

**科学研究費助成事業 研究成果報告書**

平成 27 年 5 月 13 日現在

機関番号：37116

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2013～2014

課題番号：25670616

研究課題名(和文)放射線治療抵抗性脳腫瘍細胞の代謝と遊走を電子スピン共鳴でライブイメージングする

研究課題名(英文)Electron spin resonance live imaging for the metabolism and migration of radio-resistant brain tumor cells

研究代表者

盛武 敬(MORITAKE, Takashi)

産業医科大学・産業生態科学研究所・准教授

研究者番号：50450432

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,900,000円

研究成果の概要(和文)：平成26年度は脳腫瘍幹細胞のレドックスバランスと遊走浸潤能の解析を行った。さらに細胞の還元能を電子スピン共鳴(ESR)によるin vitroイメージングする為の水平共鳴管の開発を試みた。放射線照射により腫瘍細胞は還元能が亢進することが明らかになったが、予想に反して脳腫瘍幹細胞では還元能が低下していた。また放射線照射後に脳腫瘍幹細胞は非幹細胞よりも浸潤能が亢進した。ESR共鳴管をイメージング用に改造し動作確認を行った。

研究成果の概要(英文)：In 2014, we analyzed of redox balance and migration/invasion of brain tumor stem cells. Further it was tried to develop a horizontal resonance cavity for in vitro imaging by the reducing ability of the cells using the electron spin resonance (ESR). Brain tumor cells irradiated to x-ray were revealed that reducing ability was significantly enhanced; in the brain tumor stem cells, unexpectedly reducing ability was not so much enhanced. The brain tumor stem cells after irradiation were increased the invasive potential than non-stem cells. The remodeled ESR resonance cavity for imaging was confirmed to operate normally.

研究分野：Radiation Biology

キーワード：Electron Spin Resonance Cancer Stem Cell Cell Cycle Radiation

## 1. 研究開始当初の背景

近年、正常組織と同様に脳腫瘍組織においても、脳腫瘍幹細胞を頂点とした階層的な細胞社会が存在することが明らかになっている。脳腫瘍幹細胞は正常な組織幹細胞と同様に自己複製能、多分化能、組織形成能(腫瘍形成能)を有するだけでなく、多くは休止期に集まり、微小環境(ニッチ)に守られていることも明らかとなってきた。また、脳腫瘍幹細胞は放射線や抗がん剤に対して抵抗性を示すことが報告されている。そのメカニズムとしては、細胞内の抗酸化活性が高いこと、DNA 損傷の修復能が高いこと、薬剤排出トランスポーターの発現が高いこと、などが報告されている。脳腫瘍の治療率向上のためには脳腫瘍幹細胞を標的とした治療の開発が望まれているが、有効な手段がほとんど無いのが現状である。

古くから腫瘍細胞は正常細胞とはエネルギー産生機構が大きく異なることが知られている。正常細胞は主にミトコンドリアの酸化的リン酸化によってエネルギーを産生しているのに対して腫瘍細胞は酸素が十分に存在する状況においても主に解糖系を用いてエネルギーを産生することが知られている。最近、脳腫瘍幹細胞が酸化的リン酸化と解糖系によるエネルギー代謝を使い分けるスイッチング現象を起こしている可能性が報告され、このようなエネルギー代謝が脳腫瘍幹細胞の治療抵抗性に関与するのではないかと考えられている。

一方で、低～中線量 X 線(0.5Gy～2Gy)の暴露により、遊走浸潤能が亢進する現象が複数の癌細胞株で確認されており、放射線生物学の常識となってきている。これは放射線治療抵抗性を考える際、(a)細胞単体での放射線抵抗性と、(b)細胞が遊走浸潤することで、照射不十分となり治療抵抗性を示すことを区別して論じる必要性を示している。

## 2. 研究の目的

上記のような背景から脳腫瘍幹細胞の特殊なエネルギー代謝や放射線暴露に起因する浸潤遊走が脳腫瘍の放射線治療抵抗性に関与すると考えられる。本研究では脳腫瘍幹細胞のエネルギー代謝と浸潤遊走の基礎的な検討と電子スピン共鳴(ESR)による in vitro イメージング手法の開発を目的とした。

