

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 8 月 3 日現在

機関番号：22101

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2013～2016

課題番号：25870586

研究課題名(和文)がん細胞の原発巣と転移巣での性質の違いに関する研究

研究課題名(英文)A study on the difference in properties between primary tumor cells and metastatic tumor cells

研究代表者

藤井 義大(fujii, yoshihiro)

茨城県立医療大学・保健医療学部・助教

研究者番号：20637540

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,400,000円

研究成果の概要(和文)：本研究では、がんの原発巣と転移巣の放射線と薬剤による治療効果を比較することにより、それぞれについて最適な治療法を検討することを目的とした。がんの原発巣と転移巣とで、放射線感受性、薬剤感受性、遊走能・浸潤能を比較した結果、X線と重粒子線である炭素線において感受性の差を観察することはできなかった。また、数種の抗がん作用のある薬剤においては、転移巣に対してシスプラチンでのみ効果が高いことが分かった。遊走・浸潤能に関しても、2つのがん巣において差は見られなかった。

研究成果の概要(英文)：In this study, we aimed to examine the optimal treatment method for each tumor cells by comparing the treatment effect of radiation and drugs of primary tumor cells and metastatic tumor cells.

As a result of comparing radiation susceptibility, drug sensitivity, migration ability and invasion ability between primary tumor cells and metastatic tumor cells, we could not observe the difference in sensitivity between X-rays and carbon ions which is heavy ions. In addition, it was found that for some drugs with anticancer effect, the effect was high only with cisplatin relative to metastatic tumor cells. There was no difference in migration / invasion ability between the two tumor cells.

研究分野：放射線生物学・放射線腫瘍学

キーワード：がん原発巣・転移巣 放射線・薬剤感受性 遊走能・浸潤能

1. 研究開始当初の背景

分子標的薬の開発、IMRT などの照射方法の改良や粒子線などの様々な治療法の開発やその改良により、がんの治療成績は向上してきたが、未だにがんが死亡原因の第1位であり、その治療は困難なことが非常に多い。その1番の理由として、浸潤・転移の問題がある。前述の理由により、がんの局所制御率は改善されてきたが、転移の制御は未だに困難である。転移を制御もしくは転移巣の治療成績の向上を実現することができれば、がんによる死亡率は飛躍的に下がると考えられる。がんの転移に関しては、これまでも多く研究とその報告がなされている。例えば、転移に関わる EMT や MET などの浸潤に関わる細胞・組織形態に関わる現象とそれらに関わる E-cadherin や MMP などの特異的な様々な分子(遺伝子)の発現とその分子機構、血管新生との関係、原発巣による転移巣へのニッチの形成誘導などが挙げられる。最近では、がん治療において注目され始めたがん幹細胞と転移との関係性に関する研究も行われ始めている。それらの中で、原発巣と転移巣での遺伝子・タンパク発現や機能の比較を行い、それらに差異が観察されたという報告も多くなされている。遺伝子・タンパク発現やその機能が違えば、その細胞の性質も変化する可能性があると考えられる。本研究では、細胞に生じた原発巣と転移巣の遺伝子・タンパク発現や機能の差異によって生じる放射線と抗がん剤に対する感受性の違いとその原因を追究したいと考えている。

2. 研究の目的

がん治療において、転移の発生率をいかに制御するか、もしくは転移巣をいかに効率的に治療するかが重要な課題となっている。本研究は、原発巣と転移巣とのがん細胞の放射線と抗がん剤に対する性質を比較することにより、その特質を理解し、より効果的ながんの治療法の提案を目的とする。

3. 研究の方法

マウスの転移性メラノーマ細胞をマウスへ移植し、腫瘍を作らせる。肺転移後に転移巣と原発巣のがん細胞を取り出す。それらの細胞と移植する前の細胞を使用して、放射線(粒子線, X線)感受性、薬剤感受性、浸潤能などを比較し、それぞれの段階における細胞の性質の違いを調べる。また、粒子線やX線を照射して同様の実験を行い、非照射の場合と比較してその違いを調べる。

4. 研究成果

(1) 放射線感受性試験

放射線に対する感受性をコロニー形成法に

より求め、細胞生存率曲線を作成した。主に、通常の放射線治療に使用されるX線においても、重粒子線治療に用いられている炭素線においても原発巣と転移巣で感受性の差は見られなかった(図1, 2)。

