

令和 6 年 6 月 6 日現在

機関番号：32607

研究種目：基盤研究(C)（一般）

研究期間：2021～2023

課題番号：21K07654

研究課題名（和文）放射線により誘発する腫瘍内細胞死のリアルタイム可視化と放射線治療への応用

研究課題名（英文）Real-time visualization of radiation-induced intratumoral cell death and its application to radiation therapy

研究代表者

鍵谷 豪（Kagiya, Go）

北里大学・医療衛生学部・教授

研究者番号：30524243

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,000,000円

研究成果の概要（和文）：本研究の目的は、X線照射による細胞死の可視化および腫瘍内細胞死誘発メカニズムの解明である。細胞死の中でもアポトーシスに着目し、アポトーシス可視化細胞を構築した。これら細胞を用いて、X線照射によって誘発されるアポトーシスを*in vitro*で可視化し、さらに可視化細胞を移植した担癌マウスにおいても低侵襲リアルタイム可視化に成功した。また、発光データの解析結果から、X線照射後、早期に誘発される腫瘍内アポトーシスには免疫システムの関与が少なく、腫瘍血管損傷により二次的に生じるがん組織内の栄養枯渇が主要因であることを証明した。これは放射線による腫瘍細胞の致死効果を決定する主要な要因の一つである。

研究成果の学術的意義や社会的意義

腫瘍内で誘発される細胞死を可視化するシステムは、腫瘍内細胞死の動態解析を簡便にし、放射線治療条件の最適化や抗癌剤併用の放射線化学療法の開発等、治療への応用に有用な手段となる。本研究により腫瘍内細胞死（アポトーシス）は、がん細胞の放射線感受性だけでなく、放射線による腫瘍血管損傷を起因とし誘発されることが証明された。これらの知見は放射線治療や免疫治療を組み合わせた新規治療法の開発につながる研究である。

研究成果の概要（英文）：The aim of this study was to visualize cell death induced by X-ray irradiation and to elucidate the mechanisms of cell death induced within tumors. We focused on apoptosis among cell death and constructed apoptosis-imaging cells. Employing these cells, we successfully visualized X-ray-induced apoptosis *in vitro* and achieved real-time visualization with minimal invasiveness in tumor-bearing mice transplanted with these imaging cells. Based on luminescence data analysis, we demonstrated that the immune system is less involved in the apoptosis within tumors induced early after X-irradiation, and that nutrient depletion in cancer tissue secondary to tumor vascular damage is the main cause. This is one of the main factors determining the lethal effect of radiation on tumor cells.

研究分野：放射線治療生物学

キーワード：細胞死 アポトーシス リアルタイム可視化 腫瘍血管損傷

## 様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

### 1. 研究開始当初の背景

細胞死は、形態的特徴とその分子メカニズムからアポトーシス (Apo)、ネクローシス (Nec)、およびオートファジー細胞死などの 13 のタイプに分類される。放射線や抗がん剤によって腫瘍内で誘発されるこれらの細胞死の動態解析には、腫瘍組織切片を測定時間ごとに作製して評価する必要があり、その詳細な検討はほとんど行われていないのが現状である。このため、放射線および抗がん剤によって腫瘍内で誘発されるこれらの細胞死を低侵襲かつリアルタイムに可視化するシステムは、腫瘍内細胞死の動態解析を簡便にし、放射線治療条件の最適化および抗がん剤を併用した放射線化学療法の開発など、治療への応用に非常に有用な手段となる。

