

## 科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成 24 年 5 月 9 日現在

機関番号：10101

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2010～2011

課題番号：22791162

研究課題名（和文） 放射線を生残した腫瘍細胞におけるニューロピリンの機能解析

研究課題名（英文） The role of Neuropilin in radiation surviving tumor cells

研究代表者

堤 香織 (Tsutsumi Kaori)

北海道大学・大学院保健科学研究所・助教

研究者番号：80344505

研究成果の概要（和文）：

放射線治療は癌の非侵襲的治療法の一つとして非常に重要で有効な治療方法の一つである。近年の著しい放射線治療技術の進歩は治療成績を大きく向上させた。しかし、これらの技術進歩にも関わらず、放射線治療後に発生する再増殖腫瘍細胞の制御は困難である。再増殖腫瘍細胞は、照射前の腫瘍と比較して悪性度が高く、患者の生命予後を悪化させる。残念ながら、腫瘍の再増殖を引き起こす分子メカニズムは未だに解明されておらず、我々のグループが僅かに報告しているのみである。我々は、再増殖腫瘍細胞の性質を分子レベルで理解し、制御することが放射線治療による寛解率を改善する上で重要な要素であると考えた。本研究では、放射線照射を生き残る腫瘍細胞 IR 株内でニューロピリン 1 が果たす役割について解析した。ニューロピリン 1 は主に血管新生と細胞運動に関わる分子として知られており、本研究でもその両者への関与の可能性について検討した。IR 株ではニューロピリン 1 遺伝子の発現量が親株と比較して高かったが、タンパク質レベルでの発現量に差はみられなかった。また、正常ヒト臍帯静脈血管内皮細胞 (HUVECs) を用いた脈管形成能も親株、IR 株とも同程度であった。血管内皮細胞増殖因子 (VEGF) の細胞外分泌量にも有意差は認められなかった。一方、ニューロピリン 1 分子の細胞内局在の違いを免疫染色によって確認した。親株、IR 株ともに vesicle 様の構造物が観察されたが、その量は IR 株では減少していた。vesicle 様の局在と EEA1 の局在は一致しなかった。また、ニューロピリン 1 と  $\alpha 5\beta 1$  インテグリンとの結合は親株、IR 株ともみられなかったが、 $\alpha v\beta 3$  インテグリンについては親株、IR 株とも相互作用が観察された。しかしながら、親株と IR 株の間でニューロピリン 1 と  $\alpha v\beta 3$  インテグリンの結合能に差はみられなかった。ニューロピリン 1 は IR 株において、血管新生への関与は認められなかったが、インテグリンを介して細胞内局在の変化に関与し、IR 株における運動能亢進になんらかの役割を果たしている可能性が考えられた。

研究成果の概要（英文）：

Radiotherapy is an important noninvasive treatment for many types of cancer. Recently, remarkable progress of technology of radiotherapy leads to an improvement of local control rate. However, the emergence of tolerant cells during or after radiotherapy remains problematic. The patients who relapsed by repopulated tumor have worse prognoses because of more malignant character of repopulated tumor compared with that of before irradiation. Unfortunately, the molecular mechanisms of cause for tumor repopulation remain unknown. To elucidate the molecular profile of repopulated tumor, present study analyzed the cellular properties of surviving tumor after X-ray irradiation by using IR cells which is the model cell line of repopulated tumor. In the present study, we analyzed the role of Neuropilin 1 (NRP1) in radiation surviving cells (IR cells). NRP1 is a well known as an angiogenesis and cell motility related molecule. Although the mRNA expression levels of NRP1 were up-regulated in IR cells compared with parental cells, the protein expression of NRP1 was the same level between parental cells and IR cells. To analyze the activity of angiogenesis in IR cells, we performed tube formation assay and Plasma Clot assay by using human umbilical vein endothelial cells (HUVEC). However, IR

cells indicated the same levels of angiogenic activity compared to that of parental cells. The secretion level of vascular endothelial growth factor (VEGF) was also the same level between parental cells and IR cells using ELISA. On the other hand, the NRP1 localization in the cells was different between those two cell lines. Though NRP1 was observed as a vesicle-like constructs in both cell lines, the amount of vesicles was 1.5-fold decreased in IR cells. These vesicles were not co-localized with EEA1, an early endosome-associated protein. The association of NRP1 with integrin  $\alpha 5\beta 1$  was not observed in both cells, whereas the interaction of integrin  $\alpha V\beta 3$  and NRP1 was detected by immunoprecipitation assay. Though these interactions were the same levels between two cells, integrin may associates with the control of NRP1 localization. Further studies will be necessary to clarify the function of up-regulated-NRP1 in IR cells, interaction between integrin and NRP1 may lead to control behavior of up-regulation of cell motility in IR cells.