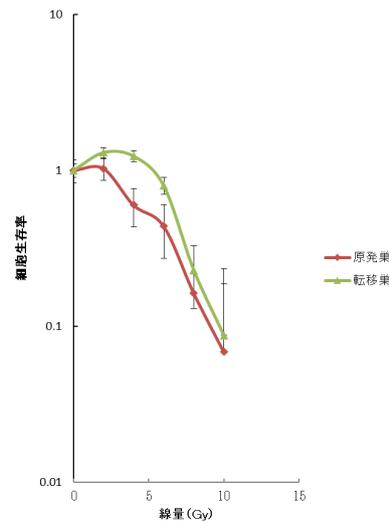


図1：細胞生存率曲線(X線)

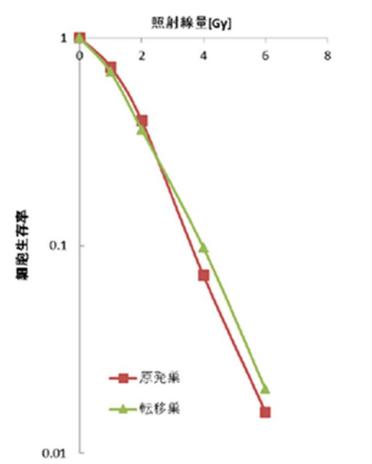


図2：細胞生存率曲線(炭素線)

(2) 薬剤感受性試験

コロニー形成法を用いた抗がん剤感受性の解析を行った。

B16BL6細胞にシスプラチン,カルボプラチン,オキサリプラチン,マイトマイシンCを投与し,それぞれに対しコロニー形成法を行い,細胞生存率曲線を作成した。

シスプラチン,カルボプラチン,オキサリプラチン,マイトマイシンC投与によるB16BL6細胞の細胞生存率曲線を図3,4,5,6にそれぞれ示した。

図3より,シスプラチン投与による細胞生存率は,原発巣より転移巣で低い値となり,転

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19、CK - 19 (共通)

移巢の細胞でシスプラチンに対する抗がん剤感受性が高かった。
 図 4, 5 より, カルボプラチンとオキサリプラチンの両方の薬剤で原発巣, 転移巣での抗がん剤感受性の違いは見られなかった。
 マイトマイシンC 投与による細胞生存率は原発巣と比べると, 転移巣で若干低い値をとったが, 有意差は無かった(図 6)。

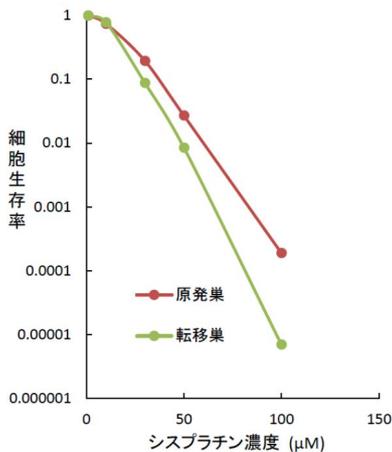


図 3 : 細胞生存率曲線 (シスプラチン)

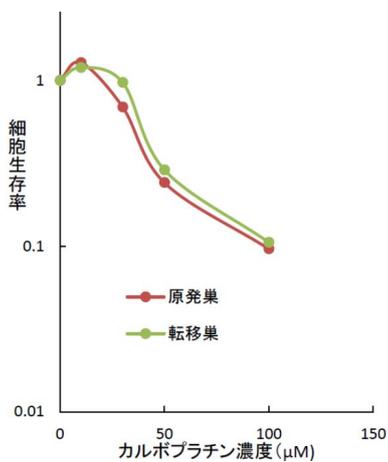


図 4 : 細胞生存率曲線 (カルボプラチン)

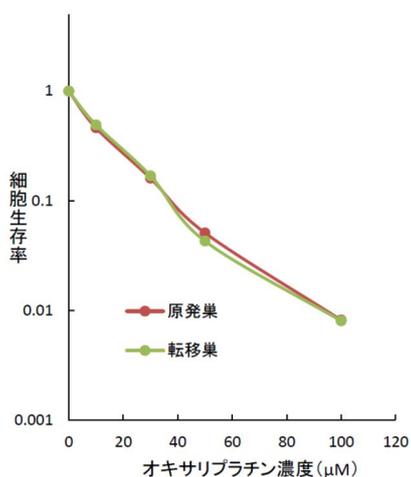


図 5 : 細胞生存率曲線 (オキサリプラチン)

