

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 6 月 29 日現在

機関番号：21601

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2011～2014

課題番号：23591844

研究課題名(和文) ヒト乳癌細胞の転移能と放射線感受性に関する研究

研究課題名(英文) A study on the metastatic potential and radiosensitivity of human breast cancer cells

研究代表者

原 孝光 (Hara, Takamitsu)

福島県立医科大学・公私立大学の部局等・准教授

研究者番号：70464542

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,200,000円

研究成果の概要(和文)：癌細胞は遺伝子変異を繰り返す事により増殖能、浸潤能、転移能を獲得していく。このような背景から原発腫瘍とそこから派生した転移腫瘍は同じ組織型であっても遺伝子発現プロファイルは異なり、放射線感受性も変化する事が推測される。そこで我々はヒト乳癌細胞株においてモデル動物を作成して臓器指向性転移細胞株を樹立し、親株と転移細胞株で放射線感受性に差が生じるか比較検討した。今回の研究で乳癌転移細胞株のモデルを樹立することができた。このモデルは臓器指向性転移および放射線感受性に変化をもたらす機序の解明に非常に有用である。

研究成果の概要(英文)：Cancer cells continue to acquire proliferative capacity, invasiveness, and metastatic potential by repeating gene mutations. For this reason, metastatic cancer tissues might have characteristics different from their original primary regions, which could affect strategies for radiotherapy. To investigate properties of metastatic cancers and their radiosensitivities, we established MDA-MB231-derived breast cancer cell lines, which were prone to cause metastasis. when transplanted into mouse.

We have successfully established three organ-oriented metastatic cell lines from a breast cancer cell line MDA-MB231. All of them possessed higher abilities in migration, invasion, and radiation resistancy than the parental cell line. Thus, these cell lines would be useful for examining mechanisms of organ-oriented metastasis and the radiosensitivity in breast cancer.

研究分野：放射線科学

キーワード：転移 遊走能 浸潤能 放射線抵抗性 動物モデル

1. 研究開始当初の背景

がん細胞はランダムに臓器に転移するのではなく、ある一定の臓器選択性をもって転移することが知られている。癌の転移機構としては原発巣から遊離したがん細胞が脈管内浸潤した後、物理的に最初にトラップされた臓器に転移巣を形成するという anatomical mechanical theory や soil となる転移先臓器の微小環境が seed の生育に適合する時のみ転移巣が形成される seed and soil theory が良く知られているが、現在では最新の研究成果より宿主の因子も重要で、原発腫瘍は転移前からすでに転移と予後不良を強く疑う遺伝子発現プロファイルを持っており、腫瘍進行の後期には転移能を獲得している事が解っている。乳癌においては 20 の予後不良遺伝子の他に、幾つかの骨転移遺伝子、肺転移遺伝子、脳転移遺伝子等がすでに解明されており、それらを発現した腫瘍細胞が臓器指向的に転移を形成する。したがって原発腫瘍細胞と転移腫瘍細胞では発現している遺伝子プロファイルが異なる為、同じ癌細胞由来であっても転移先によって放射線感受性が異なる事が予想される。

様々な腫瘍の中でも乳癌は転移を起こしやすい腫瘍の一つであり(骨 29.1%、肺 19.2%、リンパ節 19.7%、脳 2.6%)、その転移病巣に対し放射線治療が頻繁に行われている。しかし治療線量は臨床的経験により定められたもので、転移細胞の放射線感受性に関して分子生物学的に詳細に調べられたものは無い。近年は放射線治療技術の向上も著しく、より厳格な照射範囲が望まれ、腫瘍の微小浸潤、転移範囲や制御線量の決定が重要となっている。したがって本研究は親株細胞および様々な臓器への転移細胞において放射線感受性の違いを明らかにすることで、従来の放射線治療法に対し新たなエビデンスを提供するとともに新たな照射法開発の為の基礎データとなり得る。

