

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 6 月 6 日現在

機関番号：10101

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2013～2015

課題番号：25861050

研究課題名(和文)放射線影響による正常・乳癌細胞相互作用における分子メカニズムの多面性の解明

研究課題名(英文)Possible molecular mechanisms of normal cells and invasive breast cancer cells after radiation treatment

研究代表者

Nam JinMin (NAM, JINMIN)

北海道大学・国際連携研究教育局・助教

研究者番号：60414132

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,100,000円

研究成果の概要(和文)：本研究では、放射線照射後に発現変動する分子をターゲットにして、正常細胞の機能は損なわず、癌を縮小させたり、癌の再発や転移を防ぐことで、放射線治療効果を向上させるために役立つ知見を提示することを目指している。3次元細胞培養にて正常の基底膜構造を維持する乳腺上皮細胞や浸潤性の高い乳癌細胞株を用いて、放射線照射後の分子変動と分子メカニズムの解析を行った。1インテグリンと関連分子の発現亢進が放射線照射後の浸潤性獲得と正常構造の破綻に関わっていた。一方、高浸潤性乳癌細胞において、放射線照射後にインテグリンが細胞表面で発現上昇することが、放射線照射後の浸潤性に関わっている事が示唆された。

研究成果の概要(英文)：In this study, we investigated molecular mechanisms to improve the radiation therapy by targeting specific molecules which are involved in not only preservation of the functions in normal cell structure but also suppressing tumor growth, recurrence and metastasis. To find candidate genes, we performed microarray analysis in a mammary epithelial cell line which has basal polarity, or invasive breast cancer cell lines in three-dimensional laminin rich extracellular matrix (3D IrECM). We found that 1-integrin and its downstream molecules are involved in the disruption of basal polarity structure and invasive transition on non-malignant mammary epithelial cells in 3D IrECM. In addition, we also found that up-regulated integrin expression on the cell surface may have important roles in the invasive activity after radiation treatment in breast cancer cells.

研究分野：医歯薬学

キーワード：放射線 乳癌 3次元培養

1. 研究開始当初の背景

近年、乳癌を含めて多くの癌治療に放射線療法が用いられている。放射線治療は、放射線エネルギーを利用して、癌細胞を標的に、癌を縮小・死滅させるが、癌の近くに存在する正常組織にも放射線が照射される。したがって、正常細胞の機能は保持しながら、癌細胞だけを死滅させるための分子標的の探索や分子メカニズムの解析が必要とされる。

これまでに、研究代表者は、乳癌細胞において、放射線照射後の癌細胞の生存や放射線に対する耐性に関わる分子の一つとして、細胞接着分子の一つであるインテグリンに着目してきた。Park と Bissell らは、インテグリンファミリーの一つである $\alpha 5 \beta 1$ インテグリンが放射線照射後の乳癌細胞において発現が増加し、放射線に対して耐性を持つことを見出し、放射線照射と $\alpha 5 \beta 1$ インテグリンの阻害剤を組み合わせることで、より効果的に癌細胞の細胞死を誘導することを報告してきている。また、他の研究グループからも、 $\alpha 5 \beta 1$ インテグリンが、前立腺がん、皮膚がん、大腸がん、肺がん、膵がんなどの放射線感受性に関わっていることを示唆する研究結果が報告されてきた。

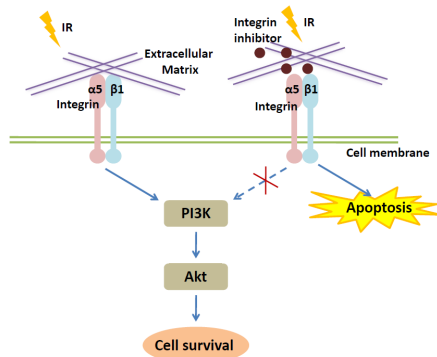


図 1. X 線照射後の癌細胞でのインテグリンシグナル

さらに、研究代表者と共同研究者は、細胞外マトリックス (Extracellular Matrix) の 3 次元細胞培養実験系を用いて、 $\alpha 5 \beta 1$ インテグリンヘテロダイマーの一つである $\alpha 5 \beta 1$ インテグリンが細胞膜において発現量が上昇し、細胞内の Akt (セリン/スレオニンキナーゼ) などの下流分子の活性化を介して、X 線照射後の乳癌細胞生存に関わっていることや、 $\alpha 5 \beta 1$ インテグリンの阻害ペプチドと X 線照射を組み合わせることによって、どちらかの単独処理よりも効果的に癌細胞の細胞死を誘導することを報告してきた。