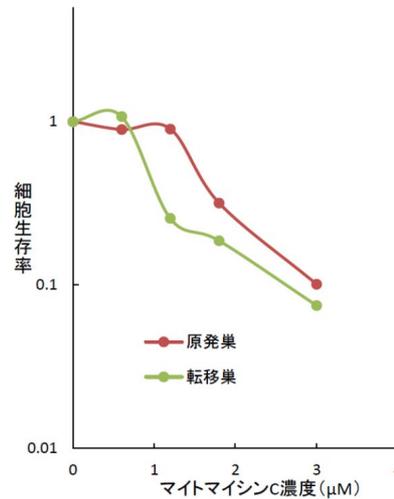


図 6 : 細胞生存率曲線 (マイトマイシン C)

(3) 遊走・浸潤能の検証

ポイデンチャンパー法(図 7)により, 遊走・浸潤能を求めた。
 遊走能(図 8)・浸潤能(図 9)とともに原発巣と転移巣とに違いは見られなかった。

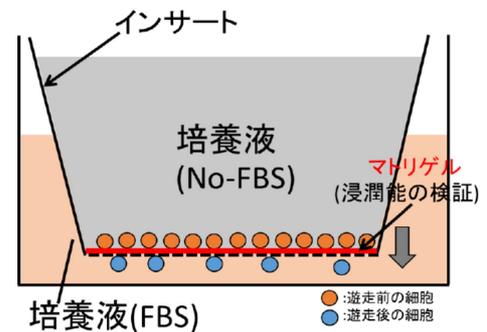


図 7 : ポイデンチャンパー法

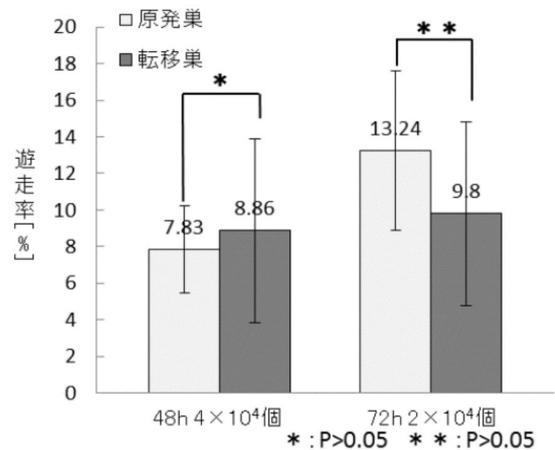


図 8 : 原発巣細胞および転移巣細胞の遊走率

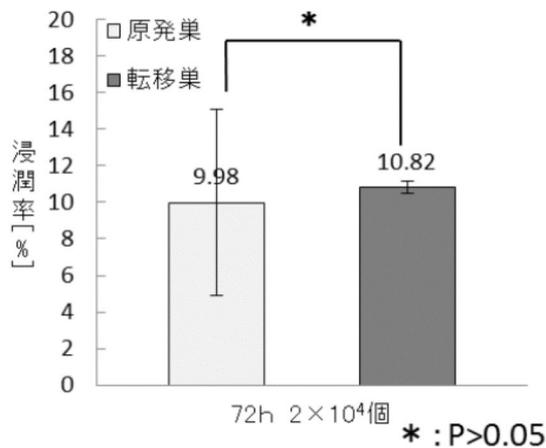


図9：原発巣細胞および転移巣細胞の浸潤率

本研究では、がんの原発巣と転移巣において、各種の放射線・薬剤感受性と遊走・浸潤能を比較した結果を得ることができた。シスプラチンにおいてのみ転移巣が原発巣よりも感受性が高いことが観察できた。よって、転移巣のがんの治療において、シスプラチンが有効であることが示唆された。

今回の研究では、シスプラチン以外に差異を見出すことができなかったが、今後、他の放射線や薬剤、またはその組み合わせによって治療効果に差が出る可能性は十分にある。また、原発巣に対する治療法が転移巣に対しても同等に有効であることも示唆された。

5. 主な発表論文等

[雑誌論文]

1 Maeda J, Cartwright IM, Haskins JS, Fujii Y, Fujisawa H, Hirakawa H, Uesaka M, Kitamura H, Fujimori A, Thamm DH6, Kato TA

Relative biological effectiveness in canine osteosarcoma cells irradiated with accelerated charged particles.

Oncol Lett. 2016 Aug;12(2):1597-1601.