2. 研究の目的

ヒト乳癌細胞においてモデル動物を作成して臓器指向性転移細胞株を樹立し、その転移能の状態や遺伝子発現変化と放射線感受性の関連を調べる事により、転移能という側面から放射線感受性の変化を調べる事を研究目的とする。

3. 研究の方法

(1)細胞作製:臓器指向性転移細胞を *in vivo* selection で作成するにあたり、転移細胞の判別をやすくするためにルシフェリン存在下で発光する細胞を作成した。ルシフェラーゼ遺伝子を組み込んだ pGL4.5 ベクターをリポフェクション法にてトランスフェクションした。

(2)生体内選択:ヌードマウスに腫瘍細胞移植後 20-30 日で IVIS により転移巣確認した。腹腔麻酔下においてマウスに D-Luciferin を 150mg/kg で IP し 5 分後に撮影した。発光部位から転移巣を確認し、転移巣から細

胞を回収し、G418-0.1mg/ml 200 U/ml penicillin and 200 ug/ml streptomycin で細胞を培養増殖した。

より臓器指向性転移細胞の選択性を高めるために回収した細胞を再び同じ方法で移植を行った。この作業を 3 回繰り返し、高骨転移細胞株 (NBOS0042)・高肺転移細胞株 (NLU0041)・高リンパ節転移細胞株 (NLN0104) を樹立した。

(3)増殖能の測定:12well plate に 30000 個/well ずつ細胞を播種し、24 時間ごとに経時的に (24-196 時間まで) 細胞数の変化をコールターカウンターで計測した。また、Alamerblue による代謝の変化も評価も行った。96well plate に 3000 個/well ずつ細胞を播種し、24 時間後の代謝状態を基準として 24 時間ごと経時的に (24-120 時間) Alamerblue の細胞内代謝による蛍光量の変化をマイクロプレートリーダーで計測した。測定は PBS で希釈した 10%alamerblue 液を加えてから 4 時間 37 °C でインキュベートし、excitation は 560 nm, emission は 590 nm で測定を行った。

(4)遊走能の測定:12well plate に 5x10⁵ 個/well ずつ細胞を播種し 24 時間培養した後、コンフルエントになっていることを確認し、200 μ のチップで plate の中心部の細胞を削り取りスリットを作成した。作成したスリットの幅が経時的 (4-22 時間) 狭まっていく様子を顕微鏡画像から測定した。

(5)浸潤能の測定:マトリゲルの塗布してある上段のチェンバーに細胞を 2x10⁴ 個/ml (血清無し) の濃度で 0.5ml 入れる。下段のチェンバーには 5%血清が入った RPMI1640 培養液を入れた。この状態で 22 時間インキュベートし、ゲルを通過して上段のチェンバーの膜から出てきた細胞をメタノールで固定後、クリスタルバイオレット 0.05% で染色し、数を計測した。その後、親株と転移株を比較評価した。

(6)放射線感受性の評価:コロニー形成法で評価を行った。3x10⁴ cells/3.5cm dish に播種し 2 日後に X 線を照射 (150kV 20mA 1mmAl eq SSD40cm dose rate 4Gy/min) し、1 日置いた後トリプシン処理しコロニー形成用に 6 cm dish に細胞を播種し、10-14 日培養してからメタノールで固定後、クリスタルバイオレット 0.05% で染色した。細胞数が 50 個以上のものをコロニーとしてカウントした。

(7)アポトーシスの評価:X 線照射後のアポトーシスの頻度の比較を、TUNEL 法を用いて行った。2x10⁴ cells/1.8 cm ガラスカバーに播種し 2 日後に X 線を 6 Gy 照射 (150kV 20mA 1mmAl eq SSD40cm dose rate 4Gy/min) し、24 時間ごと経時的に (24-120 時間) 細胞を氷上で 4%PFA 固定して TUNEL 法にて染色した。染色後、各サンプルを顕微鏡にて 1000 個以上の細胞をカウントし、TUNEL 陽性細胞の割合を算出して比較した。

