

科学研究費助成事業（学術研究助成基金助成金）研究成果報告書

平成25年5月27日現在

機関番号：10101

研究種目：若手研究（B）

研究期間：2011～2012

課題番号：23791375

研究課題名（和文） 間欠的低酸素曝露によるがん細胞の放射線抵抗性獲得の分子メカニズムの解明

研究課題名（英文） Investigation on the molecular mechanism of increased radioresistance in cancer cells exposed to intermittent hypoxia

研究代表者

安井 博宣（YASUI HIRONOBU）

北海道大学・大学院獣医学研究科・助教

研究者番号：10570228

研究成果の概要（和文）：

近年、その生物学的作用が注目されている間欠的低酸素について、以下の成果を得た。

1. 間欠的低酸素前処理を行うことで、腫瘍細胞の放射線抵抗性が上昇した。
2. 間欠的低酸素に曝露することで、活性酸素種 ROS の産生と低酸素誘導因子 HIF- α の発現誘導が増強され、細胞内レドックス状態の変化と低酸素適応応答シグナル経路が活性化していることが示唆された。
3. 間欠的低酸素処理によって、放射線感受性の高い S 期初期に分布する細胞数の減少と感受性の低い G2 期細胞の増加が起こっていることを明らかにした。

研究成果の概要（英文）：

In this study, I revealed the molecular mechanism of intermittent hypoxia-induced radioresistance in tumor cells as follows:

1. The preconditioning of tumor cells with intermittent hypoxia increased the radioresistance compared to normoxia and persistent hypoxia.
2. The treatment of intermittent hypoxia induced the production of reactive oxygen species and the over-expression of the hypoxia inducible factor-1 α , suggesting the involvement of cellular redox status and hypoxia-response signal pathway in the biological effect of intermittent hypoxia.
3. The treatment of intermittent hypoxia decreased the fraction of the relative radiosensitive early S phase and increased that of the radioresistant G2 phase.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
交付決定額	3,300,000	990,000	4,290,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：内科系臨床医学・放射線科学

キーワード：固形腫瘍、間欠的低酸素、放射線感受性、細胞周期

1. 研究開始当初の背景

一般的に固形腫瘍内には低酸素領域が存在し、細胞生存や増殖に大きな役割を果たすとともに、放射線や制がん剤に顕著な抵抗性を示すため、がん治療の大きな障壁となる。古くから低酸素と考えられていた現象は、血管からの距離に依存し酸素拡散性の限界によって起こる慢性的な低酸素であった。しかし、近年、未成熟な血管が原因で起こる血流の鬱滞や閉塞による、分単位もしくは時間単

位で増減する間欠的な低酸素領域が存在することが明らかとなってきた。幾つかのグループの研究によって、間欠的低酸素が慢性低酸素に比べ、血管新生や浸潤、転移といったがんの悪性化を引き起こすことが分かってきた。例えば、Cairns らは間欠的低酸素に曝されたマウスに移植された固形腫瘍が浸潤、転移を引き起こし、制がん剤や放射線治療に抵抗性となったことを報告している (Cairns RA. et al. *Cancer Res.* 2001&2004)。しか

し、これまで主に行われてきた間欠的低酸素の腫瘍形質に与える影響に関する研究の多くは、主に宿主側の血管新生に着目したものであった。これは、間欠的低酸素ストレスを回避するために、血管新生シグナルを活性化させ十分な酸素供給を誘発するという生体防御メカニズムを解明する目的で行われてきた。Toffoli らは、間欠的低酸素に曝露された血管内皮細胞が VEGF や bFGF といった血管新生因子を放出し、自身の遊走能や血管新生を増強する事を報告しており (Toffoli S. et al. *Angiogenesis* 2009)、腫瘍全体としての悪性化に寄与していると予想される。このような腫瘍細胞を囲む微小環境からの外因性シグナルが間接的に腫瘍悪性化を誘発していることは疑うべくもないが、腫瘍細胞そのものへの影響を詳細に検討した研究は殆どなされてこなかった。