#### 交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
22年度	1,700,000	510,000	2,210,000
23年度	1,400,000	420,000	1,820,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,100,000	930,000	4,030,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：内科系臨床医学・放射線科学

キーワード：放射線治療、ニューロピリン1、インテグリン、細胞接着、再増殖腫瘍細胞

#### 1. 研究開始当初の背景

放射線治療は癌の非侵襲的治療法の一つとして非常に重要な治療方法の一つである。IMRT（強度変調放射線治療）や高精度3次元放射線治療に代表される近年の著しい放射線治療技術の進歩は、標的腫瘍への照射精度の向上を導き、これにより、より多くの線量を標的腫瘍へ照射することが可能となった。しかし、これらの技術進歩にも関わらず、放射線治療後に発生する再増殖腫瘍細胞の制御は困難である。再増殖腫瘍細胞は、照射前の腫瘍と比較して悪性度が高く、患者の生命予後を悪化させる。残念ながら、腫瘍の再増殖を引き起こす分子メカニズムは未だに解明されていない。申請者は、再増殖腫瘍の性質を分子レベルで理解し、制御することが放射線治療による寛解率を改善する上で重要な要素であると考え研究を行っている。

腫瘍の放射線感受性に関する研究の多くは、放射線照射後早期の細胞応答、若しくはシグナル伝達に関するものであった。それに対して、我々は、放射線照射後に分裂、増殖能を有した再増殖腫瘍細胞のモデル細胞群を利用して研究を遂行した。我々はこれまで、実験室レベルで一連の研究を行うために、再増殖腫瘍細胞のモデル細胞群 IR 株（以下、IR株）を樹立し、2つの論文を発表している。

IR 株は、放射線照射前の親株と比較して、細胞運動能、浸潤能、接着能に優れ、細胞-基質間接着において重要な役割を演じる FAK、インテグリン、ビンキュリン、パキシリンの接着斑における局在が高いことを明らかにしている。一方我々は、マイクロアレイによって IR 株の発現遺伝子量を親株と比較し、その中でニューロピリン1遺伝子の発現が約2.4倍増加していることにも着目した。ニューロピリン1は VEGF（血管内皮細胞増殖因子）受容体の一つであり、血管新生と深く関わっている分子であるが、腫瘍細胞における機能は未知な点が多く、可能性を秘めた分子である。本研究では、再増殖腫瘍細胞の細胞特性を新たに血管新生という局面からアプローチするとともに、再増殖腫瘍細胞におけるニューロピリン1と細胞接着との関連性を明らかにしようと考えた。

## 2. 研究の目的

ニューロピリン1は血管新生と細胞運動に関わる分子である。神経細胞や血管内皮細胞での役割についてはいくつか報告があるが、腫瘍細胞における機能は未知数である。IR株におけるニューロピリン1遺伝子発現量は親株と比較して高く、IR株におけるVEGF発現量にオートクリンのように作用して、VEGF分泌量を増加している可能性が考えられる。また、Valdembriらの報告によると、ニューロピリン1は血管内皮細胞において、細胞接着分子であるインテグリン $\alpha 5\beta 1$ の細胞内輸送に関わっている(PLoS Biol., 2009)。本研究では、IR株におけるニューロピリン1の血管新生への役割と運動能亢進への役割について調査することを目的とした(図1)。

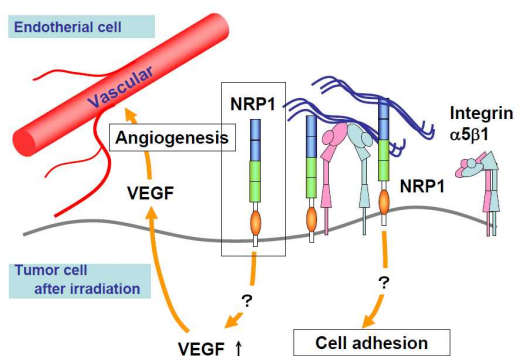


図1 放射線照射を生き残った腫瘍細胞におけるニューロピリン1の役割に関する仮説

## 3. 研究の方法

ヒト肺非小細胞癌由来 H1299 株及びヒト乳癌由来細胞株 MCF7 と、それらに 10 Gy の X 線を照射して 14 日または 30 日後に生き残った細胞(再増殖腫瘍細胞のモデル細胞群) IR 株の細胞特性を比較した。作成した両株の放射線感受性は、コロニー形成法により比較した。また、本研究の Key 分子であるニューロピリン1遺伝子の発現量の変化は RT-PCR によって比較した。IR 株におけるニューロピリン1遺伝子の発現量増加と血管新生との関連を探るために、Plasma Clot 法と脈管形成能解析法を利用した。両方法とも正常ヒト臍帯静脈血管内皮細胞(HUVECs)を親株または IR 株の濃縮培養液で処理することにより、その増殖効果(Plasma Clot 法)または脈管形成(脈管形成能解析法)の様子を観察した。細胞から分泌される血管内皮細胞増殖因子(VEGF)の分泌量の比較には、ELISA 法を利用した。細胞内のニューロピリン1の発現量ならびに  $\alpha 5\beta 1$  インテグリン、 $\alpha v\beta 3$  インテグリンとの結合は免疫沈降を利用したウェスタンブロット法によって観察した。ニューロピリン1の細胞内局在の違いは、免疫染色法により観察した。