我々は発光による細胞死可視化システムの構築を試み、これまでに以下のような研究成果を得ている。Apo の誘発により、その細胞自身が発光する Apo 可視化細胞を構築した。この細胞をマウスに移植し腫瘍形成後、抗がん剤スタウロスポリン (STS) 投与による腫瘍内の Apo リアルタイム可視化に成功した。がんの再発や転移の原因と考えられるがんの親玉「がん幹細胞」が存在する低酸素領域のみの Apo を可視化する低酸素 Apo 可視化細胞を独自に構築し、腫瘍内低酸素細胞 Apo のリアルタイム可視化に成功した (G. Kagiya *et al. Mol. Ther. Methods Clin. Dev.* 2016)。Nec に関しては、二断片化したルシフェラーゼ (Luc) の再構成を応用した Nec 可視化細胞を構築し、腫瘍増殖に伴い腫瘍内に形成される Nec 領域の可視化および、針刺しによる物理的破壊、界面活性剤による化学的破壊によって誘発される Nec のリアルタイムイメージングに成功した (G. Kagiya *et al. Mol. Ther. Oncolytics.* 2021)。構築した Apo および Nec 可視化システムを用いることで、放射線によって誘発される腫瘍内細胞死の 4 次元動態解析 (時間的・空間的動態解析) が可能になると考えられる。

### 2. 研究の目的

放射線により誘導する細胞死の動態解析は *in vitro* では詳細に検討されているが、腫瘍内の細胞死に関してはほとんどおこなわれていない。本研究の目的は、放射線によって誘発される腫瘍内細胞死、特に Apo および Nec に着目し、低侵襲かつリアルタイムに可視化するシステムを用い腫瘍内細胞死動態解析を実施すること、また動態解析データに基づき腫瘍内細胞死誘発メカニズムを解明し、放射線治療の臨床研究へ還元できる生物学的エビデンスを提示することである。

### 3. 研究の方法

#### (1) 使用した細胞

Apo 誘発時に活性化するカスパーゼ 3 の認識配列 DEVD (アミノ酸 1 文字表記) を、2 断片化したルシフェラーゼ (Luc) の間に挿入し、環状型 Luc 遺伝子 (cFLuc) を構築した。構築した cFLuc を Chang 肝細胞 (ヒト子宮頸部がん HeLa の汚染株) および DNA 修復遺伝子 XRCC1 変異株である EM-9 細胞 (CHO-AA8 由来株) に遺伝子導入し、安定的に cFLuc を発現する Apo 可視化細胞 Chang/CMV-cFLuc および EM9/CMV-cFLuc を構築し実験に使用した。また、低酸素細胞の Apo 可視化には、低酸素応答エレメントで cFLuc の発現を制御する Chang/6HRE-cFLuc を使用した。Nec 可視化に関しては、2 断片化した Luc の N 末端および C 末端断片をそれぞれ安定的に発現する Nec 可視化細胞 Chang/NLucN/v2 および Chang/NLucC/v2-Fc を使用した。

#### (2) *in vitro* での Apo および Nec のイメージング

Apo 可視化細胞を  $1.0 \times 10^6$  個ずつ 35 mm ペトリディッシュに播種し、37 °C で 5% CO<sub>2</sub> の環境下で 48 時間培養した。Nec 可視化に関しては、Chang/NLucN/v2 と Chang/NLucC/v2-Fc 細胞を 1 対 5 の細胞比で  $1.0 \times 10^6$  個になるよう混合し、35 mm ペトリディッシュに播種後、37 °C で 5% CO<sub>2</sub> の環境下で 48 時間培養した。X 線照射直前に培地を交換後、X 線照射 (MX-160Labo, mediXtec) を行った。一定時間培養後、培養上清を取り除き、フェノールレッドフリー RPMI1640 培養液にて希釈した 500 μM の D-ルシフェリンまたはフリマジン細胞に添加した。イメージング像の取得には高感度 EMCCD カメラ (iXon3, ANDOR) を用い、発光強度解析には ANDOR SOLIS for Imaging (ANDOR 社) を使用した。

