

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 6 月 4 日現在

機関番号：18001

研究種目：基盤研究(B)

研究期間：2011～2014

課題番号：23390352

研究課題名(和文)放射線抵抗性がんの克服－放射線増感性遊走阻害剤の開発

研究課題名(英文) Increased motility of cancer cells through surface trafficking of GluR1 AMPA receptors by nitric oxide in response to ionizing radiation

研究代表者

石内 勝吾 (ISHIUCHI, Shogo)

琉球大学・医学(系)研究科(研究院)・教授

研究者番号：10312878

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 12,900,000円

研究成果の概要(和文)：放射線抵抗性を示す神経膠芽腫の克服のために、マイクロビーム照射装にて照射細胞から出るシグナルが一酸化窒素(NO)であることを同定した。1腫瘍細胞あたりの照射イオン数(1個~10個),細胞質標的または核標的に関係なく被照射細胞においてNOを検出した。NOは周囲の非照射細胞にも周囲500μm四方に伝播した。Crosslinking assayを行うと腫瘍細胞では照射により細胞質から細胞膜へのGluA1の移動(trafficking)を認めたがNOS欠損マウス由来海馬細胞では細胞膜へのGluA1の移動変化が無かったことから、このGluA1の細胞膜への移動は一酸化窒素が誘導したものと結論した。

研究成果の概要(英文)：Cells response to various exogenous stimuli, and can propagate signals by several pathways. Here we show that nitric oxide (NO) is produced in response to ionizing radiation and fulfils a broad spectrum of signaling for pathophysiological process of invasive growth in brain cancers. NO mediates a stimulatory sign that leads to tumor cells outside irradiated field. High linear energy transfer charged particle (LET) as well as X-ray radiation stimulated NO production in cancer cells and the increased mobility through facilitation of surface trafficking of GluR1, a subunit of AMPA-type glutamate receptor (AMPA), via cGMP-dependent signal transduction and activation of intracellular calcium signaling. Blockage of AMPAR by antagonists or knockdown of GluR1 reduced NO production and propagation, and can regulate this invasive growth.

研究分野：脳神経外科学

キーワード：神経膠芽腫 浸潤性増殖 放射線抵抗性 重粒子線 遊走阻害剤

1. 研究開始当初の背景

放射線は固形がんの治療において、重要な治療手段であるが、臨床的には、照射野内外での腫瘍の再発がしばしば認められる。原因としては、照射前にすでに微小転移巣が存在しているという考え、あるいは照射野・照射線量が不適切で十分な効果が得られていないなどと説明されてきた。臨床の現場において、高線量照射を広範囲に行えば、脳壊死を引き起こす可能性が高まり、一方線量を低く抑えれば、照射野内の局所再発が必須である。最近では、腫瘍塊には 90Gy 相当の照射を施行し、周囲浸潤部位に 60Gy、周囲脳に 40-50Gy と重み付け可能な強度変調照射法をトモセラピーなどの新しい治療装置を用いたり、従来のライナックによる外照射にガンナイフやサイバーナイフを組み合わせるなどの工夫がなされている。とりわけ悪性度の高い神経膠芽腫については、様々な試みが施行されているが、長期の生存期間を得るまでには至っていない。このように、がんの放射線抵抗性の問題は、照射野や照射量あるいは重粒子線などの新しい線種の選択や治療装置の改善などで解決策を見出そうとしてきたが現在まで浸潤性増殖の克服に至っていない。

2. 研究の目的

以上の背景を踏まえて、本研究の目的は、照射により変動あるいは活性化する遺伝子や伝達路を解明し、浸潤性増殖機構の不活化を誘導することで放射線抵抗性の解決点を探索し臨床応用可能な新規治療薬を開発することにある。

3. 研究の方法

研究課題は

- (1) 照射による遺伝子変化・シグナル伝達路の変化
- (2) 細胞分裂及び周期に与える影響
- (3) 細胞遊走亢進の分子機構・バイスタンダー効果の解析の3項目である。

これ等の課題を独自に開発した疾患モデルを用いて主に培養系で解析する。バイスタンダー効果の解析にはマイクロビーム照射(群馬大学重粒子センターおよび日本原子力開発機構高崎量子応用研究所との研究協力による)を用いた。脳内移植モデルによる解析、術前照射を施行された臨床検体での病理学的解析、および遺伝子改変動物(一酸化窒素合成酵素完全欠損型マウス)を用いた解析を施行した。これはバイスタンダー効果のシグナルとして一酸化窒素を想定しているためである。