## 3. 研究の方法

### (1)脳腫瘍幹細胞のエネルギー代謝の解析

我々はこれまでにヒト小児髄芽腫細胞 ONS-76 から放射線抵抗性を有し、脳腫瘍幹細胞マーカーCD133が強発現している ONS-F8 を樹立している。本研究ではこの幹細胞性の高い ONS-F8 と幹細胞性が低い ONS-76 を試料とした。解糖系活性の指標として細胞外に排出される乳酸の量を市販のキットを用いて解析した。

ミトコンドリアの酸化的リン酸化の活性の指標として酸素消費速度(OCR)を測定した。安定なフリーラジカル化合物である LiNc-BUO と細胞懸濁液を混合密封し、ESR で測定すると酸素濃

度に依存して ESR スペクトルの線幅が狭くなることが知られている。本研究では LiNc-BUO と細胞懸濁液を 37 でインキュベートしながら、経時的に ESR スペクトルを取得しスペクトルの線幅の変化から OCR を評価した。細胞内の活性酸素種(ROS)の量とミトコンドリアからのスーパーオキシドの産生量をそれぞれの特異的蛍光プローブ(MitoSOX および DCF-DA)を用いて解析した。蛍光プローブを細胞に取り込ませ、その蛍光強度をフローサイトメトリーによって解析し、平均蛍光強度を算出した。細胞内の抗酸化活性は Tempol 還元速度を指標として解析した。Tempol は安定ニトロキシラジカルであり、脂溶性が高く細胞内で還元され、ESR シグナルを失う。本研究では Tempol と細胞懸濁液を 37 でインキュベートしながら、経時的に ESR スペクトルを取得し、スペクトルの強度の変化から Tempol 還元速度を算出した。

### (2)脳腫瘍幹細胞の浸潤能の解析

試料は上記と同様に ONS-F8 と ONS-76 とした。浸潤能は Matrigel invasion assay を用いて解析した。細胞に X 線 0、0.5、1、2、4 または 8Gy 照射後細胞をトリプシン処理によって剥がし、 $1 \times 10^5$  個の細胞をインサートの中に播種し 24h 後にインサート下面に浸潤した細胞をカウントした。

### (3) ESR による in vitro イメージング手法の開発

細胞の挿入方向を水平方向に改造し、それに伴う各種パラメーターの設定を行った。また、実際に細胞を挿入し、スペクトルが観察されるか解析した。

## 4. 研究成果

### (1)脳腫瘍幹細胞のエネルギー代謝の検討

24時間あたりに培養液中に排出される乳酸の量を測定したところ、幹細胞様性質を持つ ONS-F8 は親株 ONS-76 より有意に乳酸排出量が高いことが示された(図 1)。この結果は ONS-F8 では解糖系が亢進していることを示唆している。