Epub 2016 Jun 30. (査読あり)

2 Maeda J, Fujii Y, Fujisawa H, Hirakawa H, Cartwright IM, Uesaka M, Kitamura H, Fujimori A, Kato TA.

Hyperthermia-induced

radiosensitization in CHO wild-type, NHEJ repair mutant and HR repair mutant following proton and carbon-ion exposure.

Oncol Lett. 2015 Nov;10(5):2828-2834.

Epub 2015 Sep 21. (査読あり)

3 Maeda J, Yurkon CR, Fujii Y, Fujisawa H, Kato S, Brents CA, Uesaka M, Fujimori A, Kitamura H, Kato TA.

Solution Radioactivated by Hadron Radiation Can Increase Sister Chromatid Exchanges.

PLoS One. 2015 Dec 14;10(12):e0144619.

doi: 10.1371/journal.pone.0144619.

eCollection 2015. (査読あり)

4 Cartwright IM, Bell JJ, Maeda J, Genet MD, Romero A, Fujii Y, Fujimori A, Kitamura H, Kamada T, Chen DJ, Kato TA.

Effects of targeted phosphorylation site mutations in the DNA-PKcs phosphorylation domain on low and high LET radiation sensitivity.

Oncol Lett. 2015 Apr;9(4):1621-1627.

Epub 2015 Feb 17. (査読あり)

5 Maeda J, Bell JJ, Genet SC, Fujii Y, Genet MD, Brents CA, Genik PC, Kato TA.

Potentially lethal damage repair in drug arrested G2-phase cells after radiation exposure.

Radiat Res. 2014 Oct;182(4):448-57.

(査読あり)

6 Ohnishi K, Tani T, Bando S, Kubota N, Fujii Y, Hatano O, Harada H

Plastic induction of CD133AC133-positive cells in the microenvironment of glioblastoma spheroid.

International Journal of Oncology, 45, 581-586, 2014.

(査読あり)

7 Segawa T, Fujii Y, Tanaka A, Bando S, Okayasu R, Ohnishi K, Kubota N.

Radiosensitization of human lung cancer cells by the novel purine-scaffold Hsp90 inhibitor, PU-H71.

Int J Mol Med. 2014 Mar;33(3):559-64.

(査読あり)

- 8 Fujii Y, Yurkon CR, Maeda J, Genet SC, Kubota N, Fujimori A, Mori T, Maruo K, Kato TA.

Comparative study of radioresistance between feline cells and human cells. Radiat Res. 2013 Jul;180(1):70-7.

(査読あり)

- 9 Fujii Y, Genet MD, Roybal EJ, Kubota N, Okayasu R, Miyagawa K, Fujimori A, Kato TA.

Comparison of the bromodeoxyuridine-mediated sensitization effects between low-LET and high-LET ionizing radiation on DNA double-strand breaks.

Oncol Rep. 2013 Jun;29(6):2133-9.

(査読あり)

- 10 Fujii Y, Yurkon CR, Maeda J, Genet SC, Okayasu R, Kitamura H, Fujimori A, Kato TA.

Influence of track directions on the biological consequences in cells irradiated with high LET heavy ions.

Int J Radiat Biol. 2013 Jun;89(6):401-10. (査読あり)

- 11 Genet SC, Fujii Y, Maeda J, Kaneko M, Genet MD, Miyagawa K, Kato TA.

Hyperthermia inhibits homologous recombination repair and sensitizes cells to ionizing radiation in a time- and temperature-dependent manner.

J Cell Physiol. 2013 Jul;228(7):1473-81. (査読あり)

[学会発表]

- 1 Yoshihiro Fujii

The relevance of CD133 to radioresistance, migration and

invasion ability in clinically relevant radioresistant cell」

- 62nd RADIATION RESEARCH SOCIETY (RRS) Hilton Waikoloa Village Oct,2016

- 2 Yoshihiro Fujii

CD133陽性CRR細胞の放射線抵抗性の要因と遊走・浸潤能との関連性

第75回日本癌学会 横浜 2016 10月

- 3 Yoshihiro Fujii, Charles R. Yurkon, Junko Maeda, Stefan C. Genet, Nobuo Kubota, Akira

Fujimori, Takashi, Mori, Kohji Maruod and Takamitsu A. Kato

Comparative Study of Radioresistance between Feline Cells and Human

15th International Congress of Radiation Research (Kyoto)May, 2015.