#### (3) 担がんマウスを用いた *in vivo* での Apo のイメージング

ヌードマウス (BALB/cA Jcl-nu/nu、メス、5~6 週齢、日本クレア) または NOD/scid マウス (NOD/ShiJic-scid Jcl、メス、6 週齢、日本クレア) の背部皮下に、Apo 可視化細胞 EM9/CMV-cFLuc、Chang/CMV-cFLuc または Chang/6HRE-cFLuc を移植した。移植後 2~4 週間飼育し、腫瘍径が約 10 mm 程度に成長した腫瘍を実験に供した。3 mm 厚の鉛でマウス胸腹部を防護し、腫瘍組織のみに X 線 20 Gy を照射した。照射後、各測定時間ごとに 500 μM D-ルシフェリン溶液をマウス腹腔内に投与し、遮光したボックス内で高感度 EMCCD カメラを用い撮影を行った。撮影中は、小動物実験用簡易吸入麻醉装置 (NARCOBIT-E (型) 夏目製作所) を用いイソフルラン吸入麻酔液 (濃度 2%) を持続吸入させた。腫瘍からの発光シグナル強度の検出には、ANDOR SOLIS for Imaging を使用し、腫瘍からの発光部位に ROI を設定しトータルカウント値を発光シグナル強度とした。

#### (4) 担がんマウスを用いた *in vivo* での Nec のイメージング

Nec 可視化細胞 NLucN/v2 と NLucC/v2-Fc を 1 対 5 の細胞比で  $1.0 \times 10^6$  個になるよう混合し、ヌードマウスの背部皮下に移植し担がんマウスを作製した。X 線照射および撮影方法は Apo 可視化実験と同様な手順で行った。

#### (5) X 線照射による腫瘍血管損傷の評価

マウス皮下背部に Apo 可視化細胞 Chang/CMV-cFLuc を移植し、直径 10 mm 程に成長した腫瘍を実験に供した。3 mm 厚の鉛でマウス胸腹部を防護し、腫瘍組織のみに 20 Gy の X 線照射を行った。X 線照射 6 時間後と 9 時間後に麻酔下にて、毛細血管スコープ GOKO BSCAN-ZD (GOKO 映像機器株式会社) を用いて腫瘍血管の形態観察を行った。また、毛細血管流速測定計測ソフト GOKO-VIP (GOKO 映像機器株式会社) を用い血流速度の解析を行った。

### 4. 研究成果

#### (1) X 線照射による Apo と Nec の可視化

これまでの研究により、App 可視化細胞 EM9/CMV-cFLuc、Chang/CMV-cFLuc および低酸素 Apo 可視化細胞 Chang/6HRE-cFLuc を用い、*in vitro* と *in vivo*、どちらの系においても STS を用い Apo 誘導による発光増強を確認した。これら Apo 可視化細胞を用い、X 線により誘発する腫瘍内 Apo のリアルタイム可視化を試みた。*in vitro* イメージングに関しては、EM9/CMV-cFLuc に X 線 20Gy を照射した場合、照射 6 時間後に発光のピークを示し (0 Gy 群の発光値に対する相対発光値 2.8)、*in vitro* での X 線による Apo のリアルタイム可視化を確認した。しかし、Chang/CMV-cFLuc を用いた場合、同照射条件にも関わらず、むしろ発光値は減少した。EM-9 細胞は一本鎖 DNA 切断を修復するタンパク質 XRCC1 遺伝子に変異を有し、放射線感受性細胞であることが知られている。このため EM-9 細胞由来である EM9/CMV-cFLuc では、X 線により誘発した一本鎖切断を修復出来ないため Apo が誘導し発光が増強したと考える。興味深いことに、担癌マウスを用いた *in vivo* 実験では、X 線照射により *in vitro* で発光増強した EM9/CMV-cFLuc ばかりでなく、発光増強が確認出来なかった Chang/CMV-cFLuc、Chang/6HRE-cFLuc においても X 線照射により発光が増強した (図 1)。その発光値の最大値は *in vitro* と比較し 3 時間遅れた 9 時間後にピークを示し、その後、発光値は経過時間と共に減少した。また、Chang/6HRE-cFLuc を用いることで、腫瘍内の低酸素細胞領域においても X 線により Apo が誘発することを確認した。しかしその相対発光値は、酸素領域を含めた Apo の相対発光値と比較し低いことがわかった。低酸素細胞では低酸素誘導因子 HIF-1 が発現し、サバイビンの活性化やカスパーゼ 9 の抑制を介し抗 Apo 能を獲得することが知られている。このため低酸素領域における Apo の相対発光値は低くなったと考えられる。次に構築した Nec 可視化細胞を用いて X 線 20 Gy 照射による発光確認をおこなった。*in vitro* および担ガンマウスに Nec 可視化細胞を移植した *in vivo* 実験をおこなったが、照射による相対発光値の上昇は認められなかった。Nec 誘発時には、細胞膜にリング状の小孔を形成するガスダーミン D (GSDMD) および GSDMD ポアを通過できない高分子サイズの細胞内容物 (DAMP 群等) を細胞外へ細胞膜破裂を介し放出する NINJ1 が機能することが知られている。Nec 可視化システムを導入した Chang 細胞において、これら GSDMD 又は NINJ1 が機能せず、Luc の N 末端および C 末端断片が細胞外へ排出されていない可能性が考えられた。今後、GSDMD および NINJ1 の遺伝子およびその発現状態を確認し、他の細胞株を用い X 線による Nec 誘発時に発光する Nec 可視化細胞を再度構築する必要がある。

