

平成 30 年 6 月 20 日現在

機関番号：11301

研究種目：基盤研究(B) (一般)

研究期間：2014～2017

課題番号：26293271

研究課題名(和文) mTORの癌幹細胞・低酸素/低栄養状態での放射線抵抗性への寄与の解明

研究課題名(英文) Study on effects of modified mTOR activities under hypoxia and nutrient starvation on radiation sensitivity of cancer cells.

研究代表者

細井 義夫 (Hosoi, Yoshio)

東北大学・医学系研究科・教授

研究者番号：50238747

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 12,200,000円

研究成果の概要(和文)：培養ヒト肝癌細胞であるHepG2細胞およびHuH6細胞が、低栄養状態で培養することによりmTORが活性化することを新たに見出した。これらの肝癌細胞は低栄養状態で放射線高感受性となった。正常ヒト線維芽細胞LM217は低影響状態でmTORは不活性化し放射線抵抗性が誘導された。LM217細胞では低酸素状態単独に比べ低酸素状態+低栄養状態ではより放射線抵抗性になり、AMPK活性とATMの発現が亢進した。siRNAを用いてAMPKをノックダウンするとATMの発現は低下し、放射線感受性は低下した。低酸素状態+低栄養状態での放射線抵抗性の原因はAMPKを介したATMの発現亢進であることが示唆された。

研究成果の概要(英文)：In contrast to suppressed mTORC1 activity under nutrient starvation conditions in LM217, HepG2 and HuH6 cells showed increased mTORC1 activity under nutrient starvation conditions. Under starvation conditions, increased radiosensitivity was observed in HepG2 and HuH6 cells, in contrast to decreased radiosensitivity in LM217 cells. Knockdown of mTOR using siRNA for mTOR suppressed the increased radiosensitivity under starvation conditions in HepG2 cells. Under hypoxia and nutrient starvation, AMPK activity and ATM expression were increased in LM217 cells and decreased in HepG2 cells. Under hypoxia and nutrient starvation, radiosensitivity was decreased in LM217 cells and increased in HepG2 cells. Under hypoxia alone, knockdown of mTOR slightly increased ATM expression but did not affect radiosensitivity in LM217.

研究分野：放射線生物学

キーワード：放射線 低酸素 低栄養

1. 研究開始当初の背景

(1) X線による放射線治療において、癌の放射線抵抗性の原因の一つとして低酸素状態があることはよく知られている。その原因としては、極端な低酸素状態により酸素効果がなくなり放射線抵抗性になると思われる。その他の原因としては、転写因子である HIF-1 が低酸素により誘導され、低酸素抵抗性を誘導すると考えられている。癌組織において低酸素により放射線抵抗性が誘導されるのは、低酸素により壊死となった部分の周囲の1層目または2層目の細胞と報告されており、かなり極端な状態に置かれた細胞であると考えられている。

(2) 実際の腫瘍組織においては低酸素状態に置かれている細胞は血管から遠く離れた場所に位置し、低酸素状態だけではなく低栄養状態にも置かれているものと考えられている。低酸素が放射線感受性に及ぼす影響はよく研究されているが、低栄養が放射線感受性に及ぼす影響は殆ど研究されていない。

2. 研究の目的

(1) 低栄養が細胞の放射線感受性に及ぼす影響を明らかにする。

(2) 低酸素および低栄養状態が細胞の放射線感受性に及ぼす影響を明らかにする。

3. 研究の方法

(1) 細胞としては、SV40 でトランスフォームした培養ヒト正常線維芽細胞 LM217 細胞と、糖代謝が他の体細胞と異なる肝臓から発生する肝細胞癌 HepG2 細胞と HuH6 細胞を用いた。

(2) 低栄養状態としては、培養液中のグルコース濃度を 0 にするとともに、生体内における低栄養状態に近づけるために通常細胞培養に用いる牛胎児血清 (FBS) を加えずに培養した。

(3) 低酸素状態としては、酸素濃度が 0.05% 以下となるようにして実験を行った。

(4) タンパク質の発現と活性はウエスタンブロットで評価した。

(5) 細胞生存率はコロニー形成法により評価した。

4. 研究成果

まず、LM217 細胞、HepG2 細胞、HuH6 細胞を用いて、低栄養が mTOR、p70S6K、ATM、AKT、AMPK α 、HIF1 α に及ぼす影響を検討した。LM217 細胞では低栄養により mTOR タンパク質量が増加したが mTOR 活性 (T2448 のリン酸化) は低下し、mTOR の下流にある p70S6K のタンパク質量は増加し、p70S6K 活性 (T389 のリン酸化) は低下した (図 1A)。これに対して肝癌細胞である HepG2 細胞と HuH6 細胞では、mTOR 細胞の増加は見られず、mTOR 活性は亢進し、p70S6K のタンパク質量に変化はなく、p70S6K 活性は亢進した (図 1B、C)。次に mTOR を制御することが報告されている ATM、AKT、AMPK