4. 研究成果

(1) はじめに転移細胞の判別をしやすくするためにルシフェリン存在下で発光する細胞を作成した。(図1)

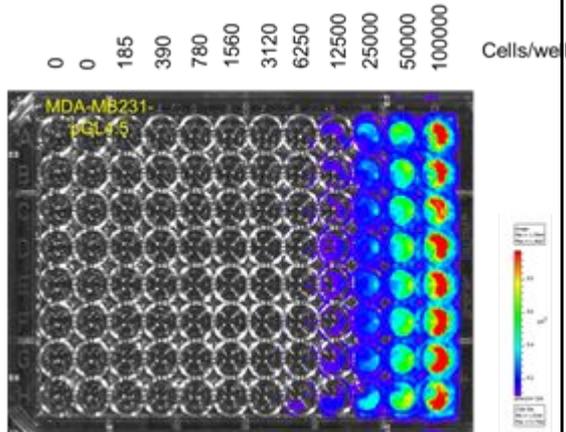


図 1

(2) (1)で作成した細胞をマウスの左心室から動脈血流に乗せて転移を作成する方法と同所性に乳腺組織の移植し転移を作成させる方法の2種類で臓器指向性転移細胞を作成した。(図2)

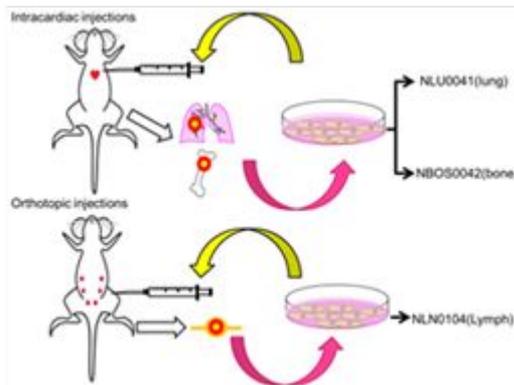


図 2：臓器指向性転移細胞の作製法

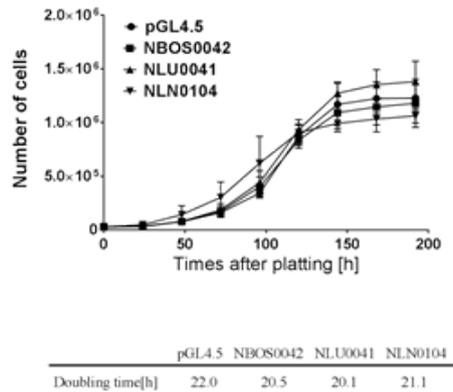
作成した細胞の臓器指向性の割合を表1に示す。表1より臓器指向性に転移する細胞株の樹立を確認する事が出来た。

	Lymph node	Lung	Bone
Parent(乳腺移植)	3/10	0/10	1/10
Parent(左心室移植)	0/10	5/10	3/10
NLN0104(リンパ節転移株)	6/6	3/6	1/6
NBOS0042(骨転移株)	—	—	6/6
NLU0041(肺転移株)	—	5/5	—

表 1：転移の頻度

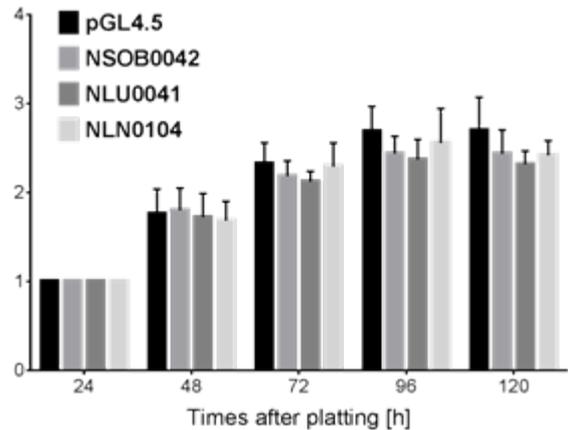
(3) 親株および転移細胞株の増殖能の変化を細胞数および代謝で評価を行った。まず細胞数による変化を図3-aに示す。