#### (2) X 線照射による腫瘍内 Apo 誘発メカニズムの解明

Apo 可視化細胞 Chang/CMV-cFLuc を用いた場合、*in vivo* 実験では X 線照射により発光増強が確認出来たが、*in vitro* 実験においては確認することは出来なかった。つまり、X 線による腫瘍内 Apo 誘発の早期段階には *in vitro* 実験では再現できない腫瘍組織に特有の免疫システムや血管損傷等が関与し、Apo を誘発することが強く疑われた。このため、我々は以下 2 つの項目 1) 血管透過性・滞留性亢進効果 (EPR 効果) と照射を受けた組織での CMV プロモーター活性化による発光上昇への関与、および 2) 放射線による腫瘍血管損傷による腫瘍内 Apo の誘発に着目し、X 線照射による腫瘍内 Apo 誘発メカニズムの解明を試みた。

1) 血管透過性・滞留性亢進効果 (EPR 効果) と照射を受けた組織での CMV プロモーター活性化による発光上昇への関与

腫瘍血管は不完全のため、腫瘍では血管透過性が亢進し、薬剤は組織に漏れ出て移行しやすい。

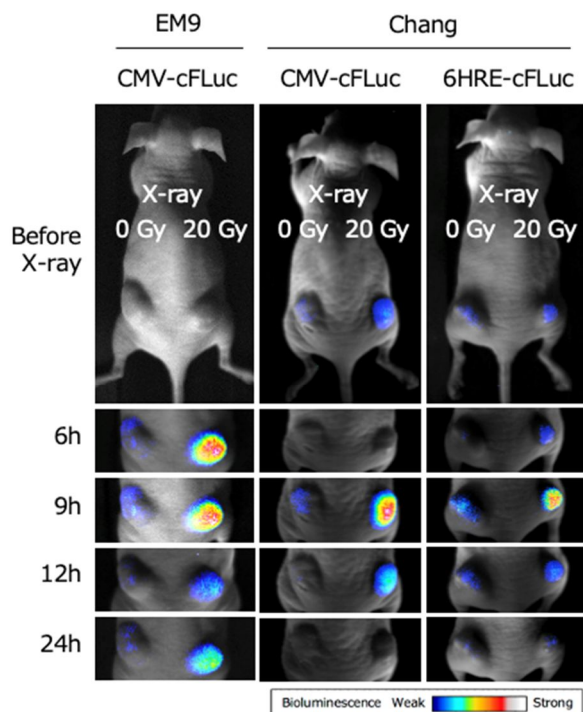


図 1 X線により誘発する腫瘍内Apoの可視化



また、腫瘍ではリンパ組織が未熟なため、腫瘍組織中の異物を排除できず、結果として血中から漏れ出した薬剤は腫瘍内に貯留し保持される。このように腫瘍では、薬剤が腫瘍へ集積しやすい EPR 効果が亢進している。これまでに得られた結果において、発光は Caspase-3 阻害剤で抑えられること、また免疫化学組織染色により腫瘍内で実際に Apo 陽性細胞の割合が上昇することを考慮すると、腫瘍からの発光上昇は Apo に起因すると考えられた。しかし、腫瘍で亢進した EPR 効果により発光基質 D-ルシフェリンが腫瘍内に蓄積し、Apo とは無関係に発光が上昇したとも考えられる。このため、我々は腫瘍へ X 線照射後、各撮影時間毎に D-ルシフェリン投与前後で、腫瘍を撮影し、その発光比を算出することで、腫瘍内に残留したルシフェリンによる発光への影響（EPR 効果による発光への影響）を定量評価した。検出感度を高めるため、移植細胞には環状 Luc より高い発光活性を持つ直鎖状 Luc を Chang 細胞に導入した Chang/pGL4.50 細胞を用いた。その結果、ルシフェリン投与前の腫瘍からの発光は、投与後の発光と比較して最大でも約 10% 以下と低く、EPR 効果を介した発光の相対発光値への寄与率は無視できることが判明した。この