Lactate levels in culture medium

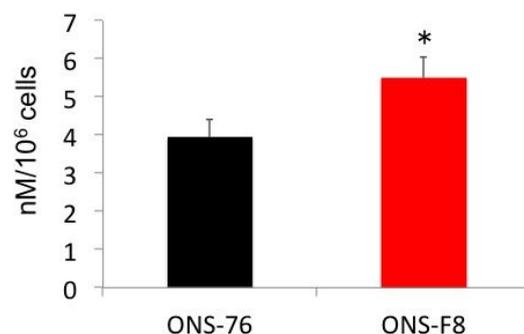


図 1: ONS-F8 と ONS-76 の 24h の乳酸産生量

経時的に LiNc-BUO スペクトルの線幅を解析したところ、ONS-F8 は親株 ONS-76 より有意に線幅が減少する速度が遅く、OCR が低いことが

示された(図2)。この結果はONS-F8ではミトコンドリアの酸化的リン酸化が抑制されていることを示唆している。

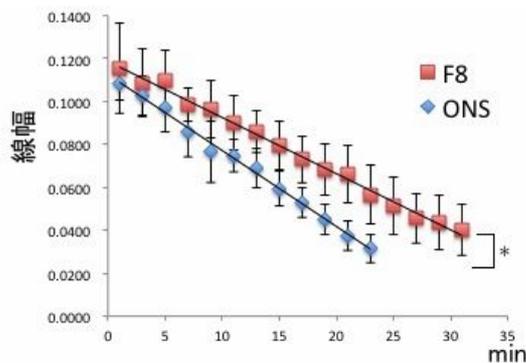


図2: ONS-F8とONS-76の酸素消費速度

ONS-F8 および親株 ONS-76 の細胞内の ROS の量とミトコンドリアのスーパーオキシド産生量をそれぞれの特異的蛍光プローブの蛍光量を指標に解析したところ、両方とも ONS-F8 は親株 ONS-76 より有意に蛍光強度が低いことが分かった(図3)。これは ONS-F8 の細胞内の ROS の量とミトコンドリアのスーパーオキシド産生量が低いことを示している。ミトコンドリアの酸化的リン酸化が活性しているほど、ミトコンドリアからのスーパーオキシド産生量も増加することが知られており、この結果は上記 OCR の結果と一致していると考えられる。

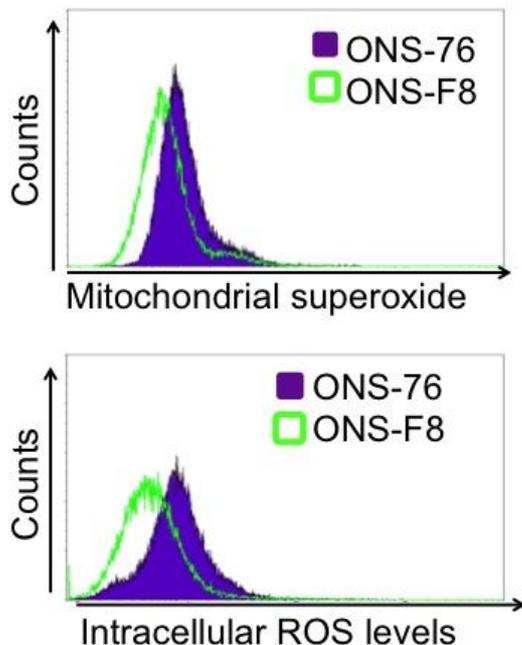


図3: ONS-F8とONS-76の酸素消費速度細胞内のROSの量とミトコンドリアのスーパーオキシド産生量

ONS-F8 および親株 ONS-76 の Tempol 還元速度を ESR により解析したところ、ONS-F8 は親株 ONS-76 より有意にスペクトル強度が減少する速度が遅く、還元能が弱いことが示された(図4)。一方で、ONS-76 細胞に X 線 8Gy 照射後 4 時間での Tempol 還元速度を解析したところ、非照

射群に比べ、有意に Tempol 還元速度が増加していた(図4)。これは X 線照射によって抗酸化物質の合成が亢進し還元能が亢進することを示唆している可能性があると考えられる。

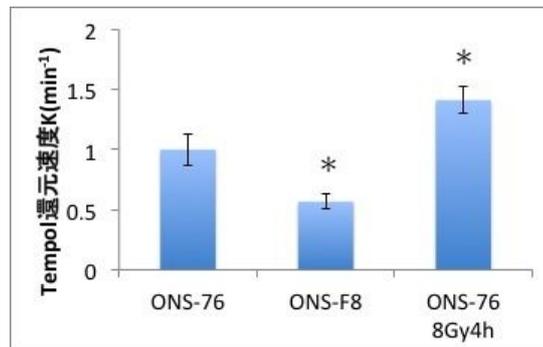


図4: ONS-F8とONS-76のTempol還元速度

### 結論 1

これらの結果から幹細胞様の ONS-F8 は親株 ONS-76 よりもミトコンドリアの酸化的リン酸化を抑制し、解糖系によるエネルギー産生をしていることが示唆された。一方で、ONS-F8 は ONS-76 より還元能が低い可能性が示唆された。

