析を行った。本研究費により導入したマルチガスインキュベーターを用いて様々な酸素濃度OSC-19およびHSC-3をそれぞれ24時間、48時間培養させた後、細胞内蛋白を抽出し、Western blottingを用いてHIF-1 α の発現量を検討した。OSC-19およびHSC-3どちらにおいても酸素濃度と逆相関でHIF-1 α の発現量の変化が認められた。次に3次元培養系で同様の解析を行ったが、3次元培養では細胞内蛋白の抽出のための細胞処理に時間がかかるためか、低酸素下条件でのHIF-1 α の発現上昇は認められなかった。またconnexin43との相関性についても明らかではなかった。

次に上記条件下での γ 線感受性について解析を行ったところ、いずれの細胞においても低酸素化での感受性の低下を認めたが、期待されるほどの差は認めなかった。これは実験機器の物理的距離の関係で、照射の際に低酸素の条件を長時間保持できていない可能性が考えられた。

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

なし

6. 研究組織

(1) 研究代表者

鳥越 総一郎 (TORIGOE SOICHIRO)
横浜市立大学・医学研究科・客員研究員
研究者番号：20264658

(2) 研究分担者

光藤 健司 (MITSUDOU KENJI)
横浜市立大学・医学部・准教授
研究者番号：70303641
(H20→H21：連携研究者)
筑丸 寛 (CHIKUMARU HIROSHI)
横浜市立大学・医学部・助教
研究者番号：80217231
(H20→H21：連携研究者)

太田 信介 (OHTA SHINSUKE)
横浜市立大学・医学研究科・客員研究員
研究者番号：30336581
(H20→H21：連携研究者)
足立 誠 (ADACHI MAKOTO)
横浜市立大学・附属病院・指導診療医
研究者番号：10468192
(H20→H21：連携研究者)

(3) 連携研究者
()

研究者番号：