他に、放射線による発光値上昇には、EPR 効果による寄与ばかりでなく、環状 Luc 遺伝子を制御する CMV プロモーターの放射線による活性化が関与しているとも考えることも出来る。照射された組織では細胞死により炎症反応が引き起こされ、IL-6 や TNF- 等の炎症性サイトカインが放出されることが知られている。また、これらサイトカインが NF-kB 経路などのシグナル伝達を活性化し、NF-kB 結合サイトが存在する CMV プロモーターが活性化することも知られている。つまり、照射による発光上昇は、腫瘍内の放射線炎症により CMV プロモーターが活性化し、環状 Luc の発現が亢進した結果、Apo とは無関係におこった結果とも考えられる。このため、腫瘍内の CMV プロモーターは放射線照射により活性化するか、EPR 効果実験で使用した Chang/pGL4.50 細胞を用い評価した。照射直後の照射腫瘍と非照射腫瘍の発光比を基準とした場合、各測定時間の相対発光比は約 1 であり、X 線による CMV プロモーターの活性化は無視できると判断した。これら得られた結果から、放射線による腫瘍の発光増強は、腫瘍内で誘発する Apo に起因していると結論づけた。

2) 放射線による腫瘍血管損傷が、間接的に腫瘍内 Apo を誘発する。

*in vitro* では放射線により Apo を誘発しない細胞が、*in vivo* においては Apo を誘発することが、担癌マウスを用いた実験から明らかになった。この結果に関して、我々は免疫システムを介し腫瘍細胞に Apo が誘発されるのではないかと仮説を立てた。この仮説を検証するため、T リンパ球細胞と B リンパ球細胞の欠損および NK 細胞の活性低下が認められる重傷複合免疫マウス NOD/scid マウスを用い、これまでと同様に移植腫瘍への X 線照射実験をおこなった。その結果、免疫システムが欠如したマウスにおいても照射 9 時間後、照射腫瘍からの発光増強が認められた。これにより X 照射後早期に誘発する腫瘍内 Apo に免疫システムの関与は少ないと考えられた（図 2）。次に我々は、照射による腫瘍

