

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 6 月 13 日現在

機関番号：12602

研究種目：基盤研究(B)

研究期間：2011～2013

課題番号：23390427

研究課題名(和文) 分子イメージングを用いた口腔癌微小環境の可視化とその放射線治療への応用

研究課題名(英文) Visualization of oral cancer microenvironment using molecular imaging and its application to radiotherapy

研究代表者

三浦 雅彦 (Miura, Masahiko)

東京医科歯科大学・医歯(薬)学総合研究科・教授

研究者番号：10272600

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 11,800,000円、(間接経費) 3,540,000円

研究成果の概要(和文)：腫瘍の細胞動態は、放射線感受性に影響を与える重要な因子である。しかしながら、細胞が生きたままそのダイナミクスを捉えることはこれまで技術的に不可能であった。また、腫瘍微小環境という特殊な状況においては、単層培養時と細胞動態が大きく異なることが予想される。本研究では、細胞周期を可視化する技術を用いて、腫瘍微小環境中の腫瘍細胞が、放射線照射後、どのような細胞動態を示すかを検討した。スフェロイドを用いて、内層と外層の増殖動態の相違の可視化に成功し、さらにG2アレストが遷延することを示した。G2アレストを示す期は放射線感受性であることから、本成果は分割照射を行う上で臨床的に重要な示唆を与えられる。

研究成果の概要(英文)：Cell kinetics is thought to be an important factor that significantly affects cellular radiosensitivity in solid tumors; however, it was almost impossible to technically detect its dynamics in a condition that cells are alive. It is highly speculated that cells should exhibit a different cell kinetics in tumor microenvironments from that in monolayer cultures. In this study, we examined how tumor cells show the change of cell kinetics in tumor microenvironments following irradiation, using a novel technique to visualize the cell cycle. We succeeded in visualizing the difference in radiation-induced cell kinetics between outer- and inner-layers in multicellular spheroids. Furthermore, we found that radiation-induced G2 arrest was remarkably prolonged in tumor microenvironments. Considering that cells in the cell cycle phase of G2 arrest is radiosensitive, the present findings should provide important clinical implications in a fractionated regimen.

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：歯学・病態科学系歯学・歯科放射線学

キーワード：分子イメージング 放射線治療 腫瘍微小環境

1. 研究開始当初の背景

我々のこれまでの研究から、腫瘍の放射線感受性に最も大きな影響を与える因子は、酸素分圧を含む腫瘍微小環境や細胞動態であり、しかも、照射後それらの変動することによって、次の照射に対する感受性も大きく変化することが示唆された。従って、これらの情報を時空間的に取得することが可能になれば、放射線感受性の変動に対応した放射線増感戦略の構築が可能となり、ひいては、テーラーメイド放射線治療にもつながる重要な情報を提供しうるものと考えられる。

2. 研究の目的

本研究は、腫瘍微小環境下における細胞動態や低酸素領域を分子イメージングによって可視化し、時空間的な情報を取得して、放射線治療における臨床の場への還元を目指すものである。具体的には、以下に示す Fucci と呼ばれる細胞周期を可視化するシステムを導入し、腫瘍微小環境下での放射線照射後の応答を、スフェロイドやマウス皮下移植固型腫瘍を用いて検討する。また、骨浸潤環境への応用も試みる。さらに、臨床でその有効性が認められ、最近、積極的に施行されている化学放射線療法も考慮し、新規のチューブリン重合阻害剤プリナブリンによる細胞周期への影響や併用効果についても検討を加える。

3. 研究の方法

(1)細胞株

Fluorescent ubiquitination-based cell cycle indicator (Fucci)プロープを発現させた HeLa-Fucci 細胞(理研宮脇敦史博士より供与)を主に実験に用いた。Fucci プロープは、G1 期に赤色、S/G2/M 期に緑色の蛍光を発し、細胞が生きたまま観察することが可能になる。我々は既に、HeLa-Fucci 細胞に放射線を 10Gy 照射すると、十数時間後にはほぼすべての細胞が緑色蛍光を呈し、24 時間後には元の分布に戻り、これが G2 アレスト動態を反映することを報告している。

(2)低酸素処理

低酸素環境を作るために、アネロパック-アネロ 5%(三菱ガス化学)を用い、容器として 2.5L または 0.5L ジャーを使用した。

(3)スフェロイドの作製

Hydrocell™ 24-ウエルプレート(セルシード)を用いて、細胞がプレートに接着しない状態で 10 日間培養することにより、直径~500 μm のスフェロイドを作製、使用した。