4. 研究成果

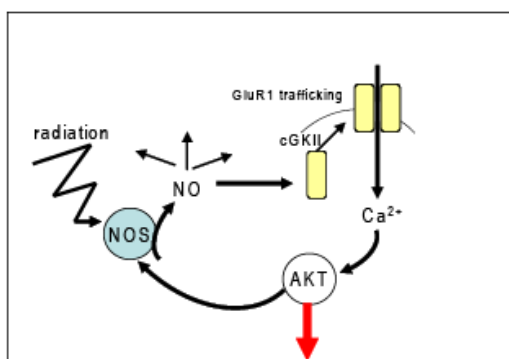
照射による腫瘍細胞の遺伝子変化を Affymetrix社のジーンチップにて解析し

Venn diagramにて偽処理細胞に対するX線、炭素線照射細胞の遺伝子発現解析を施行した。その結果、X線および炭素線の遺伝子変化は同方向に有意に変化し、例えばX線について増加したものは炭素線についても増加した。X線により有意に増加し炭素線により有意に減少した遺伝子は見出されず、X線により有意に減少し炭素線により有意に増加したものは1つのみであった。

日本原子力機構高崎量子応用研究所に設置してあるマイクロビーム照射装置を用いて照射細胞から出るシグナルの同定とシグナル伝達の仕組みを解析した。臨床検体から樹立したグリオーマ細胞株を用いてマイクロビーム照射装置にて被照射細胞と非照射細胞を厳密に区別し照射細胞から出るシグナルを検出し、そのシグナルの範囲や時間経過を追った。最初に培養皿の空打ち実験を行い、シグナルが出ないことを確認した。次いで、シグナルの検出にはNO検出薬であるDiaminofluorescein-2Diacetate(DAF-2 DA)は生細胞の状態で使用可能で、同時にMitotrackerによる染色により背景細胞を描出した。単層培養にて細胞1個に細胞質と核を分けて照射実験を施行した。1腫瘍細胞あたりの照射イオン数(1個~10個)、細胞質標的または核標的に関係なく被照射細胞でNOを検出した。NOは周囲の非照射細胞にも検出されそのシグナルは照射直後から48時間以降まで拡散し、被照射細胞を中心に周囲500 μ m四方に最終的に伝播が確認された。Aggregate culture法にて細胞集塊を炭素線量10Gy(炭素線イオン1万5千発)直径250 μ mのコリメターを用いて腫瘍塊を厳密に照射すると、照射直後よりcontrol群の非照射細胞の3倍の30 μ m/hの速度で腫瘍細胞は遊走亢進を示した。同一dish内のコリメター外の非照射細胞でも同様に遊走亢進したことからNOが遊走亢進の分子機序に關与する可能性が強く示唆された。実際NO中和剤20 μ M cPTIOを前処理すると遊走亢進現象は完全に制御された。このことは神経膠芽腫の放射線抵抗性の機序解明にNO-cGKII-GluA1-Akt signalingの活性化が重要であるとする我々の仮説のうちNOの關与を支持するものである。ついで腫瘍細胞およびNO合成酵素(NOS)系完全欠損動物(triple nNOS/iNOS/eNOS-KOマウス)を用いて、BS3による細胞質および細胞膜GluA1に分けて同定できるCrosslinking assayを行い放射線介入によるGluA1受容体の動態解析を施行した。動物モデルでは海馬を対象としてBS3処理後にウエスタンブロッティングを施行した。その結果、腫瘍細胞では照射により細胞質から細胞膜への移動を認め、被照射細胞では非照射細胞の2倍の細胞膜