2. 研究の目的

背景で述べたように、固形腫瘍内には、周期的に低酸素-再酸素化サイクルを繰り返す間欠的低酸素領域が存在し、治療抵抗性や浸潤・転移など腫瘍悪性化に強く寄与している事が明らかとなってきた。本研究において、申請者はこの間欠的低酸素環境が腫瘍細胞の放射線感受性を変化させ、腫瘍全体としての放射線治療抵抗性に繋がっているのではないかと考え、これを検証した。加えて、この放射線感受性の変化にどのような分子機構が関与しているかについても検討を行った。

3. 研究の方法

(1) 間欠的低酸素前処理による腫瘍細胞の放射線感受性への影響

腫瘍細胞として、ラット星状膠細胞腫由来 C6 細胞、ヒト肺腺がん由来 A549 細胞ならびにマウス扁平上皮がん由来 SCCVII 細胞を用いた。細胞を接着させた 60 mm プラスチックシャーレを、ガス交換チャンバー内に移して 95% N₂ と 5% CO₂ を含む混合ガスを 10 分間通気することで低酸素化した。持続的な低酸素処理として、チャンバーを密閉して 37° C 条件下で 6 時間維持した。間欠的低酸素処理には、37° C、低酸素条件下で 1 時間維持した後、チャンバーを開放して 37° C、5% CO₂ 条件下で 30 分維持し、再び低酸素化するという作業を 6 回繰り返した (図 1)。X 線照射には、X 線発生装置 PANTAK HF-320 (島津製作所, 京都) を使用し、出力 200 kVp、20 mA、線源距離 615 mm で、1.0 mm Al フィルターを用いて 2.55 Gy/min の線量率で照射した。照射時の酸素効果の影響を除くため、全てのサンプルは大気条件下にて照射した。以上の低酸素処理や X 線照射を行った後の細胞の生存率を、コロニー形成法を用いて評価した。

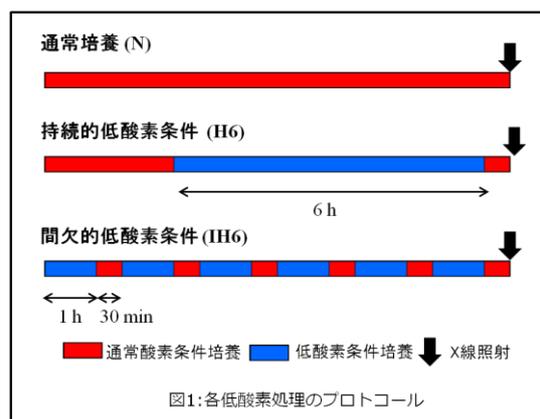


図1:各低酸素処理のプロトコール

(2) 間欠的低酸素処理後の細胞内活性酸素種 ROS 量の測定

細胞内における ROS を検出するために ROS 特異的蛍光プローブである DCFDA を用いた。各培養条件にて処理した細胞を回収し、PBS で洗浄した後、10 μM DCFDA で染色し、その蛍光をフローサイトメーター EPICS XL (Beckman Coulter, Fullerton, CA) にて解析した。

(3) 間欠的低酸素処理による HIF-1α 発現への影響

各低酸素処理後、速やかに細胞を回収し、細胞抽出液を作製した。SDS を添加した試料を電気泳動装置で展開し、常法にてウエスタンブロットを行った。抗 HIF-1α 抗体は Abcam 社のものを使用した。

(4) 間欠的低酸素処理による腫瘍細胞の細胞周期への影響

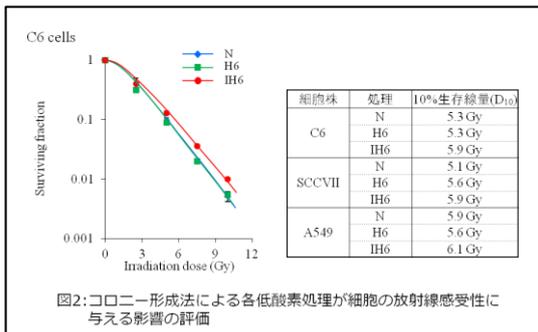
各低酸素処理後、細胞をトリピン処理により回収、PBS で洗浄し、氷冷 70% エタノールにて 4 時間以上固定を行った。0.25% の Triton X-100 で細胞膜を可溶化させた後、リン酸化ヒストン H3 に対する一次抗体と室温で 3 時間反応させた。反応後、Alexa Fluor 488 でラベルされた抗ウサギ IgG 二次抗体と室温にて 30 分間反応させた。さらに RNase 処理を行った後、1 mg/mL PI 溶液にて染色した。フローサイトメーター EPICS XL にて Alexa Fluor 488 および PI の蛍光検出を行った。