(4)タイムラプスイメージング

Fucci プロープの変化を経時的に検討するために、チェンバー中の環境を 37°C、湿度 100% に保ち、細胞を培養しながら、または固定したスフェロイドを、蛍光顕微鏡 BZ-9000(キー

エンス)または共焦点蛍光顕微鏡 FV10i-DOC (オリンパス)を用いて観察した。

4. 研究成果

(1)低酸素状態が細胞周期ならびに Fucci プロープに与える影響

アネロパック-アネロ 5%を用いて、0.1%酸素分圧で細胞を培養すると、次第に Fucci プロープの蛍光が消失し、10 時間後にはほぼ完全に消失することがわかった。興味深いことに、mAG、mKO2 いずれの蛍光タンパク質も、処理 10 時間後には、蛍光はほぼ完全に消失したにもかかわらず、タンパク質は非処理時と同様にウエスタンブロットングにて検出されることがわかった。すなわち、低酸素処理によって認められた蛍光の消失機構は、細胞周期とは無関係であることを示している。この現象は、低酸素処理前に存在していた成熟蛍光タンパクが、低酸素処理後、細胞周期を回転することで分解、枯渇し、一方で、低酸素処理中に合成される蛍光を寄せられない未成熟タンパクが生成される結果であることを証明した。また、タンパク発現量の解析から、40 時間後には、ほぼすべての細胞が S 期初期に同調することを見いだした。本結果は、Exp Cell Res 並びに Biochem Biophys Res Commun に報告した(主な発表論文等参照)。

(2)チューブリン阻害剤によって M 期に誘発される Fucci の異常蛍光パターンの解析

化学放射線療法は、頭頸部癌の標準治療になりつつあることから、東京薬科大の林教授に研究分担者として新たに加わって頂き、彼らによって開発された新規チューブリン重合阻害剤を用いて、まず、細胞周期に対する影響を解析した。その結果、プリナブリン処理により、M 期に細胞が集積し、分裂期崩壊を引き起こして細胞死が起こることを確認した。驚くべきことに、M 期は Fucci システムにおいて、本来緑色蛍光のみを発するが、プリナブリン処理によって、緑色のみならず赤色蛍光も同時に出現する異常な現象が生じることを明らかにした。異常な赤色蛍光が M 期のどの時期に出現するかを、GFP-ヒストン H2B を発現させ、染色体の可視化を同時に行いながら解析した所、核膜消失後、メタフェーズの前に生じることを明らかにした。SCF^{SKP2} 複合体活性が、M 期において何らかの理由によって低下し、赤色蛍光が異常に発現するものと考えられる。その結果を図 1 に示す。この異常蛍光は、分裂期崩壊の前兆であることもわかった。また、より低濃度でチューブリン重合阻害を示すプリナブリン誘導体 KPU-133、ノコダゾール、さらにはチューブリン脱重合阻害剤パクリタキセルでも生じることから、チューブリン阻害剤に共通して引き起こされる現象であることを明らかにした。本結果は、Biochem Biophys Res

Commun に報告した(主な発表論文等参照)。
放射線との併用効果を見るために、コロニー法によって生存曲線を求めた。その結果、プリナブリン処理 24 時間後に放射線を併用すると、相乗的な増感効果が得られことがわかった。この効果は、放射線感受性の高い M 期に細胞が集積したためと考えられ、併用タイミングを含め、更なる解析を進めている。

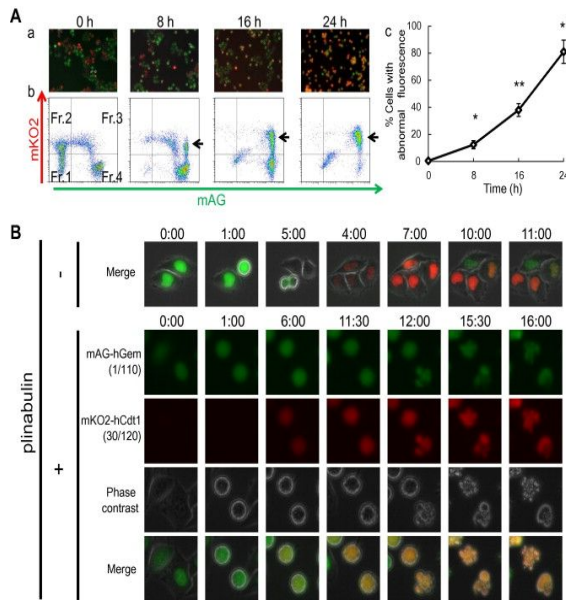


図1 プリナブリンによる Fucci システムにおける異常赤色蛍光の出現
A, 異常赤色蛍光発現細胞の経時的発現動態
a) プリナブリン処理後のタイムラプスイメージング; b) 緑色、赤色蛍光のフローサイトメトリーによる 2 次元ヒストグラム; c) 異常赤色蛍光発現細胞の経時的発現頻度
B, GFP-ヒストン H2B による染色体の可視化を併用したプリナブリン処理後の M 期内異常赤色蛍光発現時期の同定