- 4 Ken Ohnishi, Toshiaki Tani, Shin-ichi Bando, Yoshihiro Fujii, Osamu Hatano, Nobuo Kubota

CD133-positive cells emerging in hypoxic microenvironment in glioblastoma spheroids show resistance to X-rays and CDDP.

15th International Congress of Radiation Research (Kyoto)May, 2015.

- 5 大西 健、谷俊明、坂東真一、藤井義大 神経膠芽腫スフェロイドに出現するCD133陽性細胞の温熱感受性.

日本ハイパーサーミア学会第33回大会 (大阪) 2015年9月

- 6 大西 健、坂東真一、藤井義大 がん幹細胞マーカーCD133の過剰発現が神経膠芽腫細胞の放射線感受性及び遊走能/腫瘍形成能に及ぼす影響.

第74回日本癌学会学術総会(名古屋) 2015年10月

- 7 大西 健、坂東真一、藤井義大

- 神経膠芽腫細胞の CD133 発現に関わる微小環境.
第 18 回癌治療増感研究シンポジウム(奈良) 2016 年 2 月
- 8 大西 健, 谷 俊明, 坂東真一, 秦野修, 藤井義大, 窪田宜夫
神経膠芽腫スフェロイドの低酸素領域に出現する CD133 陽性細胞は放射線/抗がん剤抵抗性を示す.
第 73 回日本癌学会学術総会(横浜) 2014 年 9 月
- 9 大西 健, 谷 俊明, 坂東真一, 藤井義大, 窪田宜夫, 秦野 修
グリオブラストーマスフェロイドの低酸素微小環境に出現する CD133 陽性細胞は放射線及び CDDP 抵抗性を示す.
日本放射線影響学会第 56 回大会(鹿児島) 2014 年 10 月
- 10 坂東真一, 谷 俊明, 藤井義大, 大西健
CD133 過剰発現が神経膠芽腫細胞の表現型に及ぼす影響.
第 17 回癌治療増感研究シンポジウム(奈良) 2015 年 2 月
- 11 藤井義大, 坂東真一, 窪田宜夫, 鈴木正敏, 桑原義和, 福本学, 大西 健
ヒト肝癌由来細胞株 HepG2 細胞由来である CD133 陽性 HepG2-8960R 細胞の放射線抵抗性の要因と遊走・浸潤能との関係性.
第 17 回癌治療増感研究シンポジウム(奈良) 2015 年 2 月
- 12 Yoshihiro Fujii, Charles R. Yurkon, Junko Maeda, Stefan C. Genet, Nobuo Kubota, Akira Fujimori, Takashi Mori, Kohji Maruo and Takamitsu A. Kato.
Comparative Study of Radioresistance between Feline Cells and Human Cells.
第 56 回日本放射線影響学会(青森) 2012 年 10 月
- 13 藤井義大, 坂東真一, 大西健, 加藤宝光
ヒト由来細胞とネコ由来細胞の放射線感受性の違い
茨城大学理学部 公開シンポジウム 第 7 回 Quantum Medicine 研究会(水戸) 2014 年 3 月
- 14 大西健, 谷俊明, 坂東真一, 藤井義大, 窪田宜夫, 秦野修
神経膠芽腫細胞 T98G の単層培養 スフェロイド培養間で見られる CD133 陽性細胞の可塑的な誘導.
日本放射線影響学会第 56 回大会(青森) 2013 年 10 月
- 15 大西健, 谷俊明, 坂東真一, 秦野修, 藤井義大, 窪田宜夫
グリオブラストーマスフェロイド内低酸素微小環境と CD133 陽性細胞の誘導.
第 72 回日本癌学会学術総会(横浜) 2013 年 10 月
- 16 大西健, 谷俊明, 坂東真一, 藤井義大, 窪田宜夫, 秦野修
スフェロイドに出現する CD133 陽性細胞の放射線感受性.
第 16 回癌治療増感研究シンポジウム(奈良) 2014 年 2 月

[図書]

- 1 藤井義大
松本義久編 人体のメカニズムから学ぶ放射線生物学 メディカルビュー社 2016 ; 114-122、129-138.
2 藤井義大
窪田宜夫編 新版 放射線生物学 医療科学社 2015 ; 23-32.

6 . 研究組織

(1)研究代表者

藤井 義大 (FUJII Yoshihiro)

茨城県立医療大学・保健医療学部・放射線技術科学科・助教

研究者番号 : 20637540