

**科学研究費助成事業 研究成果報告書**

平成 29 年 5 月 22 日現在

機関番号：10101

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2014～2016

課題番号：26461875

研究課題名(和文) 癌関連線維芽細胞による液性因子分泌に対する放射線照射の効果と癌病態への影響

研究課題名(英文) The effect of ionizing radiation on secretory phenotype of cancer-associated fibroblasts and its impact on cancer pathophysiology

研究代表者

山盛 徹 (Yamamori, Tohru)

北海道大学・獣医学研究科・准教授

研究者番号：00512675

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,800,000円

研究成果の概要(和文)：腫瘍間質内に最も多く含まれる細胞である癌関連線維芽細胞(CAF)およびそこから分泌される液性因子に着目し、放射線照射とCAFとの関連を明らかにすることを目的に本研究を行った。本研究の結果、マウス胎仔線維芽細胞(MEF)へのX線照射により、CAFとの類似性が報告されている老化細胞が出現し、これと同時に複数のサイトカインの発現が亢進した。また、X線照射により細胞の酸化ストレスレベルが増大し、この一部はNADPH oxidaseファミリータンパク質であるNOX4によるものであることが明らかとなった。その一方で、X線照射後のMEFからの液性因子分泌にはNOX4が関与していないことが示唆された。

研究成果の概要(英文)：Recent evidence suggests that cancer-associated fibroblasts (CAFs), which are the most abundant cell type in cancer stroma, and CAF-derived secretory factors play important roles in various aspects of cancer pathophysiology. This study was aimed to understand how ionizing radiation influences on CAFs and their secretory phenotype. We revealed that X-irradiation to mouse embryonic fibroblasts (MEFs) increased the number of senescent cells, which are reported to have similar characteristics to CAFs. This event was accompanied by the induction of multiple cytokines. We also found that X-irradiation enhanced cellular oxidative stress level and NADPH oxidase 4 protein (NOX4) was in part responsible for it. Furthermore, our data suggested that NOX4 was not involved in the induction of secretory factors in irradiated MEFs.

研究分野：放射線生物学

キーワード：癌関連線維芽細胞 放射線 サイトカイン 活性酸素種 癌

### 1. 研究開始当初の背景

癌は癌細胞のみから構成される組織ではなく、腫瘍間質と呼ばれる癌細胞以外の細胞が数多く存在する。この腫瘍間質が癌の病態にきわめて重要な役割を担っていることを示す証拠が近年蓄積してきており、現在の癌研究における大きなトピックの一つとなっておりつつある。腫瘍間質は、癌関連線維芽細胞 (cancer-associated fibroblast: CAF)、血管内皮細胞、炎症細胞などから構成される。このうち、CAF は腫瘍間質に最も多く存在する細胞であることが知られている。これまでの研究により、CAF は IL-6、IL-8 といったサイトカインや TGF- $\beta$ 、VEGF 等の成長因子、さらにマトリックスメタロプロテアーゼなどの細胞外プロテアーゼ等、さまざまな液性因子を分泌することにより癌の成長や転移を促進し、抗がん剤等に対する治療抵抗性に寄与することが明らかにされている。一方、非癌組織に存在する正常線維芽細胞に高線量の放射線を照射すると、持続的な DNA 損傷が生じ、これによって不可逆的な細胞周期の停止が起こり、細胞老化に類似したフェノタイプを示すことが報告されている。この老化様変化を起こした線維芽細胞は、サイトカイン、成長因子、細胞外プロテアーゼといった CAF と共通する種々の液性因子を分泌することが近年報告されている。しかしながら、癌組織中の CAF が放射線照射を受けるとどのような応答を示すのか、またそれが放射線治療後の癌の病態にどのように影響を与えるのか、といった腫瘍間質の放射線応答とその病態への寄与については、放射線治療において重要な情報と思われるものの十分に理解されていないのが現状である。