α 、HIF1 α に対する低栄養処理の影響について検討を行った。LM217 細胞では、低栄養によって AKT は活性 (S473 のリン酸化) が亢進し、AMPK α の発現量は増加し、AMPK α の活性 (T172 のリン酸化) が亢進し、HIF1 α の発現は低下した。これに対し、HepG2 細胞では ATM、AKT、AMPK α は活性化し、AMPK α のタンパク質量は増加した。HuH6 細胞では、AKT と AMPK α は活性化し、AMPK α のタンパク質量は増加した。

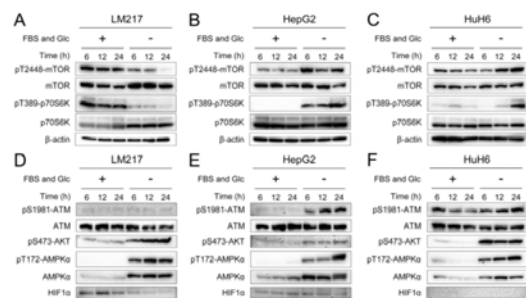


図 1. 低栄養が mTOR、p70S6K、ATM、AKT、AMPK α 、HIF1 α に及ぼす影響 1

A : LM217 細胞において低栄養が mTOR、p70S6K に及ぼす影響。B : HepG2 細胞において低栄養が mTOR、p70S6K に及ぼす影響。C : HuH6 細胞において低栄養が mTOR、p70S6K に及ぼす影響。D : LM217 細胞において低栄養が ATM、AKT、AMPK α 、HIF1 α に及ぼす影響。E : HepG2 細胞において低栄養が ATM、AKT、AMPK α 、HIF1 α に及ぼす影響。F : HuH6 細胞において低栄養が ATM、AKT、AMPK α 、HIF1 α に及ぼす影響。

次に、低栄養が LM217 細胞、HepG2 細胞、HuH6 細胞の放射線感受性に及ぼす影響を調べた。その結果、LM217 細胞では低栄養により放射線抵抗性が誘導されたが、HepG2 細胞と HuH6 細胞では放射線抵抗性が誘導された (図 2A-B)。mTOR 活性を p70S6K の活性化で評価した場合には、低栄養により LM217 では mTOR 活性が抑制され、HepG2 細胞と HuH6 細胞では mTOR 活性化が低下したことから (図 1A-C)、mTOR が放射線感受性に影響を及ぼしていることが考えられた。

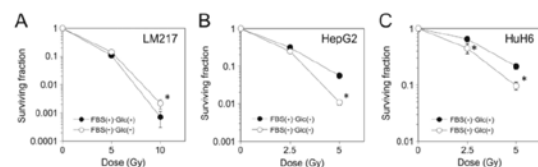


図 2. 低栄養が細胞の放射線感受性に及ぼす影響 1

A : 低栄養が LM217 細胞の放射線感受性に及ぼす影響。B : 低栄養が HepG2 細胞の放射線感受性に及ぼす影響。C : 低栄養が HuH6 細胞の放射線感受性に及ぼす影響。

mTOR が低栄養で放射線感受性に及ぼす影響を検討するために、mTOR に対する siRNA (si-mTOR) または mTOR 阻害剤 rapamycin により mTOR を阻害することが放射線感受性に及ぼす影響を検討した (図 3A)。HepG2 細胞の低栄養での放射線感受性は通常栄養状態の放射線感受性とほぼ同等となり (図 3B、C)、HepG2 細胞の低栄養での放射線感受性の亢進は mTOR を介したものであることが示唆された (図 3)。

