

機関番号：11301

研究種目：若手研究（B）

研究期間：2009～2010

課題番号：21710055

研究課題名（和文）臨床応用に向けた放射線耐性細胞の in vivo における総合的解析

研究課題名（英文）The study of clinically relevant radioresistant cells for the development of more effective tumor radiotherapy

研究代表者

桑原 義和 (KUWAHARA YOSHIKAZU)

東北大学・加齢医学研究所・助教

研究者番号：00392225

研究成果の概要（和文）：がんの放射線療法で問題となる放射線耐性細胞を克服するために、ヒト由来がん細胞から放射線耐性細胞の樹立に取り組み、成功した。X線で誘発される細胞死を解析すると、親株ではオートファジー細胞死が誘発されるが、放射線耐性細胞では誘発されにくいことが分かった。放射線耐性細胞にオートファジーを誘導するラパマイシン処理すると、放射線感受性になることが分かった。本研究から、オートファジーの誘導は放射線耐性細胞の克服に有効であることが示唆された。

研究成果の概要（英文）：X-ray induced autophagic cell death is suppressed in radioresistant cells. Administration of rapamycin, an inducer of autophagy, sensitized radioresistant cells. Induction of autophagy would be the effective modality to overcome radioresistant tumor.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2009年度	1,800,000	540,000	2,340,000
2010年度	1,700,000	510,000	2,210,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,500,000	1,050,000	4,550,000

研究分野：複合新領域

科研費の分科・細目：環境学・放射線・化学物質影響科学

キーワード：放射線耐性、オートファジー細胞死、ラパマイシン

1. 研究開始当初の背景

がんの3大治療法の一つである放射線療法は2 Gy/日のX線をおよそ60 Gy照射することで行われる。がんの放射線療法では、放射線耐性細胞の存在や出現といった解決すべき課題が今なお存在している。そこで、申請者等はより有効な放射線療法を開発する目的で、2 Gy/日のX線を照射し続けても増殖する臨床的放射線耐性細胞（CRR細胞）の開発

に取り組んだ。その結果、ヒト肝がん由来 HepH2 細胞、ヒト口腔がん由来 SAS 細胞、ヒト肺がん由来 H1299 細胞、ヒト子宮頸部がん由来 HeLa 細胞からその樹立に成功した。分子生物学的解析の結果、樹立した臨床的放射線耐性細胞ではその親株に比べてより効率的に DNA の修復を行うことを明らかにした。また、樹立した臨床的放射線耐性細胞は2Gy/日のX線照射を受けているため細胞接着率の

低いことが分かった。このため、臨床的放射線耐性細胞では従来から行われていたコロニーアッセイが適用できないことが分かった。そこで申請者等は新たなアッセイ法の開発に取り組み、高感度に放射線耐性を定量することができる modified high density survival assay の開発に成功した。本研究では、放射線で誘発される細胞死とがん細胞の放射線感受性を中心に解析した。

2. 研究の目的

抗がん剤処理や X 線照射を受けたがん細胞は、アポトーシス (apoptosis; type I programmed cell death)、オートファジー細胞死 (type II programmed cell death)、ネクローシス (necrosis; type III programmed cell death)、細胞老化 (senescence)、mitotic catastrophe など様々な細胞死を誘発することが知られている。これらの中でアポトーシスを中心とした研究が盛んであるものの、特に固形がんの場合にはアポトーシス以外の細胞死も考慮する必要がある。我々は X 線照射後に親株とその CRR 細胞株に誘発される細胞死を比較することで、どのような細胞死が臨床的放射線耐性に関与しているのかを明らかにしようとした。

最近、抗がん剤処理や X 線照射でオートファジーの誘発が知られるようになった。オートファジーは、近年注目を集めている生命現象の 1 つでありユビキチン-プロテアソーム系と並ぶタンパク質の分解機構として知られている。ユビキチン-プロテアソーム系では、分解すべきタンパク質の一つ一つに、ユビキチン分子が複数結合することでプロテアソームにより認識されて分解されるのに対して、オートファジーでは一度に多くのタンパク質が分解される。このためオートファジーによるタンパク質の分解はバルク分解と呼ばれることもある。オートファジーによ