図 3-a



細胞数の評価では親株と転移細胞株で増殖能に差は認められなかった。次に alamerblue assay による代謝の評価を行った結果を図3-bに示す。

図 3-b



代謝による評価においても親株と転移細胞株において増殖能に差は見られなかった。これは細胞数による評価の結果とも一致した。以上の事から in vitro の系では親株と転移細胞株で増殖能に差が見られないことが示唆された。

(4) 細胞遊走能の評価をスクラッチアッセイで行った結果を表2に示す。

表 2

	% wounded distance filled		
	4h	8h	22h
pGL4.5	11.8±1.3	25.5±1.1	51.1±13.0
NBOS0042	26.3±2.9**	35.4±7.1*	94.8±4.9**
NLU0041	23.4±3.6**	47.9±5.7**	86.6±13.3**
NLN0104	19.4±3.6**	37.0±7.0*	88.4±12.9**

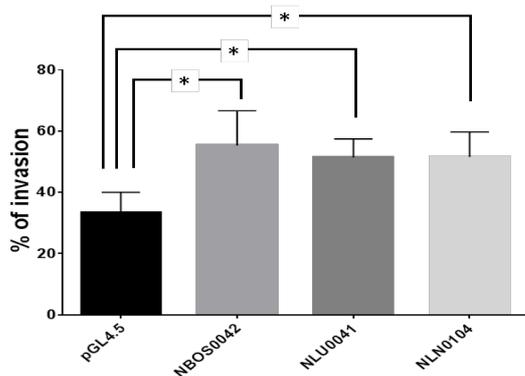
* P<0.05, **P<0.005

遊走能は測定を行ったすべての時間で親株に比べて転移細胞株の方が % wounded

distance filled の値が高く、転移細胞で有意に亢進していることが示唆された。

(5) 浸潤能の評価はマトリゲルを塗布した Boden chamber を用いて評価を行った。実験から得られた浸潤能のグラフを図 4 に示す。

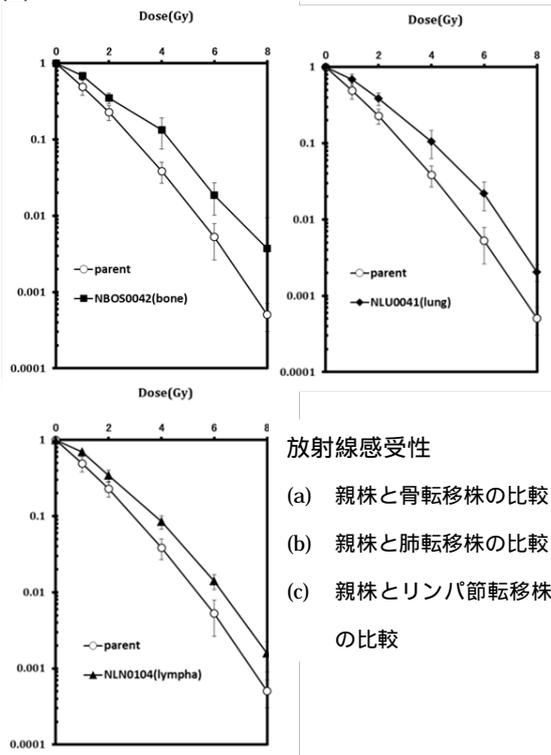
図 4



浸潤能も親株に比べて転移細胞株の方が% invasion の値が大きく、転移細胞の方が、浸潤能が有意に亢進していることが示唆された。(* <0.05)