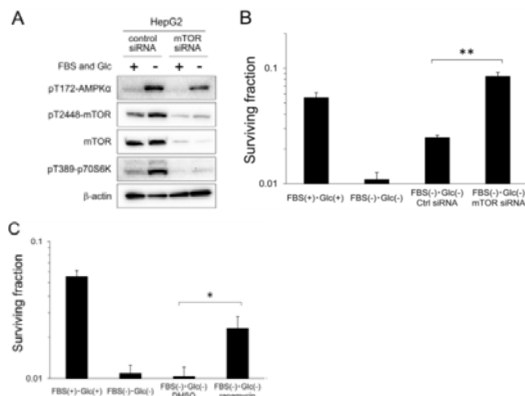


図 3. mTOR に対する siRNA (si-mTOR) および mTOR 阻害剤 rapamycin が AMPK α 、p70S6K、低栄養での放射線感受性に及ぼす影響 1
A : mTOR に対する siRNA が通常培養および低栄養での HepG2 の mTOR、AMPK α 、p70S6K に及ぼす影響。B : mTOR に対する siRNA が低栄養での HepG2 細胞の放射線感受性に及ぼす影響。C : mTOR 阻害剤 rapamycin が低栄養状態での HepG2 細胞の放射線感受性に及ぼす影響。

次に、実際の腫瘍では、低栄養状態にある細胞は同時に低酸素状態にあると考えられるため、低酸素+低栄養状態が ATM、AMPK α 、mTOR、p70S6K、HIF1 α に及ぼす影響を検討した。低酸素+低栄養状態では、LM217 細胞では ATM のタンパク質量は増加し、AMPK α は活性化したが、HepG2 細胞では ATM のタンパク質量は減少し、AMPK α の活性は低下した (図 4A、B)。LM217 細胞および HepG2 細胞で、HIF1 α の蓄積は低酸素+低栄養では認められなかった (図 4A、B)。

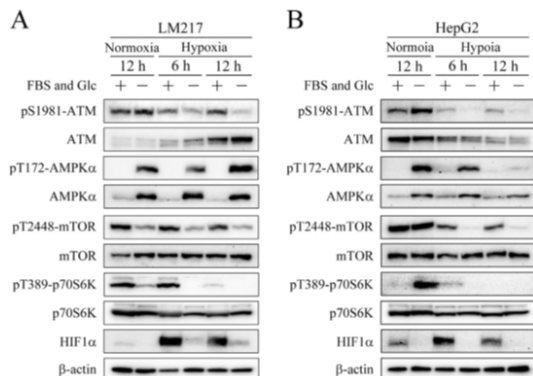


図 4. 低酸素、低栄養、低酸素+低栄養が ATM、AMPK、mTOR、p70S6K、HIF-1 α に及ぼす影響 2
A : LM217 細胞において低酸素、低栄養、低酸素+低栄養が ATM、AMPK、mTOR、p70S6K、HIF-1 α に及ぼす影響。B : HepG2 細胞において低酸素、低栄養、低酸素+低栄養が ATM、AMPK、mTOR、p70S6K、HIF-1 α に及ぼす影響。

低酸素+低栄養が放射線感受性に及ぼす影響は LM217 と HepG2 では異なっていた。LM217 細胞では低酸素単独での放射線感受性に比べ低酸素+低栄養ではより放射線抵抗性となったが、HepG2 細胞では低酸素単独での放射線感受性に比べ低酸素+低栄養ではより放射線高感受性となった (図 5A、B)。LM217 において低酸素+低栄養状態で低酸素状態単独に比べ放射線抵抗性になった原因を明らかにするために、siRNA を用いて AMPK α または mTOR をノックダウンして放射線感受性に及ぼす影響を検討した。その結果、AMPK α をノックダウンすると低酸素+低栄養状態での放射線感受性は低酸素単独状態の放射線感受性とほぼ等しくなったが、mTOR をノックダウンしても低酸素+低栄養状態での放射線感受性に変化は認められなかった (図 5A、B)。これらのことから、LM217 における低酸素+低栄養状態での放射線抵抗性は AMPK α によるものであることが示唆された。

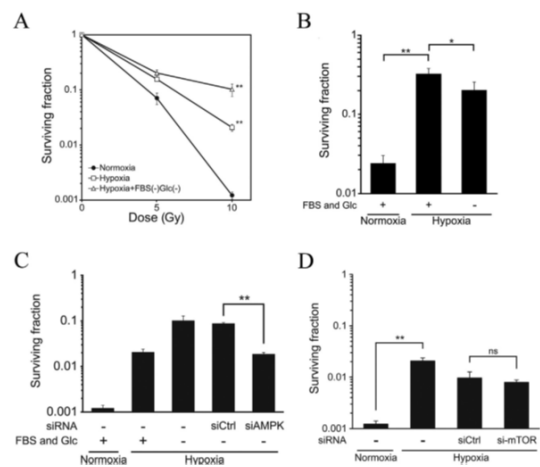


図 5. 低酸素または低酸素+低栄養が放射線感受性に及ぼす影響、および AMPK および m-TOR に対する siRNA が低酸素+低栄養での放射線感受性に及ぼす影響 2