って、ストレスなどにより損傷を受けた細胞内小器官やタンパク質が除去されて細胞の生存を助けるほか、飢餓状態でも誘発され細胞にアミノ酸などの栄養源を供給することが知られている (自食作用)。一方で、オートファジーは虚血性脳障害時の細胞死、さらに抗がん剤や放射線で誘発される細胞死にも関与していることが報告されている。逆にオートファジー機構が欠損すると心筋細胞死と心不全が発症することも知られてきた。以上述べたように、オートファジーは細胞の生と死の両方に関与していることから、「両刃の剣」に例えられる。本総説では、我々の研究結果を踏まえてオートファジーががん細胞の放射線感受性にどのように関与しているのかを解析した。

3. 研究の方法

アポトーシス細胞の検出は、annexin V 染色で行った。一つの細胞に 2 つ以上の核と小核を持つ細胞を、mitotic catastrophe を誘発した細胞と定義して定量した。オートファジー細胞の検出は、EGFP-LC3 発現ベクターの細胞への導入、抗 LC3 抗体による細胞免疫学的解析、ウエスタンブロッティングによる LC3-I から II への変換、電子顕微鏡による解析を行い定量した。オートファジーの誘導は rapamycin 処理、その抑制は 3-methyladenine 処理で行った。

4. 研究成果

X 線照射を受けたがん細胞では、アポトーシス、ネクローシス、オートファジー細胞死、mitotic catastrophe、細胞老化など様々な細胞死が誘発される。実際、炭素線照射を受けたヒトグリオーマ細胞 (NP-2 細胞) ではアポトーシス、オートファジー、老化様細胞の誘発が報告されている。

初期のアポトーシス細胞を Annexin V 染色で検出すると、10 Gy の X 線照射を受けた

HepG2 細胞では、その誘発頻度は最大 10%程度であり照射 3 日目に最大値に達した。また、mitotic catastrophe を誘発した細胞を定量した結果、10 Gy の X 線照射で最大 10%程度が mitotic catastrophe を誘発した。mitotic catastrophe の形態を示しながら、Annexin-V に陽性を示す細胞やオートファゴソームで満たされた細胞が存在することから、mitotic catastrophe を誘発した細胞は、その後アポトーシス又はオートファジー細胞死により死滅すると考えられる。X 線照射後、数多くの死細胞が培溶液中に浮遊しているにもかかわらず、それらの死細胞の多くにアポトーシス小体は観察されなかった。また、X 線照射後経日的に培養液中の死細胞を含む全細胞からゲノム DNA を抽出してアガロース電気泳動を行ったところ、アポトーシスに特有のヌクレオソーム単位での DNA 断片化であるラダー状の像は得られなかった。

親株である HepG2 細胞とその CRR 細胞である HepG2-8960-R 細胞に 10 Gy の X 線を照射し、経日的に倒立顕微鏡下に形態変化を観察した。HepG2 細胞では、照射 3 日目で死細胞はほとんど観察されなかったが分裂像の増加が見られた。引き続き培液中に浮遊する死細胞の顕著な増加が見られた。さらに、照射 7 日目になると接着している生細胞に多核を特徴とする mitotic catastrophe を示す細胞が増加した。照射 5 日目の死細胞を詳細に観察すると、アポトーシス小体を伴ったアポトーシス細胞と、丸のまま浮遊している死細胞が見られた。誘発頻度としては、後者が圧倒的に多かった。一方、HepG2-8960-R 細胞では HepG2 細胞と比べて、照射 3 日目に分裂像の増加はみられず、さらに照射 5 日目においても死細胞の顕著な増加は見られなかった。しかし、照射 7 日目になると HepG2 細胞と同様に mitotic catastrophe を誘発した多核の