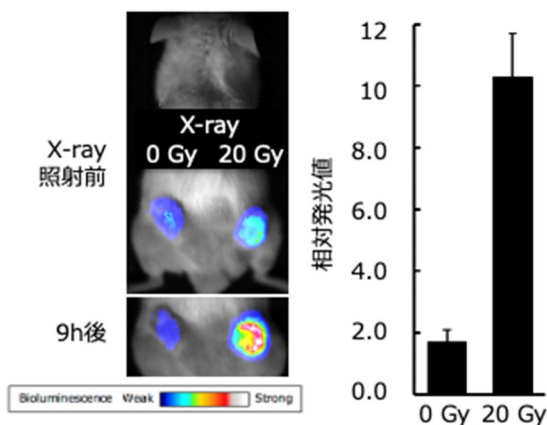


図 2 NOD/Scidマウスを用いた発光変化

血管損傷が腫瘍内 Apo 誘発の原因ではないかと考え、血管損傷が起こりにくい 5 Gy 照射による腫瘍からの発光増強を評価した。非照射腫瘍と比較し、照射腫瘍からの発光増強は認められず、X 線による腫瘍内 Apo 誘発の原因として腫瘍血管損傷が強く疑われた。次に腫瘍に対し 20 Gy の X 線を照射し、毛細血管スコープを用い照射 6 時間後と 9 時間後の腫瘍血管の形態観察をおこなった。その結果、照射腫瘍の血管は非照射腫瘍のそれと比較し血管損傷が激しく、特に照射 9 時間後においては毛細血管が断片化した像も確認された。また腫瘍血管の血流速度を解析した結果、非照射

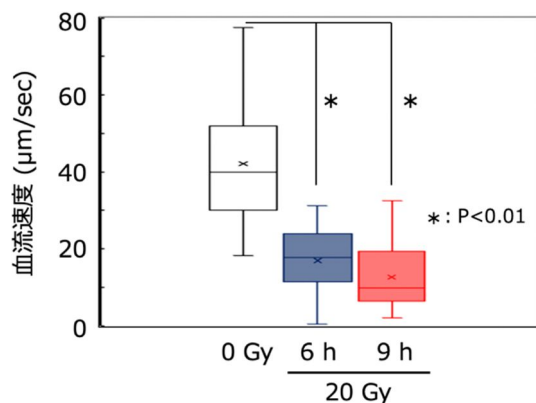


図3 X線照射による腫瘍血管の血流速度の変化

腫瘍の血流速度が約 40  $\mu\text{m}/\text{sec}$  であるのに対し、照射腫瘍の血流速度は約 20~

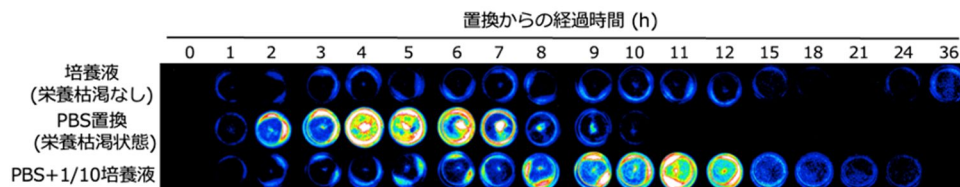


図4 栄養枯渇によるApoの可視化

10  $\mu\text{m}/\text{sec}$  と低く、統計的に有意な差が認められた（図 3）。これらの結果から照射後、腫瘍血

管損傷による腫瘍組織内の栄養枯渇が Apo 誘発の原因であると疑われた。栄養枯渇による Apo 誘発を証明するため、実験に使用した細胞 Chang/CMV-cFLuc を用い、*in vitro* にて栄養を枯渇し、その発光変化を評価した。培養液をリン酸バッファー (PBS) に置換することで栄養枯渇を模擬した。PBS 非置換群では発光変化は確認されなかったが、培養液を完全に PBS に置換した群では 4 時間後に、また培養液を 1/10 添加した群では 12 時間後に約 7.5 倍の発光増強が確認された (図 4)。これら 3 群の試料に対しアネキシン V を用いた Apo 検出キットにより Apo 細胞を評価した結果、PBS 置換群では対象群と比較して約 4 倍の Apo 陽性細胞が検出された。一方、PBS 非置換群および X 線照射群において Apo 陽性細胞は検出されなかった。これら結果より、移植細胞として用いた Chang/CMV-cFLuc 細胞は栄養枯渇により Apo を誘発することが確認された。上記の結果を総合的に考慮すると、X 線照射による腫瘍内 Apo の誘発には、腫瘍細胞自身の放射線感受性ばかりでなく、腫瘍組織を構成する腫瘍血管の損傷によるがん組織内の栄養枯渇等の微小環境変化が大きく関与していると考えられる。これは放射線による腫瘍細胞の致死効果を決定する主要な要因の一つである。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計3件（うち査読付論文 2件 / うち国際共著 0件 / うちオープンアクセス 2件）