4. 研究成果

(1) 間欠的低酸素が処理は腫瘍細胞の放射線感受性に与える影響

C6 細胞、A549 細胞ならびに SCCVII 細胞を用いて各種低酸素処理を行い、コロニー形成法にて放射線感受性について検討を行った。間欠的低酸素のサイクル数を 6 回とすることで、3 つの細胞株全てにおいて再現性良く、間欠的低酸素処理された細胞は、通常酸素処理条件下の細胞と比べ放射線抵抗性を獲得していることが示された (図 2 に C6 のみの結果を示す)。なお、持続的低酸素条件における通常酸素条件に対する増感比 (= 持続的低

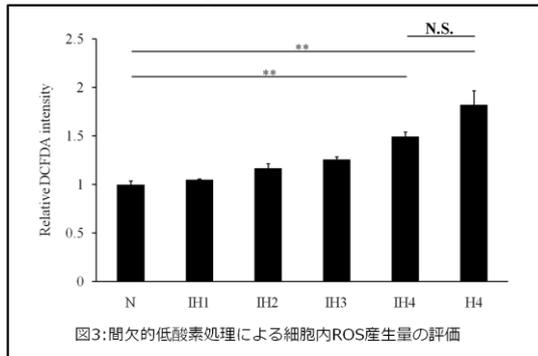
酸素条件における 10%生存線量 / 通常酸素条件における 10%生存線量)は C6 細胞では 1.00、SCCVII 細胞では 1.10、A549 細胞では 0.95 であった。また、間欠的低酸素条件における通常酸素条件に対する増感比(=間欠的低酸素条件における 10%生存線量 / 通常酸素条件における 10%生存線量)は、C6 細胞では 1.11、SCCVII 細胞では 1.16、A549 細胞では 1.03 であった。これらの結果から、試験した全ての細胞株において、間欠的低酸素処理は持続的低酸素処理に比べ、放射線感受性を低下させることが明らかとなった。また4回の間欠的低酸素処理によっても、有意な放射線感受性の低下が起こることも明らかとなった。



(2) 間欠的低酸素処理による ROS の産生量の評価

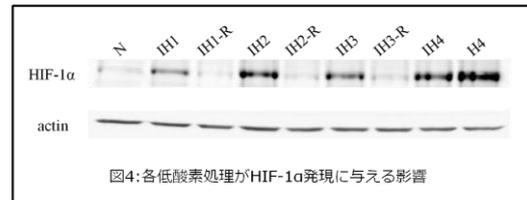
一般に酸素化される際に ROS が産生されることが知られており、また予め ROS に曝された細胞では γ 線に対する抵抗性が上昇することも報告されている (Laval F. *Mutat. Res.* 1988)。そこで、間欠的低酸素処理直後における ROS の産生量を特異的蛍光プローブである DCFDA を用いて評価した。図 3 に示すように、低酸素の曝露回数を増すのに従い、ROS の産生は増加していった。4 回目の低酸素曝露後の細胞では、大気条件の細胞に対する比として 1.5 ± 0.05 となり、有意な ROS 産生の増加が観察された。

しかし、持続的低酸素処理後の細胞でも細胞内 ROS 量は上昇し (1.8 ± 0.15)、4 回の間欠的低酸素処理後の細胞の値と比較して有意な差は観察されなかったため、間欠的低酸素と持続的低酸素処理後の放射線感受性の違いを説明できるものではなかった。



(3) 各低酸素処理が HIF-1 α 発現に与える効果

HIF-1 α 発現量の上昇は低酸素細胞における放射線抵抗性の一因としてよく知られている。そこで、間欠的低酸素処理による放射線抵抗性の上昇と HIF-1 α の発現が関連しているか否かを調べるため、各低酸素処理後の細胞における HIF-1 α の発現をウエスタンブロット法により検討した。HIF-1 α の発現は、大気条件ではほとんど観察されなかったが、間欠的な低酸素処理の回数を追うごとに徐々に増強する傾向が認められた(図 4)。しかし、4 時間の持続的な低酸素処理においても、強い HIF-1 α の発現が観察されたため、間欠的低酸素に限った放射線抵抗性獲得との関連を示すことはできなかった。