細胞外マトリックスを用いた 3 次元細胞培養は、癌細胞を取り巻く細胞外微小環境の影響を考慮した実験系として取り入れられてきている。これまでの放射線生物基礎研究で用いられてきたプラスチックディッシュ (2D) の実験系は、簡便でコストを低く抑

える利点がある一方で、細胞集団の立体構造や基底膜の要素を考慮することが難しいだけでなく、細胞外微小環境による影響を見逃す可能性もある。そのため、本研究では、生体内の環境により近い、3 次元細胞培養実験系を用いて、乳腺上皮細胞や乳癌細胞における放射線の影響と放射線照射後の分子メカニズムの解析を行った。

2. 研究の目的

本研究では、放射線照射後に発現変動する分子をターゲットにして、正常細胞の機能は損なわず、癌組織を縮小させ、癌の再発や転移を防ぐことで、放射線治療効果を向上させるために役立つ知見を提示することを目指している。

(1) 浸潤性を有しない乳腺上皮細胞の 3 次元培養を行い、放射線照射後の浸潤能獲得に関わる分子メカニズムの詳細を解析する。

(2) 悪性度の高い浸潤性乳癌 MDA-MB-231 細胞株において、放射線照射後に発現変動する分子と浸潤性との相関を解析する。

(3) 3 次元細胞培養の *in vitro* 実験によって得られた、放射線照射後の癌細胞の放射線耐性や再発に関わる可能性がある分子メカニズムの結果をマウスの *in vivo* 発光・CT イメージング実験系を用いて検証する。

3. 研究の方法

(1) 細胞の 3 次元培養には、再構成基底膜 (ラミニンリッチマトリゲル: Laminin-rich Extracellular matrix) を用いる。乳腺上皮細胞の 3 次元細胞培養を用いて、照射後に浸潤能を獲得する細胞形態変化に関わる分子をマイクロアレイにより遺伝子発現解析を行い同定する。さらに、同定した遺伝子が、照射後の形態や浸潤活性の変化に伴い、タンパク質レベルでの発現変化と相関するかを検証する。

(2) 浸潤性の高い MDA-MB-231 乳癌細胞株に X 線を照射した 24 時間後、フローサイトメトリーを用いて、インテグリンの細胞表面での発現量の定量を行った。さらなる解析のため、MDA-MB-231 を 3 次元で培養後、0 Gy, 2 Gy, 8 Gy の X 線を照射し、遺伝子の発現変動を DNA マイクロアレイ解析によって調べた。X 線照射後に発現が変化した遺伝子を絞り込み、タンパク質レベルでの変化も検証した。さらに、標的となる分子のノックダウン等によって、放射線影響への関与と周辺分子間の機能解析を進めた。標的とする分子の発現を siRNA により抑制し、X 線 (8 Gy) 照射の 24 時間後に、Matrigel Chemoinvasion Assay を用いて浸潤した細胞数を調べ、非照射群と比較を行った。

(3)マウスを用いた *in vivo* イメージング検出のための実験系を構築し、条件検討を行った。まず、長波長化された赤色ルシフェラーゼ遺伝子の配列を含むレンチウイルスベクターを構築した。293T パッケージング用細胞株にトランスフェクションし、ウイルスを含む培地上清を濃縮した後、ウイルスをヒト乳癌細胞株 MDA-MB-231 および、マウス乳癌細胞株 4T-1 に感染されることで、ルシフェラーゼ遺伝子を安定的に導入した。ルシフェラーゼ遺伝子を安定導入した乳癌細胞をマウス皮下に移植し、一定期間経過後、ルシフェリンを投与して発光によって癌細胞を検出した。マウスは、麻酔下で、IVIS Spectrum CT を用いて、発光癌細胞の検出と発光や CT による 3 次元構築イメージの写真を取得した。マウスに移植する癌細胞の数、移植後の観察までの日数、ルシフェリンの投与量、投与後の検出までの時間などの条件の最適化を行った。さらに、放射線照射と阻害剤の組み合わせ実験を行い、未処理群や単独処理群の腫瘍のイメージと比較検討を予定した。