1. 著者名 鍵谷 豪, 小川良平, 畑下昌範, 青柳美希	4. 巻 48
2. 論文標題 放射線により誘発する腫瘍内細胞死の可視化	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Medical Science Digest	6. 最初と最後の頁 49-52
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) なし	査読の有無 無
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 -

1. 著者名 Hirano Takaaki, Adachi Satoru, Ichimura Naoya, Kasai Akira, Kobayashi Masashi, Okuda Takashi, Ogawa Ryohei, Kagiya Go	4. 巻 37
2. 論文標題 Culturing Chinese hamster ovary cells on Cyclo Olefin Polymer triggers epithelial mesenchymal transition and spheroid formation, which increases the foreign gene expression driven by the Moloney murine leukemia virus long terminal repeat promoter	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Biotechnology Progress	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1002/btpr.3159	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -

1. 著者名 Kagiya Go, Sato Ayaka, Ogawa Ryohei, Hatashita Masanori, Kato Mana, Kubo Makoto, Kojima Fumiaki, Kawakami Fumitaka, Nishimura Yukari, Abe Naoya, Hyodo Fuminori	4. 巻 20
2. 論文標題 Real-time visualization of intratumoral necrosis using split-luciferase reconstitution by protein trans-splicing	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Molecular Therapy - Oncolytics	6. 最初と最後の頁 48 ~ 58
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.omto.2020.12.001	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -

〔学会発表〕 計6件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 青柳美希, 小川良平, 畑下昌範, 兵藤文紀, 鍵谷 豪
2. 発表標題 高線量X線照射による腫瘍内アポトーシスの誘発メカニズム
3. 学会等名 北里大学バイオサイエンスフォーラム
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 青柳美希, 小川良平, 畑下昌範, 兵藤文紀, 鍵谷 豪
2. 発表標題 高線量X線照射による腫瘍内アポトーシスの誘発メカニズム
3. 学会等名 第59回日本放射線腫瘍学会生物部会学術大会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 上田寛治, 山浦 貴久, 板倉 誠, 松沢 英世, 鍵谷 豪, 川上 文貴, 内山 洋介
2. 発表標題 9-アミノアントラセン誘導体の蛍光特性を利用した合成とがん細胞イメージングへの応用
3. 学会等名 日本化学会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 鍵谷 豪, 青柳美希, 小川良平, 畑下昌範, 兵藤文紀
2. 発表標題 X線により誘発される腫瘍内低酸素細胞アポトーシスの可視化
3. 学会等名 第58回日本放射線腫瘍学会生物部会学術大会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 青柳美希, 小川良平, 畑下昌範, 兵藤文紀, 久保 誠, 小島史章, 川上文貴, 鍵谷 豪
2. 発表標題 放射線による腫瘍内低酸素細胞アポトーシスの可視化とその経時変化
3. 学会等名 第34回北里大学バイオサイエンスフォーラム
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 上田寛治・山浦 貴久・板倉 誠・松沢 英世・鍵谷 豪・川上 文貴、内山 洋介
2. 発表標題 9-アミノアントラセン誘導体の蛍光特性を利用した合成とがん細胞イメージングへの応用
3. 学会等名 日本化学会第102春期年会
4. 発表年 2022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
研究分担者	小川 良平 (Ogawa Ryohei) (60334736)	富山大学・学術研究部医学系・准教授  (13201)	

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------