### 2. 研究の目的

上述のように、癌組織に存在する腫瘍間質が癌の病態にきわめて重要であることが明らかになりつつある。しかしながら、腫瘍間質への放射線照射がどのような生物応答を引き起こし、それが癌の成長・転移といった性質にどのように影響を与えるのか、といった腫瘍間質の放射線応答とその病態への寄与についてはほとんど情報が無く、十分に理解されていないのが現状である。申請者は、腫瘍間質内に最も多く含まれる細胞である CAF およびそこから分泌される液性因子に着目し、CAF への放射線照射は CAF の液性因子分泌形質を変化させ、それが放射線治療後の残存癌細胞の生存、増殖、転移といった性質に影響を与えるのではないかと考え、本研究によりこの仮説を検証した。

### 3. 研究の方法

#### (1) 細胞および放射線照射

マウス乳がん由来 EMT6 細胞は ATCC より入手し、常法に従い培養した。マウス胎仔由来初代線維芽細胞 (MEF) は、常法に従い分離後、10%ウシ胎仔血清を含む DMEM 培

地で、5% CO<sub>2</sub>/3% O<sub>2</sub> 下で培養した。MEF への遺伝子導入は、Plat-E 細胞を用いて作出したウイルスベクターにより実施した。細胞への X 線照射は、Precision X-ray 社の X-RAD iR-225 を用いて実施した。

#### (2) 遺伝子発現解析

遺伝子発現解析は定量 PCR 法により行った。各処理後の細胞から RNA を回収し、これをもとに cDNA を合成した。定量 PCR は、LightCycler Nano システム (Roche Applied Science) 用い、標準の計測条件にて実施した。プライマーは個別に設計したものを使用し、内部標準には beta-2 microglobulin を利用した。

#### (3) サイトカインアレイ

放射線照射を受けた細胞からのサイトカイン分泌は、照射後の細胞培養上清を RayBiotech 社の抗体アレイ (Mouse L308 Array) を用いて解析することにより評価した。検出は化学発光法を用いて行い、イメージングアナライザーにて画像を取得した。

#### (4) 活性酸素種生成

細胞からの活性酸素種 (ROS) 生成は、2',7'-dichlorodihydrofluorescein diacetate (DCFDA) および Amplex Red を用いて評価した。DCFDA は細胞内で酸化分子と反応し蛍光を発する。各処理後の細胞に DCFDA を添加後インキュベーションし、DCFDA 由来の蛍光を蛍光顕微鏡にて評価した。Amplex Red は、horseradish peroxidase (HRP) の存在下で過酸化水素と反応し蛍光を発する。各処理後の細胞由来の培養液を 96 穴プレートのウェルに添加し、さらに HRP、Amplex Red を含むリン酸緩衝液を加えた。20 分のインキュベーション後、Amplex Red 由来の蛍光を蛍光プレートリーダーで計測した。

#### (5) 細胞老化の評価

細胞老化は、一般的な老化マーカーである senescence associated- $\beta$ -galactosidase (SA- $\beta$ -gal) の発現により評価した。細胞における SA- $\beta$ -gal 発現は、Cell Signaling Technology 社の Senescence  $\beta$ -Galactosidase Staining Kit を用いて解析を行った。明視野顕微鏡を用いて全体の細胞における SA- $\beta$ -gal 陽性細胞の割合を計測し、これを老化細胞率とした。

#### (6) 増殖細胞の評価

細胞の増殖能は、修飾核酸である 5-ethynyl-2-deoxyuridine (EdU) の DNA への取り込みを計測することで評価した。各処理後の細胞を、Click-iT Plus EdU Imaging Kit (ThermoFisher Scientific) を用いて染色し、蛍光顕微鏡下で EdU 陽性細胞の割合を計測し、これを増殖細胞率とした。