A : 低酸素または低酸素+低栄養が LM217 細胞の放射線感受性に及ぼす影響。B : 低酸素または低酸素+低栄養が HepG2 細胞の放射線感受性に及ぼす影響。C : siAMPK が低酸素+低栄養状態での LM217 細胞の放射線感受性に及ぼす影響。D : 低酸素+低栄養状態での LM217 細胞の放射線感受性に及ぼす si-mTOR の影響。

AMPK α が放射線感受性に影響を与える機序を解明するために、AMPK α と mTOR をノッ

クダウンすることが ATM、p70S6K、HIF1 α に及ぼす影響を検討した。その結果、LM217 細胞では、低酸素および通常酸素状態で AMPK α をノックダウンすると ATM の発現・活性は低下し、mTOR をノックダウンすると ATM の発現・活性は亢進した(図 6A、B、C)。HepG2 では、mTOR をノックダウンしても ATM の発現・活性に影響はなかった(図 6D)。以上のことから、LM217 細胞では、低酸素+低栄養状態において AMPK α を介して ATM の発現量・活性が上昇することにより放射線抵抗性が誘導されることが示唆された。

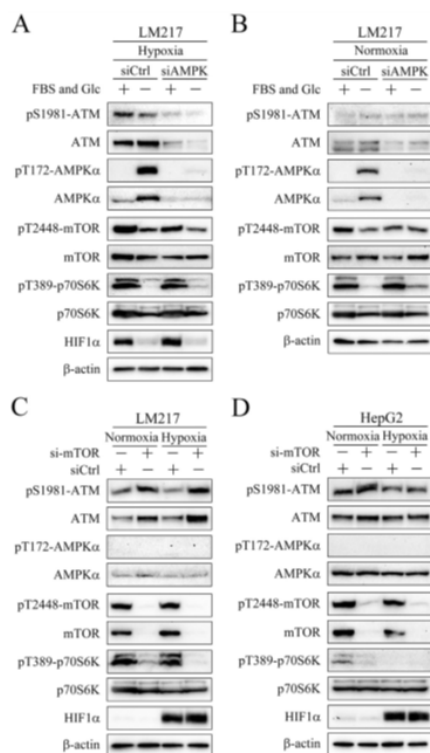


図 6. siAMPK または si-mTOR が低酸素または低酸素+低栄養での ATM、AMPK α 、mTOR、p70S6K、HIF1 α に及ぼす影響 2

A : LM217 細胞において siAMPK が低酸素または低酸素+低栄養での ATM、AMPK α 、mTOR、p70S6K、HIF1 α に及ぼす影響。B : LM217 細胞において siAMPK が通常培養または低栄養での ATM、AMPK α 、mTOR、p70S6K、HIF1 α に及ぼす影響。C : LM217 細胞において si-mTOR が通常培養または低酸素での ATM、AMPK α 、mTOR、p70S6K、HIF1 α に及ぼす影響。D : siAMPK または si-mTOR が低酸素または低酸素+低栄養での ATM、AMPK α 、mTOR、p70S6K、HIF1 α に及ぼす影響

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 5 件)

- ① Murata Y, Hashimoto T, Urushihara Y, Shiga S, Takeda K, Jingu K, Hosoi Y:

Knockdown of AMPK α decreases ATM expression and increases radiosensitivity under hypoxia and nutrient starvation in an SV40-transformed human fibroblast cell line, LM217. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 495:2566-2572, 2018. doi: 10.1016/j.bbrc.2017.12.141. (査読有)

- ② Morita A, Takahashi I, Sasatani M, Aoki S, Wang B, Ariyasu S, Tanaka K, Yamaguchi T, Sawa A, Nishi Y, Teraoka T, Ujita S, Kawate Y, Yanagawa C, Tanimoto K, Enomoto A, Neno M, Kamiya K, Nagata Y, Hosoi Y, Inaba T: A chemical modulator of p53 transactivation that acts as a radioprotective agonist. *Mol Cancer Ther.* 17:432-442, 2018. doi: 10.1158/1535-7163.MCT-16-0554. (査読有)

- ③ Uehara Y, Murata Y, Shiga S, Hosoi Y: NSAIDs diclofenac, indomethacin, and meloxicam highly upregulate expression of ICAM-1 and COX-2 induced by X-irradiation in human endothelial cells. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 479: 847-852, 2016. doi: 10.1016/j.bbrc.2016.09.120. (査読有)