### (2) 脳腫瘍幹細胞の浸潤能の解析

ONS-76 は線量依存的に浸潤能が低下していたが、ONS-F8 では X 線 0.5Gy 照射により、浸潤能が一過性に亢進していた(図5)。1Gy 以上の線量では ONS-F8 でも、線量依存的な浸潤能の低下が見られた(図5)。しかしながら、どの線量においても、ONS-F8 は ONS-76 より高い浸潤能を示していた(図5)。

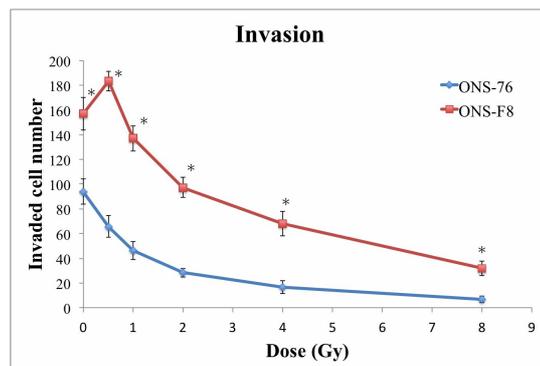


図5: ONS-F8とONS-76の浸潤能

### 結論 2

これらの結果から幹細胞様の ONS-F8 は X 線照射の有無に関わらず、親株 ONS-76 よりも強い浸潤能を示すことが明らかになった。放射線治療中に幹細胞様細胞が浸潤し照射不十分となり、脳腫瘍の再発につながる可能性が考えられた。

### (3) ESR による in vitro イメージング手法の開発

まず地面に対して垂直に試料を挿入する設計になっていて細胞の観察には適さない共振器を改造し試料を挿入・観察できる様に改造した。

具体的には共振器の向きを変更し、それに伴い磁場勾配コイルの位置の変更、マイクロ波導入経路を変更した。

また、ラジカルリサーチ社製のティッシュセルで細胞を培養し、そのまま ESR に挿入して、シグナルが観察されるか確認したところ、経時的な LiNc-BUO スペクトルの線幅の減少が確認された。

### 結論 3

ESR 装置を改造し、基礎的な動作確認を完了した。

### 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 1 件)

伊東一也, 孫 略, 鈴木健之, ゲレルンチュルン・アリウケレル, 洪正善, 石川隆昭, 盛武 敬, 坪井康次: 休止期細胞の放射線抵抗性メカニズムの解明. 第 52 回電子スピサイエンス学会年会 (SEST2013) 講演要旨集, 12-13, 2013 (査読有り)

[学会発表](計 14 件)

孫 略, 伊東一也, 松本孔貴, 盛武 敬, 坪井康次: ジクロロ酢酸ナトリウムによる癌幹細胞様クロンの放射線増感メカニズムの解明. 第 29 回酸化ストレス学会関東支部会, 筑波大学 (東京都・文京区), 12 月 20 日, 2014

伊東一也, 孫 略, 盛武 敬, 坪井康次: X 線照射により発生する遅発性 ROS が細胞の生存に与える影響の解析. 第 29 回酸化ストレス学会関東支部会, 筑波大学 (東京都・文京区), 12 月 20 日, 2014

孫 略, 伊東一也, 松本孔貴, 盛武 敬, 坪井康次: エネルギー代謝経路が癌幹細胞性維持に及ぼす影響の解析. 日本放射線影響学会第 57 回大会, かがしま県民交流センター (鹿児島県・鹿児島市). 10 月 1 日-3 日, 2014

伊東一也, 孫 略, 石川隆昭, 盛武 敬, 坪井康次: 休止期がん細胞内の抗酸化物質が放射線抵抗性に及ぼす影響の解析. 日本放射線影響学会第 57 回大会, かがしま県民交流センター (鹿児島県・鹿児島市). 10 月 1 日-3 日, 2014