細胞が生じたが、その誘発頻度は HepG2 細胞と比べて低かった。以上から、10 Gy の X 線照射によりアポトーシスをはじめとする様々な細胞死が HepG2 細胞及び HepG2-8960-R 細胞共に誘発されることが示されたが、その誘発頻度は放射線耐性細胞では低かった。さらに、アポトーシス小体を伴わない細胞死が高頻度で誘発されることが分かった。また、HepG2 細胞では照射 3 日目に分裂像が増加し、その後に死細胞が増加することから、分裂を介した細胞死が誘発されることが示唆された。

X 線照射で細胞死は誘発されるものの、培養液中に浮遊している死細胞の多くはアポトーシス小体を伴わないため、アポトーシス以外の細胞死であることが示唆された。そこで、X 線照射で誘発される細胞死は最近注目されているオートファジー細胞死ではないかと考え解析を進めた。オートファジー細胞死は、細胞質にオートファゴソームが増加し、引き続き核が崩壊することを特徴とする。我々はまず、EGFP-LC3 発現ベクターを恒常的に導入した細胞を用いて X 線照射後におけるオートファジーの誘導を解析した。

非照射細胞では、1 細胞あたりのオートファゴソームは最大でも数個にとどまり、オートファゴソームの見られない細胞が大部分を占める。このとき見られるオートファゴソームは生理的条件下でのストレスで損傷を受けた細胞内小器官やタンパク質を分解するために生じたものと考えられる。実際、非照射細胞を電子顕微鏡で観察しオートファゴソームの内容物を観察すると、ミトコンドリアが見られることがある。10 Gy の X 線を照射して、3 日目になると培養フラスコの底に生着している細胞の細胞質内にオートファゴソームの増加が観察される。照射 5 日目になると、培養液中に多くの丸くなった死細胞

胞が観察され、その内部はオートファゴソームで満たされている。このとき、mitotic catastrophe を誘発した細胞が見られるが、オートファゴソームで満たされた細胞と、そうでない細胞が混在していた。照射5日目に観察されるアポトーシスを誘発した細胞のアポトーシス小体内部にはオートファゴソームはほとんど検出されなかった。以上から、X線照射でアポトーシスとは全く異なるオートファジー細胞死が誘発されることが分かり、オートファジー細胞死はX線で誘発される細胞死の大部分を占めることが示唆された。そこで、オートファジー細胞死が細胞の放射線耐性に関与しているのかを解析した。生存のためのオートファジーと区別するために、丸くなり、かつオートファゴソームで満たされている細胞をオートファジー細胞死として定量した。

10 Gy の X線照射前のオートファジー細胞死頻度は、臨床的放射線耐性細胞である HepG2-8960-R 細胞では、その親株である HepG2 細胞と比べて有意に高かった (HepG2 細胞 ;5%: HepG2-8960-R 細胞 ;20%)。HepG2-8960-R 細胞は放射線耐性の形質維持のために毎日 2 Gy の X線照射を受けているためであると考えられる。10 Gy の X線を5回に分けて分割照射すると (2 Gy/日)、HepG2 細胞ではオートファジー細胞死が誘発されるのに対して、HepG2-8960-R 細胞では誘発されなかった。また、X線、10 Gy を急照射すると HepG2 細胞及び HepG2-8960-R 細胞において、照射前と比べて有意にオートファジー細胞死が誘発された。しかし、その誘発頻度は HepG2 細胞で高かった (照射5日目で HepG2 細胞;70%: HepG2-8960-R 細胞; 40%)。経日的に、X線 で誘発されるオートファジー細胞死の頻度を解析した結果は今までに報告がなく、我々の解析がはじめてである。また、臨

床的放射線耐性細胞ではオートファジー細胞死が抑制されていることもはじめて示された。また、これらの結果は、電子顕微鏡による解析及びウエスタンブロッティングによる解析でも裏付けられている。以上から、臨床的放射線耐性細胞にオートファジー細胞死を誘導すれば放射線耐性が克服できることが示唆された。

