

機関番号：10101

研究種目：基盤研究（B）

研究期間：2008～2010

課題番号：20390319

研究課題名（和文）放射線照射を生き延びた癌細胞に秘められた謎：癌根絶への多角的アプローチ

研究課題名（英文）The secret of radiation-surviving cell: multidisciplinary approach to eradicate cancer

研究代表者

西岡 健 (NISHIOKA TAKESHI)

北海道大学・大学院保健科学研究院・教授

研究者番号：80271659

研究成果の概要（和文）：放射線後生き残った細胞（以下 IR とをす）の遺伝子発現を cDNA アレイにより調べた。マウス線維肉腫細胞のセルライン QRsP を使用し 10 Gy の照射を施行した。コロニーアッセイとともに 6 つのクローンの樹立が行われた。照射を生き延びた細胞では、サイクリン依存性キナーゼ阻害剤 (CKI)、p16 p57 の著明な発現低下；14.8 および 12.0 の低下、また耐性クローン (IR) をマウスに移植したところ移植比 100 % がえられた。この細胞株に CD34 がふくまれていることをかんがみると、がん幹細胞が放射線耐性に含まれていた可能性がある。

研究成果の概要（英文）：Treatment with any cytotoxic agent can trigger surviving cells in a tumor to divide faster than before. This phenomenon is widely recognized as "repopulation". To better clarify the mechanism, gene expression profiling and pathological experiments were performed. A mouse fibrosarcoma cell line, QRsP, was used. Cells were irradiated with 10 Gy. Colony assay and cloning were performed. Six clones were established. cDNA analysis was performed on the clone that showed the largest number of colonies on the 2nd 10 Gy irradiation. Mouse transplantation experiment was then carried out. cDNA analysis showed that cyclin-dependent kinase inhibitors, p16 and p57 were down-regulated; 14.8- and 12.0-fold, respectively for the tolerant clone. Matrix metalloproteinase 3 and 13 were up-regulated; 22.5- and 25.8-fold, respectively. Transplantation ratio was 100% (5/5) for the tolerant clone whereas it was 40% (2/5) for the parent. Under light microscope, the mean mitotic cell number was 4.0+/-3.9 for the parent, and 12.8+/-3.4 for the tolerant clone (p<0.01, Student's t-test). This study implies that repopulation is not a temporary reaction to irradiation. It is caused probably by "clonal" gene-expression changes, though it remains unknown whether the changes are attributable to tolerant cell selection or to gene mutation/modification.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2008 年度	9,200,000	2,760,000	11,960,000
2009 年度	2,000,000	600,000	2,600,000
2010 年度	2,000,000	600,000	2,600,000
年度			
年度			
総計	13,200,000	3,960,000	17,160,000

研究分野：内科系臨床医学

科研費の分科・細目：放射線科学

キーワード：放射線生物学

## 1. 研究開始当初の背景

研究代表者および共同研究者は平成16～17年度、また平成18～19年度科学研究費補助金の採択をうけ、癌撲滅に向け非常に重要な課題：放射線治療中にもかかわらず出現してくる癌細胞の再増殖（放射線生物学用語上のCancer Cell Repopulation）の抑制、に取り組む大きな成果を出しつつある。代表者に上記が癌治療の鍵であると想起させた背景に代表者のライフワークである頭頸部悪性腫瘍の放射線治療、における照射前後の病態が挙げられる。特に上咽頭癌(nasopharyngeal carcinoma)では大部分の症例が局所的には相当な進行例として受診するにもかかわらず、初診時の遠隔転移率は非常に低い。また放射線治療による局所制御率は高いにもかかわらず、後発遠隔転移を非常に高い頻度で認める(文献1-5)。このことは放射線治療が諸刃の剣であり、癌細胞の大部分を殺傷する能力がある一方、再増殖細胞や放射線抵抗性の細胞の出現に加味していることを示唆している。

## 2. 研究の目的

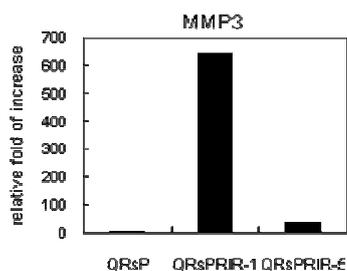
放射線照射を生き延びたがん細胞の性質をさまざまな角度から探求し、将来の有効な治療法への基礎データを与える。

## 3. 研究の方法

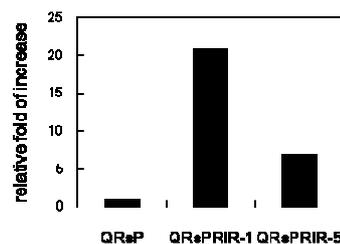
マウス線維肉腫細胞、QRsP を使用しこれに10 Gy 照射した。コロニーアッセイを行うとともに6つの独立クローンを作成した。cDNAの解析を、親株との比較とし施行した。引き続きマウス移植実験を施行した。