## 4. 研究成果

再増殖腫瘍細胞のモデル細胞群 IR 株とその親株における発現 mRNA 量を比較した結果、マイクロアレイ法ではニューロピリン1遺伝子の発現量が IR 株で 2.4 倍増加していた。これに基づきニューロピリン1遺伝子の発現量を定量的 RT-PCR 法によってより詳細に解析したところ、mRNA レベルが親株と比較して 1.4 倍高かった。IR 株におけるニューロピリン1遺伝子発現量の増加が血管新生に関わっている可能性を考え、親株と IR 株から細胞外に分泌される VEGF 分泌量を ELISA 法によって比較した結果、H1299、MCF7 とともに親株と IR 株で分泌量に差はみられなかった。正常ヒト臍帯静脈血管内皮細胞(HUVECs)を用いた脈管形成能の比較でも、親株と IR 株の脈管形成能に有意な差はみられなかった(図2)。同様に、Plasma Clot 法によっても血管新生能の差は見られなかった。一方、RT-PCR 法による遺伝子発現量の比較では、IR 株では血管新生を阻害する微量生理活性タンパク質 CXCL14 遺伝子の発現量が増加していることがわかったが、IR 株における血管新生能の亢進は認められなかった。

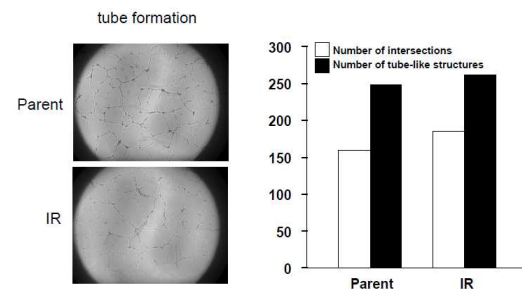


図2 HUVECs を利用した脈管形成能の比較

次に、IR 株におけるニューロピリン1遺伝子発現量の増加が細胞接着能の亢進と何らかの関係があると考え、インテグリンとの相互作用を免疫沈降法によって検討した。ニューロピリン1の発現量はタンパクレベルでは親株と IR 株ではほぼ同レベルであり、 $\alpha v\beta 3$  インテグリンとの結合は親株、IR 株とも観察された。しかし、親株と IR 株の間で結合能の差はみられなかった。また、 $\alpha 5\beta 1$  インテグリンとの結合は親株、IR 株ともみられなかった。一方、細胞内におけるニューロピリン1の細胞内局在を免疫染色法によって検討した結果、H1299 において vesicle 様の局在が多数観察され、その量は親株と比較して IR 株では僅か 2/3 程度だった(図3)。また、この vesicle 様の局在と早期エンドソームのマーカーである EEA1 との共局在は認められなかった。今後は、この vesicle がニューロピリン1単独で存在するのか、あるいはインテグリンやその他のタンパク質とともに存在するのか、その構成単位を明らかにしたい。

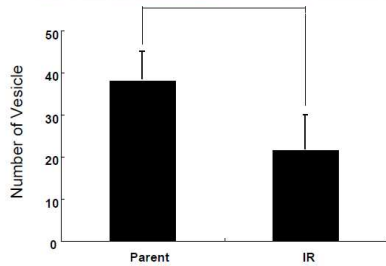
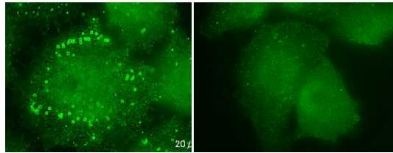


図3 ニューロピリン1の細胞内局在

また、インテグリンについては $\alpha$ 鎖と $\beta$ 鎖の組合せが多数存在し、ニューロピリンとの結合の報告もあることから、今後も各種インテグリンファミリーとの結合を検討する必要がある。

本研究課題により、放射線照射を生き残った腫瘍細胞において、ニューロピリン1の細胞内局在が変化している可能性が示唆された。この局在の変化と細胞接着能、運動能との関連性を明らかにすることが今後の検討課題である。

#### 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0件)

[学会発表] (計1件)

Tsutsumi K, Chiba A, Ooshima T, Yamazaki R, Nishioka T : Involvement of vascular endothelial growth factor (VEGF) secretion in radiation surviving tumor cells derived from breast cancer cell line. Experimental Biology 2011, WashingtonDC, USA, 2011.4.

[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

#### 6. 研究組織

##### (1) 研究代表者

堤 香織 (ツツミ カオリ)

北海道大学・大学院保健科学研究院・助教

研究者番号：80344505

研究者番号：

##### (2) 研究分担者

( )

研究者番号：

##### (3) 連携研究者

( )

研究者番号：