- ④ Murata Y, Uehara Y, Hosoi Y: Activation of mTORC1 under nutrient starvation conditions increases cellular radiosensitivity in human liver cancer cell lines, HepG2 and HuH6. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 468: 684-690, 2015. doi: 10.1016/j.bbrc.2015.11.016. (査読有)

- ⑤ Uehara Y, Inoue M, Fukuda K, Yamakoshi H, Hosoi Y, Kanda H, Oshima M, Iwabuchi Y, Shibata H: Inhibition of β -catenin and STAT3 with curcumin analog suppresses gastric carcinogenesis in vivo: a novel candidate for gastric cancer treatment. *Gastric Cancer* 18: 774-783 2015. doi: 10.1007/s10120-014-0434-3. (査読有)

[学会発表] (計 11 件)

- ① 日本放射線腫瘍学会第 30 回大会、平成 29 年 11 月 17 日~19 日、ナレッジキャピタル コングレコンベンションセンター (大阪市)、細井義夫、村田泰彦、橋本拓磨、志賀壮一郎、武田一也、口頭発表「AMPK を介した低栄養状態による低酸素状態の放射線抵抗性の増強」
- ② 日本放射線影響学会第 60 回大会、平成 29 年 10 月 25 日-28 日、京葉銀行文化プラザ (千葉県千葉市)、村田泰彦、橋本拓磨、志賀壮一郎、武田一也、細井義夫、口頭発表「低酸素および低栄養状態のヒト線維芽

- 細胞における AMPK の活性化は放射線抵抗性を増加させる」
- ③ 第 23 回癌治療増感研究会、平成 29 年 7 月 15 日(土)、軽井沢プリンスホテル、細井義夫、口頭発表「AMPK を介した低栄養状態による低酸素状態の放射線抵抗性の増強」
 - ④ 第 55 回 日本放射線腫瘍学会生物部会学術大会、平成 29 年 6 月 16 日、NUCB 名古屋商科大学ビジネススクール、村田泰彦、橋本拓磨、志賀壮一郎、武田一也、細井義夫、口頭発表「低酸素および低栄養状態のヒト線維芽細胞における AMPK による放射線抵抗性の増加」
 - ⑤ 第 19 回癌治療増感研究シンポジウム、平成 29 年 2 月 3 日-4 日、奈良県文化会館 2 階小ホール、細井義夫、シンポジスト口頭発表「メトホルミン、ラパマイシンなどエネルギー代謝に関わる経路の制御による放射線増感の可能性」
 - ⑥ 日本放射線腫瘍学会第 29 回学術大会、平成 28 年 11 月 25 日(金)~27 日(日)、国立京都国際会館、細井義夫、村田泰彦、志賀壮一郎、口頭発表「ヒト肝癌細胞 HepG2 と HuH6 おける低栄養状態による mTORC1 活性化と放射線増感」
 - ⑦ 日本放射線影響学会第 59 回大会、平成 28 年 10 月 26 日(水)-28 日(金)、JRS アステールプラザ (広島市中区)、村田泰彦、志賀壮一郎、細井義夫、口頭発表「ヒト肝癌細胞における低栄養状態による mTORC1 の活性化は放射線感受性を増加させる」
 - ⑧ 第 45 回放射線による制癌シンポジウム、第 54 回日本放射線腫瘍学会生物部会学術大会、平成 28 年 7 月 15 日(金)-16 日(土)、I-site なんば (大阪市)、村田泰彦、志賀壮一郎、細井義夫、口頭発表「低栄養状態のヒト肝癌細胞における mTORC1 の活性化による放射線感受性の増加」
 - ⑨ 第 17 回癌治療増感研究シンポジウム、平成 27 年 2 月 6-7 日、奈良文化会館 (奈良市)、村田泰彦、上原芳彦、細井義夫、口頭発表「低栄養状態が培養細胞の放射線感受性に及ぼす影響」
 - ⑩ 日本放射線腫瘍学会第 27 回学術大会、平成 26 年 12 月 11-13 日、パシフィコ横浜、細井義夫、村田泰彦、上原芳彦、口頭発表「低栄養状態が培養細胞の放射線感受性に及ぼす影響」
 - ⑪ 日本放射線腫瘍学会生物部会、平成 26 年 10 月 2-4 日、鹿児島、村田泰彦、上原芳彦、細井義夫、口頭発表「低栄養状態が培養細胞の放射線感受性に及ぼす影響」

〔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：
 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

細井 義夫 (HOSOI YOSHIO)
 東北大学・大学院医学系研究科・教授
 研究者番号：50238747

(2) 研究分担者

()

研究者番号：

(3) 連携研究者

()

研究者番号：

(4) 研究協力者

()