## 4. 研究成果

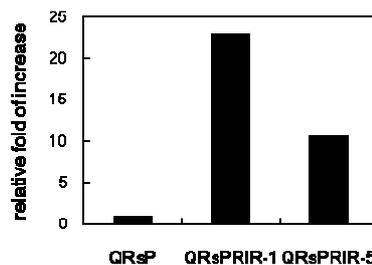
照射残存株ではmetalloproteinase 13 (Mmp13)のmRNA が発現が25.8倍の発現 serum amyloid A 3 (Saa3)が24.8倍、Mmp3が22.5倍、Lysyl Oxidaseが4.8倍を示した。一方発現が低下した遺伝子としてp16が14.8倍、p57が12.0倍を示した。これらのデータはリアルタイム PCRによりp16をのぞき確認された。



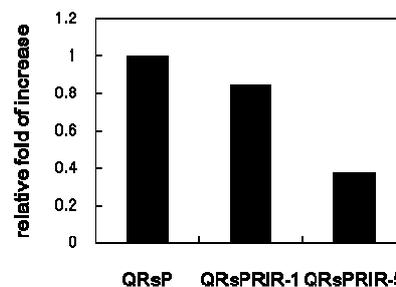
MMP13



Lysyl Oxidase



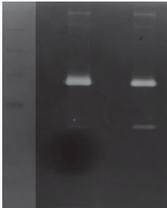
QRsP QRsPRIR-1 QRsPRIR-5



QRsP QRsPRIR-1 QRsPRIR-5

P57

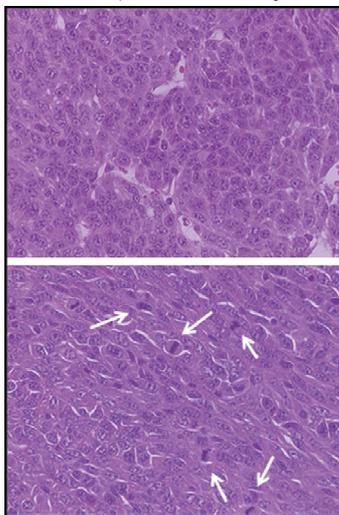
これらの結果が偶然なのか普遍的なものかを調べるためもうひと株(IR')について同様の実験を施行した。IRのUp-regulation, down regulationをトップ30遺伝子のうち、IR'のアレイデータと一致するものはup-regulationがわでは6/30、down-regulationがわでは14/30とdown側で割合が高かった。おそらく放射線によるDNA損傷は、遺伝子の「破壊」がそのメカニズムであることによるとおもわれる。モンテカルロシミュレーションによる遺伝子損傷の分布は1.47μm内に集積していたため、遺伝子マップ上に今回のdown-regulationされた遺伝子を標識したところ、計算値にあう分布がえられた。サイクリン依存性キナーゼ阻害剤(CDKIs)、p16とp57はQRsPRIR-1においてとくにdown-regulationされていることは非常に興味深い。CDKIsは細胞周期を抑制するキーとなる分子であり、実際5分間隔での位相差顕微鏡下での倍加時間を測定したところIRの倍加時間は有為に短かった。



Right lane: IR (upper MMP9, lower MMP13 corresponding to each molecular weight)  
Transplant Experiment



上記写真でしめすように Parent Cell では 2/5 の移植率であったものが IR-Cell では 100%の生着をしめた。

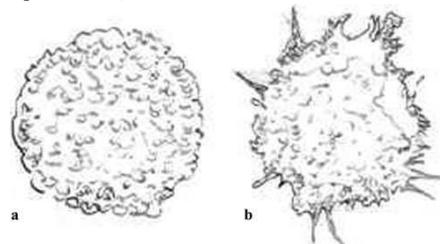


分裂像：核膜が消失し染色糸が現れている。組織像をHE染色で顕微鏡観察したところ有為な差をもってIRに分裂像がおおくみられた。IR-1を移植された5つのマウスのうち2つの腫瘍は周囲組織への浸潤を示したが IR' は浸潤をしめさなかった。(上図:  $p < 0.01$ , Student- T テスト)。このことはIRにおいて matrix metalloproteinaseがup-regulation していたことと関連があると推される。IRではいくつか細胞周期関連遺伝子 サイク