(4) 間欠的低酸素処理が細胞周期に与える影響の評価

次に、間欠的低酸素処理が細胞周期を変化させ、放射線抵抗性を獲得しているのではないかと考え、各々の処理後の細胞周期を PI および抗リン酸化ヒストン H3 抗体を用いたフローサイトメトリーにて検討した。まず、細胞周期における G1 期、S 期ならびに G2/M 期の分布を調べるため、PI にて核 DNA を染色することにより、DNA 含量を解析した(図 5A)。次に、抗リン酸化ヒストン H3 抗体を用いて G2/M 期の混在する細胞集団から、G2 期と M 期それぞれの細胞集団に分離した(図 5B)。左側にある細胞集団は DNA 含量が 2N である G1 期細胞、右側にある細胞集団は DNA 含量が 4N である G2/M 期細胞である。G2/M 期の細胞集団のうち、上方の黒色の枠で囲まれた領域がリン酸化ヒストン H3 陽性細胞である M 期の細胞集団であり、それ以外を G2 期の細胞としている。フローサイトメーターで得られた結果を定量化したものを図 6 に示す。

各処理群の細胞周期を比較すると、全細胞数のうち G1 期が占める割合は、通常酸素処理群では 55.1%であるのに対し、持続的低酸素処理群では 53.6%、間欠的低酸素処理群では 51.7%であり有意に減少していた。また、S 期初期が占める割合は、通常酸素処理群では 8.1%、持続的低酸素処理群では 7.5%であるのに対し、間欠的低酸素処理群では 5.4%であり、有意に減少していた。S 期後期の割合は、通常酸素処理群では 13.9%であるのに対し、持続的低酸素処理群では 13.1%、間欠的低酸素処理群では 13.3%であり、通常酸素処理群と持続的低酸素処理群との間にわずかではあるものの有意な減少がみられた。一方、全細胞

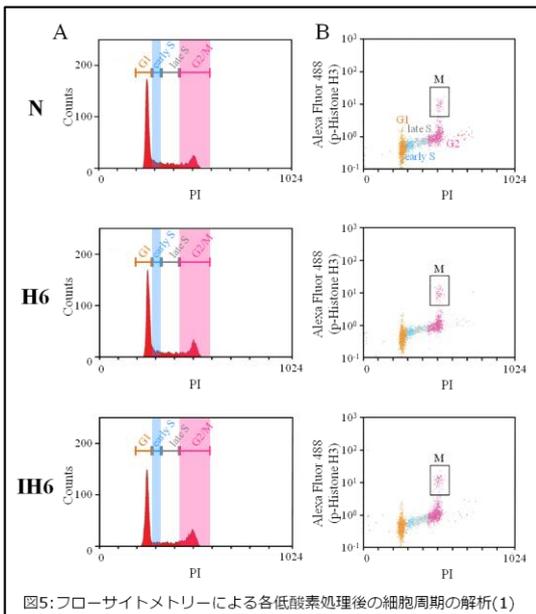


図5: フローサイトメトリーによる各低酸素処理後の細胞周期の解析(1)

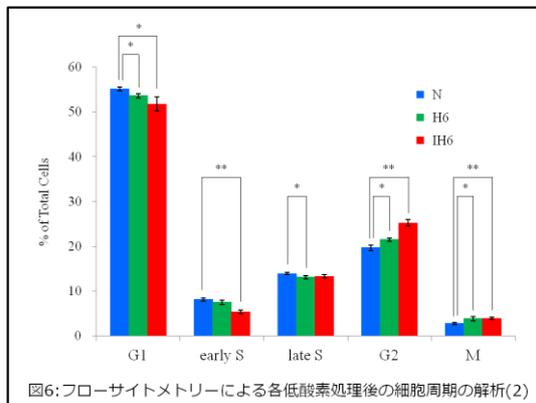


図6: フローサイトメトリーによる各低酸素処理後の細胞周期の解析(2)