GluA1 が検出された。さらに細胞質と細胞膜 GluA1 の分布比では非照射細胞が 50:50 であるのに対して被照射細胞 25:75 と GluA1 の局在の変化を来たした。この変化は放射線処理した細胞群でも細胞膜受容体を架橋する BS3 無処理群では認められなかった事、また NOS 欠損マウス由来海馬細胞では放射線介入による細胞膜への GluA1 の移動変化が無かったことから、一酸化窒素が誘導したものと結論した。ヒト臨床検体を用いた解析でも手術に先行して放射線治療を施行した症例のうち (neoadjuvant therapy を受けた症例) 照射後 1 ヶ月以内に摘出された臨床検体 14 例を用いて iNOS, cGKII, GluA1 の同定を免疫組織学的に解析した。その結果術前照射群において iNOS の発現の有意な増強および cGkII と GluA1 との colocalization が認められた。さらに樹立した CGNH-human glioblastoma cell line による脳内移植モデルによる実験からは GluA1 の trafficking を抑制する AMPA 拮抗薬を用いることで移植細胞の浸潤性格の減衰に伴い有意な生存期間延長効果が認められたことから AMPA 拮抗薬が新規治療剤となる可能性が示唆された。

Molecular mechanism behind radiation induced invasion
-NO-cGKII-GluR1-Akt signaling-



NO; Nitric oxide
NOS; Nitric Oxide Synthase
cGKII; cyclic GMP dependent kinase II
GluR1; Glutamate Receptor 1

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 29 件)

Effect of caffeine contained in a cup of coffee on microvascular function in healthy subjects. Noguchi K, Matsuzaki T, Sakanashi M, Hamadate N, Uchida T, Kina-Tanada M, Kubota H, Nakasone J,

Sakanashi M, Ueda S, Masuzaki H, Ishiuchi S, Ohya Y, Tsutsui M.

J Pharmacol Sci. 2015 Feb;127(2):217-22.

査読有 DOI:10.1016/j.jpshs.2015.01.003

-Oryzanol Protects Pancreatic

-Cells Against Endoplasmic Reticulum

Stress in Male Mice.Kozuka C, Sunagawa S,

Ueda R, Higa M, Tanaka H, Shimizu-Okabe C,

Ishiuchi S, Takayama C, Matsushita M,

Tsutsui M, Miyazaki J, Oyadomari S,

Shimabukuro M, Masuzaki H.

Endocrinology. 2015 Apr;156(4):1242-50.

査読有 DOI:10.1210/en.2014-1748.

Progression of cerebellar chronic encapsulated expanding hematoma during

late pregnancy after gamma knife

radiosurgery for arteriovenous

malformation.Watanabe T, Nagamine H,

Ishiuchi S.Surg Neurol Int. 2014 Dec

30;5(Suppl 16):S575-9.査読有

DOI:10.4103/2152-7806.148054

Identification of a novel cell-penetrating peptide targeting human glioblastoma cell lines as a cancer-homing

transporter.Higa M, Katagiri C,

Shimizu-Okabe C, Tsumuraya T, Sunagawa M,

Nakamura M, Ishiuchi S, Takayama C, Kondo

E, Matsushita M.Biochem Biophys Res Commun.

2015 Feb 6;457(2):206-12.査読有

DOI:10.1016/j.bbrc.2014.12.089

Development of an experimentally useful model of acute myocardial infarction: 2/3

nephrectomized triple nitric oxide

synthases-deficient mouse.

Uchida T, Furuno Y, Tanimoto A, Toyohira

Y, Arakaki K, Kina-Tanada M, Kubota H,

Sakanashi M, Matsuzaki T, Noguchi K,

Nakasone J, Igarashi T, Ueno S, Matsushita

M, Ishiuchi S, Masuzaki H, Ohya Y,

Yanagihara N, Shimokawa H, Otsuji Y,

Tamura M, Tsutsui M. J Mol Cell Cardiol. 2014 Dec;77:29-41.

査読有 DOI:10.1016/j.yjmcc.2014.9.021

Usefulness of the apparent diffusion coefficient (ADC) for predicting the consistency of intracranial meningiomas. Yogi A, Koga T, Azama K, Higa D, Ogawa K, Watanabe T, Ishiuchi S, Murayama S.

Clin Imaging. 2014 38:802-7. 査読有

DOI:10.1016/j.clinimag.2014.06.016

Enhanced expression of proapoptotic and autophagic proteins involved in the cell death of glioblastoma induced by synthetic glycans. Faried A, Arifin MZ, Ishiuchi S, Kuwano H, Yazawa S.

J Neurosurg. 2014 120:1298-308. 査読有

DOI:10.3171/2014.1.JNS131534.