伊東一也, 孫 略, 鈴木健之, ゲレルンチュルン・アリウケレル, 洪 正善, 盛武 敬, 坪井康次: 休止期細胞の放射線抵抗性における還元能の寄与の解析. 九州放射線フリーラジカル意見交換会, ステーションホテル小倉 (福岡県・北九州市), 2 月 7 日, 2014

孫 略, 伊東一也, 盛武 敬, 坪井康次: 癌幹細胞特異的ミトコンドリア活性を標的とした新規癌治療の可能性. 九州放射線フリーラジカル意見交換会, ステーションホテル小倉 (福岡県・北九州市), 2 月 7 日, 2014

稲葉洋平, 孫 略, 伊東一也, 盛武 敬, 平山 暁, 千田浩一: 放射線災害時被曝スクリーニング法開発に向けての基礎的検討. 九州放射線フリーラジカル意見交換会, ステーションホテル小倉 (福岡県・北九州市), 2 月 7 日, 2014

Ito K, Moritake T, Sun L, Suzuki K, Ariungerel Gerelchuluun, Hong Z, Tsuboi K: Relationship between reserved antioxidant capacity and radioresistance in dormant cells. 17<sup>th</sup> Biennial Meeting of Society for Free Radical Research International, Kyoto International Conference Center (京都府・京都市), Japan, March 23-26, 2014

Sun L, Moritake T, Ito K, Suzuki K, Ariungerel Gerelchuluun, Hong Z, Tsuboi K: Analysis of mitochondrial state in radioresistant cancer stem-like cells. 17<sup>th</sup> Biennial Meeting of Society for Free Radical Research International, Kyoto International Conference Center (京都府・京都市), Japan, March 23-26, 2014

伊東一也, 孫 略, 盛武 敬, 坪井康次: 休止期細胞の放射線抵抗性メカニズムの解明. 第 28 回日本酸化ストレス学会関東支部会, 日本薬科大学 (埼玉県・北足立郡), 12 月 21 日, 2013

稲葉洋平, 孫 略, 伊東一也, 盛武 敬, 千田浩一: 放射線暴露後血液のラジカル消去活性の測定. 第 28 回日本酸化ストレス学会関東支部会, 日本薬科大学 (埼玉県・北足立郡), 12 月 21 日, 2013

孫 略, 伊東一也, 鈴木健之, ゲレルンチュルン・アリウケレル, 洪 正善, 盛武 敬, 坪井康次: 癌幹細胞様クロンのミトコンドリア活性が癌幹細胞性維持に及ぼす影響の解析. 第 28 回日本酸化ストレス学会関東支部会, 日本薬科大学 (埼玉県・北足立郡), 12 月 21 日, 2013

伊東一也, 孫 略, 鈴木健之, ゲレルンチュルン・アリウケレル, 洪 正善, 石川隆昭, 盛武 敬, 坪井康次: 休止期細胞の放射線抵抗性メカニズムの解明. 第 52 回電子スピサイエンス学会年会, 大宮ソニックシティ (埼玉県・さいたま市), 10 月 24 日-26 日, 2013

孫 略, 伊東一也, 盛武 敬, 坪井康次: 脳腫瘍幹細胞様クロンのミトコンドリア活性が放射線抵抗性に及ぼす影響の解明. 日本放射線影響学会第 56 回大会, ホテルクラウンパレス青森 (青森県・青森市), 10 月 18 日-20 日, 2013

### 6. 研究組織

#### (1) 研究代表者

盛武 敬 (MORITAKE, Takashi)  
産業医科大学・産業生態科学研究所・准教授  
研究者番号: 5 0 4 5 0 4 3 2

#### (2) 研究分担者

松本 孔貴 (MATSUMOTO, Yoshitaka)  
筑波大学・医学医療系・助教  
研究者番号： 70510395

平山 暁 (HIRAYAMA, Aki)  
筑波技術大学・保健科学部・教授  
研究者番号： 20323298