胞のうち G2 期が占める割合は、通常酸素処理群では 19.7%、持続的低酸素処理群では 21.5%であるのに対し、間欠的低酸素処理群では 25.2%であり、有意に上昇していた。M 期の占める割合についても通常酸素処理では 2.7%、間欠的低酸素処理では 3.9%となり、わずかではあるものの有意に上昇していた。従って、本実験で顕著な差の観察された結果から、間欠的低酸素処理された細胞の放射線抵抗性獲得は、放射線抵抗性である G2 期の細胞数が増加したこと、および放射線感受性の高い S 期初期の細胞数が減少したことが一つの原因となっていると考えられた。

(5) 結論

間欠的低酸素はその動態の複雑さから、どのような因子が働き腫瘍細胞の形質に影響を与えているのか解明することは依然として困難である。しかし、本研究によって細胞周期調節が間欠的低酸素由来の放射線抵抗性の一助になっていることを明らかにし、細胞周期をコントロールする薬剤や遺伝子治療との組み合わせが放射線治療効果を向上させる可能性を示すことができたことは意義があると考えられる。

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 9 件)

- 1: Matsumoto S., Saito K., Yasui H., Morris H. D., Munasinghe J. P., Lizak M., Merkle H., Ardenkjaer-Larsen J. H., Choudhuri R., Devasahayam N., Subramanian S., Koretsky A. P., Mitchell J. B., and Krishna M. C. EPR oxygen imaging and hyperpolarized ^{13}C MRI of pyruvate metabolism as noninvasive biomarkers of tumor treatment response to a glycolysis inhibitor 3-bromopyruvate. *Magn. Reson. Med.* 2013;69(5):1443-1450. 査読有
- 2: Yasui H., Asanuma T., Kino J., Yamamori T., Meike S., Nagane M., Kubota N., Kuwabara M., and Inanami O. The prospective application of a hypoxic radiosensitizer, doranidazole to rat intracranial glioblastoma with blood brain barrier disruption. *BMC Cancer.* 2013;13:106 査読有
- 3: Saito K., Matsumoto S., Yasui H., Devasahayam N., Subramanian S., Munasinghe J. P., Patel V., Gutkind J. S., Mitchell J. B., and Krishna M. C. Longitudinal imaging studies of tumor microenvironment in mice treated with the mTOR inhibitor rapamycin. *Plos One.* 2012;7(11): e49456. 査読有
- 4: Eitaki M., Yamamori T., Meike S., Yasui H., and Inanami O. Vincristine enhances amoeboid-like motility via GEF-H1/RhoA/ROCK/Myosin light chain signaling in MKN45 cells. *BMC Cancer.* 2012;12:469. 査読有
- 5: Yamamori T., Yasui H., Yamazumi M., Wada Y., Nakamura Y., Nakamura H., and Inanami O. Ionizing radiation induces mitochondrial reactive oxygen species production accompanied by upregulation of mitochondrial electron transport chain function and mitochondrial content under control of the cell cycle checkpoint. *Free Radic. Biol. Med.* 2012;53(2):260-270. 査読有
- 6: Krishna M. C., Matsumoto S., Yasui H., Saito K., Devasahayam N., Subramanian S., and Mitchell J. B. Electron paramagnetic resonance imaging of tumor $p\text{O}_2$. *Radiat. Res.* 2012;177(4):376-386. 査読有
- 7: Matsumoto S., Batra S., Saito K., Yasui H., Choudhuri R., Gadiseti C.,

- Subramanian S., Devasahayam N., Munasinghe J.P., Mitchell J.B., and Krishna M.C. Anti-angiogenic agent sunitinib transiently increases tumor oxygenation and suppresses cycling hypoxia. *Cancer Res.* 2011;71(20):6350-6359. 査読有
- 8: Meike S., Yamamori T., Yasui H., Eitaki M., Matsuda A., Morimatsu M., Fukushima M., Yamasaki Y., and Inanami O. A nucleoside anticancer drug, 1-(3-C-ethynyl- β -D-ribo-pentofuranosyl) cytosine (TAS106), sensitizes cells to radiation by suppressing BRCA2 expression. *Mol. Cancer.* 2011;10:92. 査読有
- 9: Meike S., Yamamori T., Yasui H., Eitaki M., Matsuda A., and Inanami O. 8-Aminoadenosine enhances radiation-induced cell death in human lung carcinoma A549 cells. *J. Radiat. Res.* 2011;52(4):456-463. 査読有