(6) 放射線感受性の評価：親株に比べて転移細胞株の放射線感受性がどのように変化しているかの評価をコロニー形成法にて行った。結果を図 5 に示す。

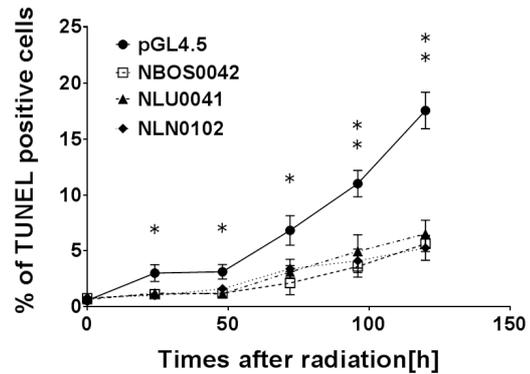
図 5



放射線感受性は親株に比べて転移細胞株の方が細胞生残率の値が高くなり、放射線に対して抵抗性になっていることが示唆された。

(7) アポトーシスの評価：X線照射後のアポトーシスの頻度の変化を TUNEL 法にて評価を行った。結果を図 6 に示す。

図 6



全ての細胞株において X 線照射後に誘導されるアポトーシスの頻度は経時的に増加していった。また測定を行った各時間におけるアポトーシスの頻度を比較すると親株に比べて転移細胞株の方が有意に低い値を示し、転移細胞株でアポトーシスの誘導が抑えられていることが示唆された。(* $P<0.05$ ** $P<0.005$)

この結果より転移細胞株が親株より放射線に対して抵抗性を示す原因の 1 つとして、転移細胞株では細胞死の 1 つの形態であるアポトーシスが抑制されることによって細胞が死にづらくなっていることが示唆された。

我々は今回の研究で乳癌転移細胞株のモデルを樹立することができた。このモデルは臓器指向性転移および放射線感受性に变化をもたらす機序の解明に非常に有用であると考える。

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 7 件)

Sakashita T, Hamada N, Kawaguchi I, Uchi NB, Hara T, Kobayashi Y, Saito K : A Framework for Analysis of Abortive Colony Size Distributions Using a Model of Branching Processes in Irradiated Normal Human Fibroblasts; PLOS ONE, 査読有, 8(7); p 1 - 11, 2013 DOI : 10.1371/journal.pone.0070291

Sakashita T, Hamada N, Kawaguchi I, Hara T, Kobayashi Y, Saito K : A branching process model for the analysis of abortive colony size distributions in carbon ion-irradiated normal human fibroblasts; Journal of Radiation Research, 査読有, 55(3); p 423 - 431 DOI:10.1093/jrr/rrr129

浜田信行、坂下哲哉、原孝光、藤通有希：ヒト正常細胞のコロニー形成実験から明らかになった新事実；放射線生物研究，査読有，49(3)：p318-331
石井士朗、宮嶋正之、佐久間光太郎、穴戸文男、原孝光、軟部武幸、島雄大介、久保均：PET/MRI 当院での使用状況；福島核医学研究会誌，査読なし，28(1)：p13-14
原孝光、島雄大介、大西貴弘、南部 武幸、石井士朗、穴戸文男、竹之下 誠一：ハイブリッド PET/MRI システムにおける減弱補正マップの検証：減弱補正用 MR 画像の信号雑音比に対する依存性，福島核医学研究会誌，査読なし，28(1)：p8-13
石井士朗、原孝光、島雄大介、南部武幸、久保均、伊藤浩、黒岩大地、関野啓史、佐藤友美、菊池賢、宮嶋正之、穴戸文男：PET/MRI 一体型装置の初期経験 臨床利用での有用性と問題点；臨床放射線，査読なし，59(8)：p1094-1101
石井士朗、穴戸文男、原孝光、島雄 大介、南部武幸、久保均、伊藤浩、石井信行：PET/MRI の有用性；臨床泌尿器科，査読なし，68(13)：p1034-1039

〔学会発表〕(計 11 件)