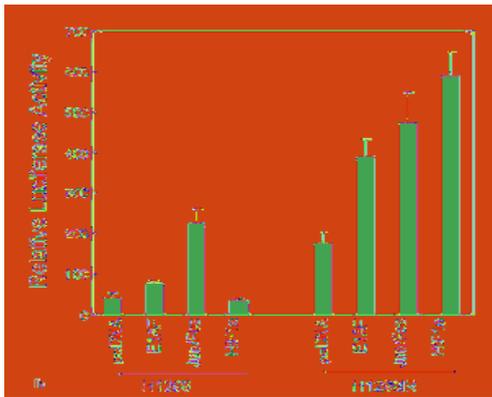
リンA サイクリンB、PCNA、血管新生関連遺伝子である T ボックス トランスクリプシオン因子、またPDGF もup-regulateされており、これらも移植におけるIR細胞の生着率、Parentに比べ腫瘍サイズが大きいことに関連している可能性がある。

#### Hypoxic-inducible factor-1 $\alpha$

放射線照射後のRNA およびタンパク質発現については我々のしるかぎり急性期つまり数時間後または数日以内の反応しかしられていない。もちろん、細胞照射直後の細胞の応答を理解することは重要だが大線量を与え場合ほとんどの細胞は死滅するため (10Gyは現在早期肺がんのために使用されている)生き残った細胞の性質を調べることがより重要と考えられる。我々は 肺がん細胞株H1299 に10 Gyを照射し生存細胞株H1299-IR を樹立し浸潤性をコラーゲン オーバーレイ分析を行った。この実験では、コラーゲン中の95 の H1299由来コロニー と 116 の H1299-IR を観察した。その結果図にしめすようにIR由来コロニーの75%がスパイク状の突起を示したのに対し、親株であるH1299ではそのような形態を示したのは全体の25%にすぎなかった ( $p < 0.05$ )。



この結果を説明するものとしてコラーゲンを融解させる酵素MMPに注目し、MMP1のルシフェラーゼアッセイを行った。背景にあるアイデアは以下のごとくである。図のごとくのコロニーサイズになると中心部は低酸素状態になりHIF1- $\alpha$ という蛋白を発現する。これに応じてMMP1がどれだけ発現するかをmRNAレベルで調べた。結果は以下のごとくIR株で親株に比較して20倍以上のmRNA発現を示し我々の仮説が実証された。



## 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4件)

1. Nishioka T, Yamazaki R. Hypoxic-inducible factor-1 $\alpha$  might up-regulate matrix metalloproteinase in subclones that survive 10-Gy X-irradiation. *Jpn J Radiol.* 2011. 29:226-7. 2011. 査読有り
2. Nishioka T, Yasuda M, Takeshima T, Haga H, Miyai Y, Shibata K, Yamazaki R, Shirato H, Teduka M, Date H. Radiation-induced cancer cell repopulation: a possible mechanism implied by experiments using transplantable mouse-derived sarcoma cell line. *Cell Struct Funct.* 2011. 36:13-20. 2010. 査読有り
3. Nishioka T, Fujino M, Homma A, Yamashita T, Sato A, Ohmori K, Obinata K, Shirato H, Notani K, Nishio M. Cesium implant for tongue carcinoma with a thickness of 1.5 cm or more: cases successfully treated with a Modified Manchester System. *Yonsei Med J.* 2010. 51:557-61. 査読有り
4. Ishihara S, Haga H, Yasuda M, Mizutani T, Kawabata K, Shirato H, Nishioka T. Integrin beta1-dependent invasive migration of irradiation-tolerant human lung adenocarcinoma cells in 3D collagen matrix. *Biochem Biophys Res.* 2010;396:651-5 査読有り

[学会発表] (計1件)

1. Takeshi Nishioka; Matrix Metalloproteinases Are Up-regulated In Sub-clones That Survived 10Gy Irradiation:

A Possible Role Of Hypoxic-inducible Factor-alpha (HIF1 $\alpha$ ) 2010 Annual meeting of American Society of Radiation Oncology Biology Physics; San Diego USA November 2, 2010.

[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]

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

西岡 健 (NISHIOKA TAKESHI )  
北海道大学・大学院保健科学研究院・教授  
研究者番号: 80271659

### (2) 研究分担者

安田元昭 (YASUDA MOTOAKI )  
北海道大学・大学院歯学研究科・准教授  
研究者番号: 90239765

芳賀 永 (HAGA HISAHI )  
北海道大学・大学院理学研究院・准教授  
研究者番号: 00292045

堤香織 (TUTSMI KAORI )  
北海道大学・大学院保健科学研究院  
研究者番号: 80344505

酒井 正春 (SAKAI MASAHARU)  
北海道大学・大学院保健科学研究院  
研究者番号: 50162269

本間明宏 (HOMMA AKINIRO)  
北海道大学・大学院医学研究科  
研究者番号: 30312359