[学会発表] (計 39 件)

- 1: “Imaging of tumor-specific intermittent hypoxia” Yasui H. *International Free Radical Winter School in Muikamachi* in Joetsu Muikamachi Kogen Hotel (Muikamachi, Niigata) 2013. 3. 10-13
- 2: “ラット C6 移植脳腫瘍における脳血液関門の破綻を介した低酸素性放射線増感剤ドラニダゾールの放射線増感効果” 安井博宣, 浅沼武敏, 木野潤一, 永根大幹, 久保田信雄, 山盛徹, 桑原幹典, 稲波修. *第 15 回糖治療増感研究シンポジウム* in 猿沢荘 (奈良市, 奈良) 2013. 2. 9-10
- 3: “間欠的低酸素曝露後の細胞周期変化と放射線抵抗性への関与” 安井博宣, 中村吉就, 永根大幹, 山盛徹, 稲波修. *第 10 回がんとハイポキシア研究会* in 横浜開港記念館 (横浜市, 神奈川) 2012. 12. 6-7
- 4: “がんの放射線治療効率化に向けた ESR 技術の適用” 安井博宣, 松元慎吾, 伊藤慎治, 山盛徹, 兵藤文紀, 市川和洋, 中村秀夫, 内海英雄, Krishna M.C., 稲波修. *第 51 回電子スピンサイエンス学会年会シンポジウム* in 札幌コンベンションセンター (札幌市, 北海道) 2012. 11. 1-3
- 5: “Histological visualization of intermittent hypoxia and its influence on radiation resistance in rat glioma” Yasui H, Yamamori T, Matsumoto S, Krishna MC, Inanami O. *The*

joint symposium of the Winter School in Fukuoka 2012 and the International Redox Core Symposium in Kyushu University (Fukuoka, Fukuoka) 2012. 2. 4

- 6: “脳室内移植グリオーマにおける間欠的低酸素の存在と放射線抵抗性への寄与” 安井博宣, 新坊弦也, 山盛徹, 稲波修. *第 9 回がんとハイポキシア研究会* in 学習院大学 (豊島区, 東京) 2011. 11. 26-27
- 7: “腫瘍組織に特徴的な間欠的低酸素のイメージングと放射線抵抗性への関与” 安井博宣, 松元慎吾, 新坊弦也, Krishna MC, 山盛徹, Mitchell JB, 稲波修. *日本放射線影響学会第 54 回大会* in 神戸商工会議所会館 (神戸市, 兵庫) 2011. 11. 17-19
- 8: “ラット脳腫瘍における間欠的低酸素の可視化と放射線感受性に与える影響” 安井博宣, 新坊弦也, 山盛徹, 永根大幹, 趙松吉, 久下祐司, 稲波修. *第 152 回日本獣医学会学術集会* in 大阪府立大学 (堺市, 大阪) 2011. 9. 19-21
- 9: “Novel EPR imaging to visualize cycling hypoxia associated with a defect of vascular integrity in transplanted tumors” Yasui H, Inanami O, Matsumoto S, Mitchell JB, Krishna MC. *14th International Congress of Radiation Research* in The Palace of Culture and Science (Warsaw, Poland) 2011. 8. 28-9. 1
- 10: “細胞周期との関連性からみた X 線照射に起因する活性酸素種の遅発性産生機構” 安井博宣, 山盛徹, 和田悠佑, 山住雅之, 稲波修. *第 64 回日本酸化ストレス学会* in ルスツリゾートホテル&コンベンション (虻田郡, 北海道) 2011. 7. 2-3
- 11: “Dichloroacetate を用いたがん細胞の代謝調節による放射線増感作用” 安井博宣, 西田直哉, 山盛徹, 稲波修. *第 17 回糖治療増感研究会* in 赤門鍼灸柔整専門学校 (仙台市, 宮城) 2011. 6. 24-25

他、共同演者として、28 件。

[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]

ホームページ等

6. 研究組織

(1) 研究代表者

安井 博宣 (YASUI HIRONOBU)

北海道大学・大学院獣医学研究科・助教

研究者番号：10570228