オートファジーは、mTOR (mammalian target of rapamycin)により制御されていることから、HepG2-8960-R 細胞を mTOR 阻害剤であるラパマイシンで処理すると放射線耐性が克服できるのではないかと考えた。実際、ラパマイシン処理して放射線感受性を調べると、HepG2-8960-R 細胞の放射線感受性は HepG2 細胞とほぼ同程度になった。逆に、HepG2 細胞に誘発されるオートファジーを抑制すれば放射線耐性になる可能性が推測される。そこで、オートファジー阻害剤である 3-メチルアデニン処理を行い、細胞の放射線感受性を解析した。その結果、HepG2 細胞は HepG2-8960-R 細胞と同程度に放射線耐性になった。以上から、臨床的放射線耐性にオートファジー細胞死が関与していることが強く示唆された。

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)

[雑誌論文] (計7件)

- (1) Kuwahara Y., Oikawa T, Ochiai Y, Roudkenar MH, Fukumoto M, Shimura T, Ohtake Y, Ohkubo Y, Mori S, Uchiyama Y, Fukumoto M. Enhancement of autophagy is a potential modality for tumors refractory to radiotherapy. Cell Death and Disease. (*in press*) (査読有り)
- (2) Roudkenar MH, Halabian R, Bahmani P, Roushandeh AM, Kuwahara Y., Fukumoto M.

Neutrophil gelatinase-associated lipocalin: A new antioxidant that exerts its cytoprotective effect independent on Heme Oxygenase-1. Free Radical Research. (*in press*) (査読有り)

(3) Shimura T, Kakuda S, Ochiai Y, Kuwahara Y, Takai Y, Fukumoto M. Targeting the AKT/GSK3 β /Cyclin D1/Cdk4 Survival Signaling Pathway for Eradication of Tumor Radioresistance Acquired by Fractionated Radiotherapy. Int J Radiat Oncol Biol Phys. 2011. 80:540-548. (査読有り)

(4) Yamamoto Y, Usuda N, Oghiso Y, Kuwahara Y, Fukumoto M. The uneven irradiation of a target cell and its dynamic movement can mathematically explain incubation period for the induction of cancer by internally deposited radionuclides. Health Phys. 2010. 99:388-393. (査読有り)

(5) Shimura T, Kakuda S, Ochiai Y, Nakagawa H, Kuwahara Y, Takai Y, Kobayashi J, Komatsu K, Fukumoto M. Acquired radioresistance of human tumor cells by DNA-PK/AKT/GSK3 β -mediated cyclin D1 overexpression. Oncogene. 2010. 29:4826-4837. (査読有り)

(6) Maruko A, Ohtake Y, Kawaguchi M, Kobayashi T, Baba T, Kuwahara Y, Nakagawa H, Shimura T, Fukumoto M, Ohkubo Y. X-radiation-induced down-regulation of the EGF receptor in primary cultured rat hepatocytes. Radiat Res. 2010. 173:620-628. (査読有り)

(7) Kuwahara Y, Mori M, Oikawa T, Shimura T, Ohtake Y, Mori S, Ohkubo Y, Fukumoto M. The modified high-density survival assay is the useful tool to predict the effectiveness of fractionated radiation

exposure. J Radiat Res. 2010. 51:297-302. (査読有り)

[学会発表] (計1件)

(1) KUWAHARA Y, OIKAWA T, MORI M, FUKUMOTO M, KURIHARA A, SHIMURA T, FUKUMOTO M. Are radioresistant cells chemoresistant? : Examined by clinically relevant radioresistant cells. 第68回日本癌学会学術総会 2009年10月1-3日 横浜

[図書] (計0件)

[産業財産権]

○出願状況 (計0件)

名称 :
発明者 :
権利者 :
種類 :
番号 :
出願年月日 :
国内外の別 :

○取得状況 (計0件)

名称 :
発明者 :
権利者 :
種類 :
番号 :
取得年月日 :
国内外の別 :

[その他]
ホームページ等
<http://www.idac.tohoku.ac.jp/dep/path/>

6. 研究組織

(1) 研究代表者
桑原義和 (KUWAHARA YOSHIKAZU)
東北大学・加齢医学研究所・助教

研究者番号 : 00392225

(2) 研究分担者
()

研究者番号 :

(3) 連携研究者

()

研究者番号：