Hara T, Iwadate M, Shiratori S, Gonda K, Shimura T, Nakagami Y, Shibata M, Waguri S, Takenoshita : Establishment of MDA-MB231-derived breast cancer cell lines possessing a higher metastatic activity and a resistance to radiation; American Association for Cancer Research(AACR) annual meeting 2013, Washington, DC, USA, 2014.4
安藤仁、岩館学、原孝光、立花 和之進、左雨元樹、菅野英和、鈴木 聡、中村泉、大木進司、竹之下誠一：In-vivo イメージングを用いた大腸癌転移株の樹立；第 111 回日本外科学会定期学術集会(東京)，2011.5
立花和之進、岩館学、原孝光、安藤仁、左雨元樹、権田憲士、伊藤淳、渡辺久美子、安田満彦、大竹徹、竹之下誠一：網羅的遺伝子発現解析を用いた乳癌転移関連遺伝子の同定；第 111 回日本外科学会定期学術集会(東京)，2011.5
原孝光、岩館学、権田憲士、THEERALADANON Chumpol、志村龍男、柴田昌彦、和栗聡、竹之下誠一、中神佳宏：乳癌細胞における親株細胞と転移細胞の放射線感受性の比較；日本放射線影響学会第 55 回大会(仙台)，2012.9
原孝光、岩館学、志村龍男、中神佳宏、和栗聡、竹之下誠一：ヒト乳癌細胞株 MDA-MB231 細胞を用いた親株と転移株の転移能及び放射線感受性の比較；第 51 回日本放射線腫瘍学会生物部会学術大会(仙台)2013.7

坂下哲哉、浜田信行、川口勇生、大内則幸、原孝光、小林泰彦、斎藤公明：増殖不全コロニーのサイズ分布解析から見た放射線生物学の新しい視点；京大炉原子炉専門研究会(大阪)，2013.8
坂下哲哉、浜田信行、川口勇生、大内則幸、原孝光、小林泰彦、斎藤公明：増殖不全コロニーのサイズ分布解析から見た放射線生物学の新しい視点；2013.9
Hara T, Iwadate M, Gonda K, Shimura T, Shibata M, Waguri S, Takenoshita S : Establishment of MDA-MB231 cell lines possessing a high metastatic activity and a resistance to radiation; 第 72 回日本癌学会学術総会(横浜)，2013.10
Waguri S, Esaki J, Tamura H, Hara T, Hakozaki M : Comprehensive gene expression analyses of human tumors transplanted and grown in immuno-deficient mice; 第 72 回日本癌学会学術総会(横浜)，2013.10
SAKASHITA T, HAMADA N, KAWAGUCHI I, OUCHI N, HARA T, KOBAYASHI Y, SAITO K : A framework for analysis of abortive colony size distributions using a model of branching processes in irradiated normal human fibroblasts; 日本放射線影響学会 第 56 回大会(弘前)，2013.10
原孝光、岩館学、白鳥修一、権田健二、志村龍男、中神佳宏、柴田昌彦、和栗聡、竹之下誠一：ヒト乳がん細胞株 MDA-MB231 における放射線抵抗性転移株の樹立；福島県立医科大学研究連携セミナー ポスター発表会(福島)，2014.2

〔図書〕(計 0 件)

〔産業財産権〕
出願状況(計 0 件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
出願年月日：
国内外の別：

取得状況(計 0 件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
出願年月日：
取得年月日：
国内外の別：

〔その他〕
ホームページ等

6. 研究組織

(1) 研究代表者

原 孝光 (HARA TAKAMITSU)
福島県立医科大学・先端臨床研究センター・
准教授
研究者番号：70464542

(2) 研究分担者

岩館 学 (IWADATE MANABU)
福島県立医科大学・器官制御外科学講座・研
究員
研究者番号：381393

(3) 研究分担者

竹之下 誠一 (TAKENOSHITA SEIICHI)
福島県立医科大学・器官制御外科学講座・教
授
研究者番号：10167489