(3)スフェロイドでの放射線照射後の細胞動態

腫瘍微小環境中における放射線照射後の G2 アレスト動態を検討するために、直径~500 μ m のスフェロイドを作製した。通常、組織切片を作製してスフェロイド内部を観察するのが一般的であるが、我々は、共焦点蛍光顕微鏡を用いて、切片を作製せずに、細胞が生きたままの状態スフェロイド内部の蛍光分布を観察してみた。その結果、表層から 60 μ m 以上深部に入ると、蛍光強度が低下することがわかった。これは、顕微鏡の光学条件の限界を示すものと考えられた。そこで、表層と 40 μ m の部位に深度を固定し、10Gy 照射後、G2 アレスト動態をリアルタイムイメージングによって追跡した。その結果、いずれにおいても緑色蛍光を示す細胞の割合は、24 時間をピークに減少したが、40 時間後も緑色優位の状態が続いていた。単層培養では、24

時間後にはほぼ照射前の状態に戻ることから、スフェロイドを構成する細胞では、G2 アレストが遷延することが明らかになった。光学的限界値の 60 μ m の領域では、赤色蛍光優位で、外層と内部に優位な差を認めなかった。照射をしてないスフェロイドの 25 μ m の深さにおいて、赤色蛍光、緑色蛍光の持続時間を計測すると、単層培養時に比べて、赤色蛍光の持続時間が有意に延長していることが判明し、スフェロイド内部では、赤色蛍光が優位であることと矛盾のない所見であった。

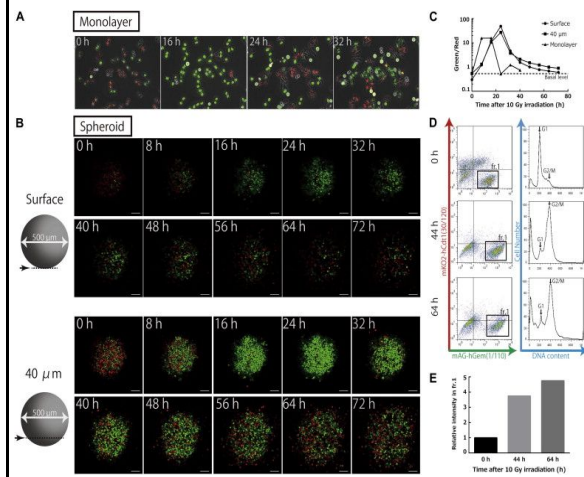


図2 スフェロイドにおける照射後の G2 アレスト動態
A, 単層培養における G2 アレスト動態
B, スフェロイドの表層、深さ 40 μ m における G2 アレスト動態
C, 照射後の green/red 比における単層培養、スフェロイド表層、深度 40 μ m での経時的変化の比較
D,E フローサイトメトリーによる緑色蛍光分画の蛍光量の定量

我々はさらに深層部分の検出を試みた。光学的限界を克服するために、透明化試薬である scale を用いてスフェロイドの透明度を高めた。ただしこの処理では、固定が必要となるために、リアルタイムイメージングは断念せざるを得なかったが、深さ 200 μ m まで観察が可能となった。興味深いことに、200 μ m の深さにおいても赤色優位ではあったが、外層と内部に赤色と緑色蛍光の分布に有意な差は認められなかった。ところが、照射 16 時間後、約 100 μ m までの表層細胞はほとんど緑色になったのに対し、それより深い部分では、赤色蛍光が優位に観察され、表層とは異なる挙動を示すことがわかった。この現象は、未照射状態において、表層細胞の赤色蛍光は G1 期、深層細胞の赤色蛍光は G0 期を反映していると考えれば、容易に説明できる。照射後、細胞周期を回転している表層細胞が G2 アレストに向かうために緑色になるが、内部では増殖が停止しているため、赤色が残存したものと考えられる。興味深いことに、照