渡邊 孝, 菅原健一, 長嶺英樹, 石内勝吾; 神経膠芽腫に対する Akt を標的とした分子標的療法。琉球医学会雑誌 33 (1~3) 1~8, 2014 査読有

Watanabe T, Ohtani T, Aihara M, Ishiuchi S. Enhanced antitumor effect of YM872 and AG1296 combination treatment on human glioblastoma xenograft models. J Neurosurg 118: 838-845, 2013. 査読有

Ogawa K, Kohshi K, Ishiuchi S, Matsushita M, Yoshimi N, Murayama S. Old but new methods in radiation oncology: hyperbaric oxygen therapy. Int J Clin Oncol 18: 367-370, 2013. 査読有

Watanabe T, Ohtani T, Aihara M, Ishiuchi S. Enhanced antitumor effect of YM872 and AG1296 combination treatment on human glioblastoma xenograft models. J Neurosurg. 2013 Jan 11. April 118 838-45. 査読有

DOI:10.3171/2012.11.JNS12362.

Ito K, Yonaha H, Kai Y, Hokama Y, Nagamine

H, Miyagi T, Watanabe T, Ishiuchi S.

Hyperperfusion syndrome after stent placement for subclavian artery stenosis. Neurol Med Chir (Tokyo). 52: 902-5, 2012.

査読有

<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23269046>

akima H, Isa K, Anegawa T, Kokuba K, Nakachi K, Goya Y, Tokashiki T, Ishiuchi S, Ohya Y. Transoral carotid ultrasonography using a micro convex probe with b-flow imaging for extracranial internal carotid artery dissection. J Stroke Cerebrovasc Dis. 21: 912.e5-7, 2012. 査読有

DOI:10.1016/j.jstrokecerebrovasdis.2011.12.005.

石内勝吾 粒子線治療の脳腫瘍への臨床応用と将来展望 Japanese Journal of Neurosurgery Vol.22 no.2 2013. 査読有

https://www.jstage.jst.go.jp/article/jcns/22/2/22_117/_article/-char/ja/
Obara G, Toyohira Y, Inagaki H, Takahashi K, Horishita T, Kawasaki T, Ueno S, Tsutsui M, Sata T, Yanagihara N. Pentazocine inhibits norepinephrine transporter function by reducing its surface expression in bovine adrenal medullary cells. J Pharmacol Sci. 121 138-47 2013 査読有

DOI:10.1254/jphs.12164FP
Sasahara T, Yayama K, Matsuzaki T, Tsutsui M, Okamoto H Na(+)/H(+) exchanger inhibitor induces vasorelaxation through nitric oxide production in endothelial cells via intracellular acidification-associated Ca2(+) mobilization Vascul Pharmacol 58: 319-25, 2013. 査読有

DOI:10.1016/j.vph.2012.11.004.
Tsutsui M, Yamada T, Sugo Y, Sato T, Akazawa T, Sato N, Yamashita K, Ishihara H,

Kazama T, Takeda J. Comparison of continuous cardiac output measurement methods: non-invasive estimated CCO using pulse wave transit time and CCO using thermodilution Masui 61: 1011-7,2012 査読有

<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23012842>

Satoh N, Toyohira Y, Itoh H, Zhang H, Ueno S, Tsutsui M, Takahashi K, Yanagihara N. Stimulation of norepinephrine transporter function by fasudil, a Rho kinase inhibitor, in cultured bovine adrenal medullary cells. Naunyn Schmiedebergs 385: 921-31,2012 査読有

DOI:10.1007/s00210-012-0773-8.

Ishiuchi S. Diagnosis and treatment of cognitive deficits caused by radiation in patients with brain tumours. No Shinkei Geka 39: 1127-37,2011. 査読有

<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22128267>

Sakima H, Isa K, Anegawa T, Kokuba K, Nakachi K, Goya Y, Tokashiki T, Ishiuchi S, Ohya Y Transoral Carotid Ultrasonography Using A Micro Convex Probe with B-flow Imaging for Extracranial Internal Carotid Artery Dissection. J Stroke Cerebrovasc Dis. Jan 11,2012. 査読有

DOI:10.1016/j.strokecerebrovasdis.2011.12.005.