4. 研究成果

(1) 正常極性 (basal polarity) を持つ細胞として、乳癌の初期段階である非浸潤性乳管癌モデルを用い、照射後の再発・浸潤性に 5 1-integrin とそのリガンドである Fibronectin の発現上昇が関わっている事を見出してきており、放射線照射後の細胞の浸潤性獲得過程に 5 1-integrin の分子シグナルが密接に関連している事を示唆する結果を得ている (H23-H24 年度科研費若手研究費の成果)。本研究では、さらに詳細を解析し、5 1-integrin の制御に関わる、細胞内の下流の分子 NF- κ B が、X 線照射後の局在変化にすること、また、NF- κ B などの阻害ペプチドによって、浸潤性を獲得した形態を抑制する事が分かった。これらの結果は、照射後の正常極性の消失と浸潤能獲得過程に、5 1-integrin と NF- κ B のシグナルが関与することを示唆しており、Breast Cancer Research 誌に発表した。(Nam JM, Ahmed KM, Costes S, Zhang H, Onodera Y, Olshen AB, Hatanaka KC, Kinoshita R, Ishikawa M, Sabe H, Shirato H, Park CC. 5 1-Integrin via NF- κ B signaling is essential for acquisition of invasiveness in a model of radiation treated in situ breast cancer. Breast Cancer Res 2013;15 (4):R60.)

また、正常極性と 3 次元細胞培養基底膜構造を保った乳腺上皮細胞を用いた実験系から、非浸潤性から浸潤性形態への形質の転換によって、上皮間葉転換 (Epithelial-Mesenchymal Transition; EMT) のマーカーとなる分子 (Snail, Vimentin, Fibronectin など) の発現上昇が確認され、上皮間葉転換のパスウェイとその関連分子が放射線照射後の浸潤性獲得過程に関与していることが分かった。上皮間葉転換のマーカーとなる分

子の発現上昇によるインテグリンの発現制御に関わる詳細な分子メカニズム解析は次の課題として残されている。

(2) 高浸潤性 MDA-MB-231 乳癌細胞株に X 線を照射した後、インテグリンの発現をフローサイトメトリーで解析したところ、細胞表面におけるインテグリンの発現量が上昇していることが確認された。さらなる分子メカニズムの解析のため、MDA-MB-231 を 3 次元基質で培養した 4 日後に、0 Gy, 2 Gy, 8 Gy の X 線を照射し、遺伝子の発現変動を調べた結果、X 線の線量に比例して細胞周期関連の分子が遺伝子レベルで発現亢進していた。また、これらの条件で、同分子がタンパク質レベルでも相関していることが確認された。標的とする分子の発現を siRNA により抑制し、8 Gy X 線照射の 24 時間後に、Matrigel Chemoinvasion Assay を用いて、がん細胞の浸潤性を検討した結果、照射後の浸潤性が抑制された。これらのことから、同定した細胞周期関連分子が、放射線照射後の癌細胞の浸潤性を亢進する過程に関わっていることが示唆された。これらの *in vitro* による結果を、*in vivo* 発光・CT イメージング実験系にて検証をするため下記 (3) の実験を進めている。

(3)マウスを用いた *in vivo* イメージング実験系の条件検討として、ルシフェラーゼ遺伝子を安定的に導入した乳癌細胞 MDA-MB-231 を 5×10^5 個、NOD-SCID 免疫不全マウスの皮下に注射し、IVIS Spectrum CT を用いて経過観察を毎週行った。150 μ g/ml D-Luciferin を投与し、10 分後に発光の検出を行った結果、2 日後からシグナルを観察することができた。

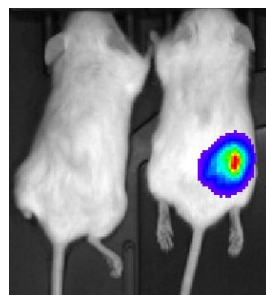


図 2. コントロールの NOD-SCID マウス (左) と、MDA-MB-231 Red-Luc 乳癌細胞を移植した NOD-SCID マウス (右) の IVIS 発光イメージ写真。(移植後 4 週)

H27 年度中に、*in vivo* 発光・CT イメージング実験の条件検討まで行った。3 次元細胞培養の *in vitro* 実験によって得られた放射線照射と浸潤性に関連する分子メカニズムは、*in vivo* 実験系での検証結果を得るには至らなかったが、マウスのイメージング実験系を確立し、次の課題に役立つ最適条件に関する基礎データを得る事ができた。