射 24 時間後には、内部の赤色細胞も緑色に変化することが検出された。この現象は、照射後、再酸素化様の現象が起こり、静止状態から増殖状態にシフトすることによって引き起こされたものと考えられた。外層の厚みは、scale 処理による膨張率を考慮して、オリジナルサイズに換算すると、約 70 μm であり、これは、酸素の拡散距離にほぼ一致する。10Gy 照射後のスフェロイド深層部分の共焦点画像を図 3 に、スフェロイド内の深さによる照射の影響のまとめを図 4 に示す。これらの結果は、Biochem Biophys Res Commun に報告した(主な発表論文等参照)。

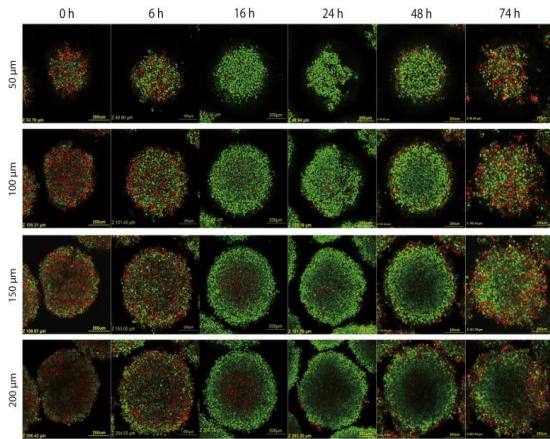


図 3 放射線照射後の scale 処理したスフェロイドにおける内部の蛍光動態

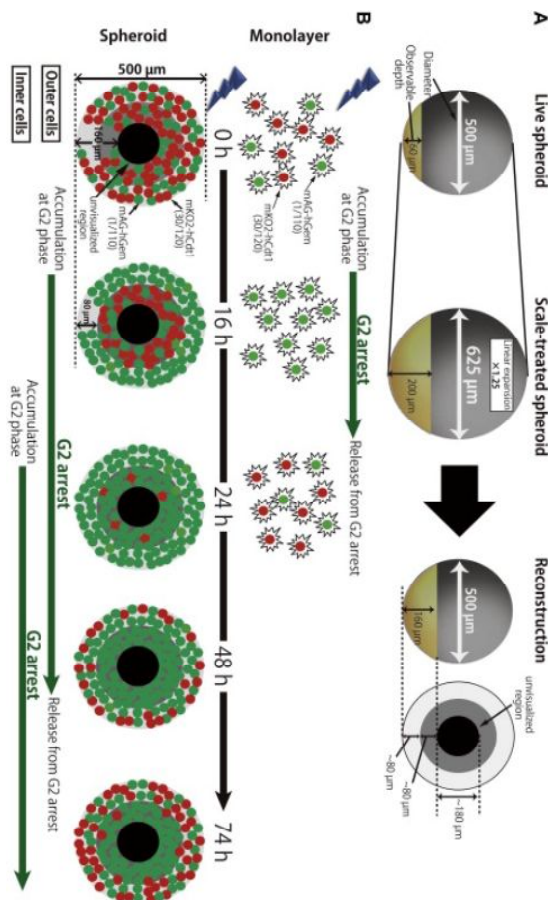


図 4 照射後のスフェロイドにおける細胞

動態のまとめ

(4) マウス皮下移植腫瘍での放射線照射後の細胞動態

次に、ヌードマウス皮下移植腫瘍を作り、10Gy 照射して種々の時間後、腫瘍を取り出して薄切切片を作製した。未照射の腫瘍では、血管からの距離にかかわらず、赤色細胞が優位であり、いずれかの蛍光が局在する様子は認められなかった。壊死層近傍には、核染色されるものの、いずれの蛍光も発しない領域が認められた。前述した低酸素によって蛍光が消失している領域かと思われたが、低酸素マーカーであるピモニダゾールに対する免疫染色(壊死細胞には反応しない)を行うと、この領域は染色されなかったことから、壊死に近い細胞層であろうと考えられた。染色されたのは、蛍光を発している細胞のうち、壊死層に近い側の数層であった。

10Gy 照射 24 時間後には、劇的な変化が認められた。ピモニダゾールで染色される領域にほぼ一致して、赤色蛍光を呈し、それより表層側が緑色を呈した。48 時間後には、赤色領域も緑色に変化し、照射後 5 日以上も緑色優位な状態が持続していた。スフェロイドの表層と内部で認められた変化が、固型腫瘍内の低酸素かつ静止期にある分画と増殖期にある分画で認められたものと解釈される。

さらに、我々は、光子イメージャーによって緑色と赤色蛍光強度を定量化し、後者に対する前者の比率を照射後の時間に対してプロットすると、やはり 5 日以上に渡って高い比率を維持することがわかり、切片を作らずに G2 アレストの情報を得られることがわかった。以上の成果は、現在投稿準備中である。