⑲ Ito K, Kai Y, Hyodo A, Ishiuchi S Long-term outcome of angioplasty or stent placement for stenosis of the cavernous or petrous portion of the internal carotid artery. Neurol Med Chir (Tokyo). 51: 813-8.2011. 査読有

<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22198101>

⑳ Noguchi K, Hamadate N, Matsuzaki T, Sakanashi M, Nakasone J, Uchida T, Arakaki K, Kubota H, Ishiuchi S, Masuzaki H, Sugahara K, Ohya Y, Sakanashi M, Tsutsui M. Increasing dihydrobiopterin causes dysfunction of endothelial nitric oxide synthase in rats in vivo. Am J Physiol Heart Circ Physiol. 301 : 721-9,2011 査読有

DOI:10.1152/ajpheart.01089.2010.

㉑ Ogawa K, Ishiuchi S, Inoue O, Yoshii Y, Saito A, Watanabe T, Iraha S, Toita T, Kakinohana Y, Ariga T, Kasuya G, Murayama S. Phase II Trial of Radiotherapy After Hyperbaric Oxygenation With Multiagent Chemotherapy (Procarbazine, Nimustine, and Vincristine) for High-Grade Gliomas: Long-Term Results. Int J Radiat Oncol Biol Phys 82: 732-8,2012. 査読有

DOI:10.1016/j.ijrobp.2010.12.070,

㉒ Ishiuchi S. On plasticity of the brain. No Shinkei Geka 39: 1031-2,2011 査読無

㉓ Furuno Y, Morishita T, Toyohira Y, Yamada S, Ueno S, Morisada N, Sugita K, Noguchi K, Sakanashi M, Miyata H, Tanimoto A, Sasaguri Y, Shimokawa H, Otsuji Y, Yanagihara N, Tamura M, Tsutsui M. Crucial vasculoprotective role of the whole nitric oxide synthase system in vascular lesion formation in mice: Involvement of bone marrow-derived cells. Nitric Oxide 25: 350-9.2011 査読有

DOI:10.1016/j.niox.2011.06.007

㉔ Kuboyama K, Tsuda M, Tsutsui M, Toyohara Y, Tozaki-Saitoh H, Shimokawa H,

Yanagihara N, Inoue K. Reduced spinal microglial activation and neuropathic pain after nerve injury in mice lacking all three nitric oxide synthases. Mol Pain. 7: 50, 2011 査読有

DOI:10.1186/1744-8069-7-50.

②7Noguchi K, Hamadate N, Matsuzaki T, Sakanashi M, Nakasone J, Uchida T, Arakaki K, Kubota H, Ishiuichi S, Masuzaki H, Sugahara K, Ohya Y, Sakanashi M, Tsutsui M. Increasing dihydrobiopterin causes dysfunction of endothelial nitric oxide synthase in rats in vivo. Am J Physiol Heart Circ Physiol 301: H721-9. 2011 査読有

DOI:10.1152/ajpheart.01089.2010.

〔図書〕(計2件)

石内勝吾、中山書店、脳腫瘍の治療 病理診断の治療 癌診断指針のための病理診断プラクティス脳腫瘍、2012、9

石内勝吾、総合医学社、I I 臓器別外科治療最前線 脳腫瘍 がん治療レクチャー 新しい手術のモダリティー、2011、6

〔産業財産権〕

出願状況(計1件)

名称：海馬機能の評価値算出方法、海馬機能の評価値算出システム、海馬機能の評価方法およびテストアイテムセット

発明者：石内 勝吾

権利者：同上

種類：特許

番号：特願 2014-074112

出願年月日：2014年3月31日

国内外の別：国内

取得状況(計1件)

名称：がん治療用の遊走阻害剤

発明者：石内 勝吾

権利者：同上

種類：特許

番号：特許第 5435461 号

取得年月日：2013年12月20日

国内外の別：国内

6. 研究組織

(1)研究代表者

石内 勝吾 (ISHIUCHI SHOGO)

琉球大学・大学院医学研究科・教授

研究者番号：10312878

(2)研究分担者

長嶺 秀樹 (NAGAMINE HIDEKI)

琉球大学・大学院医学研究科・助教

研究者番号：30573331

筒井 正人 (TSUTSUI MASATO)

琉球大学・大学院医学研究科・教授

研究者番号：70309962

渡邊 孝 (WATANABE TAKASHI)

琉球大学・医学部附属病院・講師

研究者番号：90573337

(3)連携研究者

吉田 由香里 (YOSHIDA YUKARI)

群馬大学・重粒子線医学センター・助教

研究者番号：90431717

都筑 馨介 (TSUZUKI KEISUKE)

文教大学・健康栄養学部管理栄養学科・教授

研究者番号：60222139