<引用文献>

Nam JM, Chung Y, Hsu HC, Park CC : 1 integrin targeting to enhance radiation therapy. *Int J Radiat Biol*, 85, 2009, 923-928.
Park CC, Zhang H, Pallavicini M, Gray JW, Baehner F, Park CJ, Bissell MJ : Beta1 integrin inhibitory antibody induces apoptosis of breast cancer cells, inhibits growth, and distinguishes malignant from normal phenotype in three dimensional cultures and in vivo. *Cancer Res*, 1;66(3), 2006, 1526-35.
Nam JM, Onodera Y, Bissell MJ, Park CC. Breast cancer cells in three-dimensional culture display an enhanced radioresponse after coordinate targeting of integrin alpha5beta1 and fibronectin. *70(13)*, 2010, 5238-48.
Lee GY, Kenny PA, Lee EH, Bissell MJ: Three-dimensional culture models of normal and malignant breast epithelial cells. *Nat Methods*. 4(4), 2007, 359-65.

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)

Maeda K, Yasui H, Matsuura T, Yamamori T, Suzuki M, Nagane M, Nam JM, Inanami O, Shirato H: Evaluation of the relative biological effectiveness of spot-scanning proton irradiation in vitro. *J Radiat Res*. 2016, in press, 査読有
Onodera Y, Nam JM, Bissell MJ: Increased sugar uptake promotes oncogenesis via EPAC/RAP1 and O-GlcNAc pathways. *J Clin Invest*. 2014 Jan;124(1):367-84., 査読有, doi: 10.1172/JCI63146.
Nam JM, Ahmed KM, Costes S, Zhang H, Onodera Y, Olshen AB, Hatanaka KC, Kinoshita R, Ishikawa M, Sabe H, Shirato H, Park CC: 1-Integrin via NF- B signaling is essential for acquisition of invasiveness in a model of radiation treated in situ breast cancer. *Breast Cancer Res*. 2013;15(4):R60., 査読有,
Kinoshita R, Nam JM, Ito YM, Hatanaka KC, Hashimoto A, Handa H, Otsuka Y, Hashimoto S, Onodera Y, Hosoda M, Onodera S, Shimizu S, Tanaka S,

Shirato H, Tanino M, Sabe H: Co-overexpression of GEP100 and AMAP1 proteins correlates with rapid local recurrence after breast conservative therapy. *PLoS One*. 2013 Oct 7;8(10):e76791., 査読有, doi: 10.1371/journal.pone.0076791.

[学会発表](計 7件)

Nam JM: Targeting integrin signaling to improve the efficacy of radiation treatment on breast cancer cells, The 3rd GI-CoRE Medical Science and Engineering Symposium, 2016年3月3日~4日、Hokkaido University (Sapporo)

南ジンミン、小野寺康仁、佐邊壽孝、白土博樹: 放射線照射後の乳腺上皮細胞の3次元構造維持に関わる分子機序の解析、2015年10月8日~10日、第74回日本癌学会学術総会、2015年10月8日~10日、名古屋国際会議場(名古屋)

南ジンミン、小野寺康仁、佐邊壽孝、白土博樹: 乳癌における放射線照射後の浸潤能獲得過程に関わる分子機序の解析、第73回日本癌学会学術総会、2014年9月25日~27日、パシフィコ横浜(横浜)

南ジンミン、小野寺康仁、石川正純、佐邊壽孝、白土博樹: 放射線照射後の乳癌再発に関わるシグナルの解析、第72回日本癌学会学術総会、2013年10月3日~5日、パシフィコ横浜(横浜)

Nam JM, Onodera Y, Sabe H, Shirato H: Possible mechanisms of non-invasive to invasive phenotypic conversion of breast cancer cells upon radiation., The 11th International Symposium for Future Drug Discovery and Medical Care, 2013年8月1日~2日, Hokkaido University (Sapporo)

6. 研究組織

(1)研究代表者

Nam Jin-Min (NAM, JINMIN)

北海道大学・国際連携研究教育局・助教
研究者番号: 60414132

(2)研究分担者

なし

(3)連携研究者

なし

(4)研究協力者

小野寺 康仁 (ONODERA, YASUHIITO)

北海道大学・大学院医学研究科・講師
研究者番号: 90435561