(5) 骨浸潤環境での低酸素分画

舌がん細胞株 HSC3 に、5xHRE(低酸素反応性領域)でドライブされた EGFP を含むプラスミドを導入し、安定発現株を樹立した。これを、マウスのカルバリアを用いた骨浸潤モデルを用いて、骨浸潤部と非浸潤部に HIF-1 の発現を指標として低酸素領域の分布に違いが認められるかどうかを検討したが、明確な違いは認められなかった。

(6) 結論

本研究において、腫瘍微小環境下では、放射線による G2 アレストが遷延することを、スフェロイドならびにマウス皮下腫瘍モデルを用いて明確に示した。また、未照射時には、赤色蛍光有意な状況で、静止期分画と増殖分画の区別がつかなかったが、照射することにより、後者が G2 アレストに向かって緑色になり、後者が赤色にとどまることで、明確なコントラストが顕在化した。さらに、再酸素化によると思われる静止期から増殖期へのシフトも観察された。G2 アレストを起

こす時期は、放射線感受性であることから、本研究が臨床に及ぼすインパクトは大きいと考えられる。今後は、G2期遷延の分子メカニズムやどのような腫瘍でこうした現象が認められるのかについて検討を加える。

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 4 件)

1.Kaida A, Miura M, Visualizing the effect of tumor microenvironments on radiation-induced cell kinetics in multicellular spheroids consisting of HeLa cells. *Biochem Biophys Res Commun*, 査読有 439, 2013, 453-458. doi: 10.1016/j.bbrc.2013.08.093

2.Honda-Uezono A, Kaida A, Michi Y, Harada K, Hyashi Y, Hayashi Y, Miura M, Unusual expression of red fluorescence at M phase induced by anti-microtubule agents in HeLa cells expressing the fluorescent ubiquitination-based cell cycle indicator (Fucci). *Biochem Biophys Res Commun*, 査読有 428, 2012, 224-229. doi: 10.1016/j.bbrc.2012.10.014

3.Kaida A, Miura M. Differential dependence on oxygen tension during the maturation process between monomeric Kusabira Orange 2 and monomeric Azami Green expressed in HeLa cells. *Biochem Biophys Res Commun*, 査読有 421, 2012, 855-859. doi: 10.1016/j.bbrc.2012.04.102

4.Kaida M, Miura M. Visualizing the effect of hypoxia on fluorescence kinetics in living HeLa cells using the fluorescent ubiquitination-based cell cycle indicator (Fucci). *Exp Cell Res*, 査読有 318, 2012, 288-297. doi: 10.1016/j.yexcr.2011.10.016

[学会発表](計 5 件)

1.三浦雅彦 シンポジウム：放射線照射後の腫瘍細胞動態の可視化から見える腫瘍微小環境が生み出す新たな放射線抵抗性機構の可能性.
第 16 回癌治療増感シンポジウム 2014 年 2 月 7 日～8 日 奈良

2.Masahiko MIURA 招待講演：Potential utility of Fucci in radiobiology
KIRAMS Symposium 2013. For better understanding of radiation signaling in cancer 2013 年 8 月 23 日 ソウル・韓国

3.Masahiko MIURA 招待講演：Biological Response after Radiation Exposure: Visualization of cell cycle kinetics in tumor cells after radiation exposure using

Fucci.

The 3rd Asian Congress of Radiation Research 2013 年 5 月 10-13 日 北京・中国

4. 戒田篤志、三浦雅彦：¹³⁷Cs 線源低線量率連続照射による腫瘍細胞動態の時空間的解析.
日本放射線腫瘍学会第 25 回学術大会、2012 年 9 月 6 日 - 8 日 東京

5. 戒田篤志、三浦雅彦：Fucci を利用した固型癌における放射線照射後の腫瘍内細胞周期動態の解析.
第 9 回がんハイポキシア研究会、2011 年 1 月 26-27 日 東京

[図書](計 0 件)

[産業財産権]
出願状況(計 0 件)

取得状況(計 0 件)

[その他]

ホームページ等

<http://www.tmd.ac.jp/mdth/index.html>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

三浦 雅彦 (MIURA, Masahiko)

東京医科歯科大学・医歯学総合研究科・教授
研究者番号：10272600

(2) 研究分担者

山口 朗 (YAMAGUCHI, Akira)

東京医科歯科大学・医歯学総合研究科・教授
研究者番号：00142430

林 良雄 (HAYASHI Yoshio)

東京薬科大学・薬学部
研究者番号：10322562