#### 4. 研究成果

##### (1) 実験的 CAF の作製

まず、正常線維芽細胞とがん細胞をマウスに共移植し、形成された腫瘍塊から CAF 化した線維芽細胞を回収することで、実験的に CAF を作出することを試みた。抗生物質による CAF の選択を可能にするため、Balb/c マウス胎仔より分離した MEF にピューロマイシン耐性遺伝子をウイルスベクターにより導入し、ピューロマイシン耐性 MEF (MEF/puroR) を作出した。こうして作出した MEF/puroR とマウス乳がん由来細胞株である EMT6 細胞とともにマウス乳腺脂肪組織に移植し、形成された腫瘍塊から細胞を分離し、ピューロマイシンによる選択を行った。しかしながら、得られた細胞群からがん細胞を完全に除去することが困難であったことや、得られた線維芽細胞の生存性が著しく低い等の問題があることが判明した。この問題を克服するため、不死化した MEF/puroR を用いて同様の検討を行ったものの状況の改善は見られなかった。上記の移植腫瘍を利用した手法による CAF の分離が困難であったため、線維芽細胞を CAF 様細胞へと誘導することが報告されている Transforming growth factor (TGF)- $\beta$ 1 を MEF に処理することで、in vitro で MEF を CAF に分化させることを試みた。しかしながら、TGF- $\beta$ 1 処理により CAF マーカーである  $\alpha$ -smooth muscle actin の顕著な発現変化は観察されなかった。これらのことから、本法による CAF モデルの作出は困難であることが明らかとなった。

##### (2) 放射線照射後の液性因子発現と細胞応答

CAF の作製と並行して正常線維芽細胞に対する放射線の効果を調査した。正常線維芽細胞に放射線照射を行い、そこから分泌されるサイトカインの解析を抗体アレイおよび定量 PCR 法により解析した。その結果、放射線により顕著に誘導される幾つかのサイトカインが見出された (図 1)。

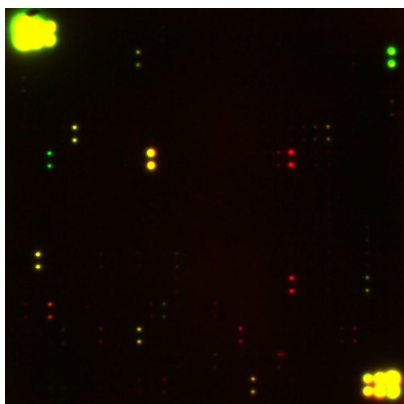


図 1: 抗体アレイによる分泌サイトカインの解析  
非照射 (赤) / 10 Gy 照射 7 日後 (緑) の MEF  
におけるサイトカイン分泌

また、このサイトカイン分泌には照射線量に応じた分泌のパターンが複数存在することが示唆された。さらに、サイトカイン発現について過酸化水素等の放射線以外のストレスによる影響との比較検討を実施したところ、それぞれのストレスに特徴的な応答パターンが存在することを示唆するデータが得られた。

近年、細胞の放射線応答における細胞老化誘導の意義が示唆されている。そこで、腫瘍およびその周辺組織に存在する線維芽細胞が放射線照射後に老化細胞としての性質を獲得し、放射線治療後に起こる炎症やがんの悪性化にかかわっているのではないかと考え、MEF に対して放射線照射を行い、 $\beta$ -ガラクトシダーゼ染色により老化細胞数の変化を評価した。その結果、SA- $\beta$ -gal 陽性細胞の割合は X 線照射後経時的に増加した (図 2)。

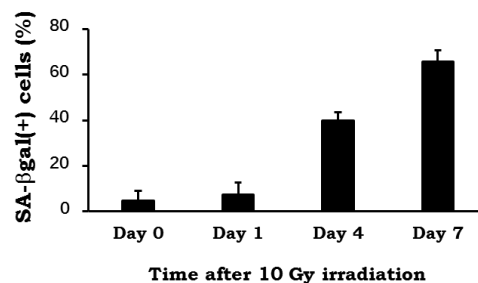


図 2: X 線による細胞老化の誘導

また、これに付随して、X 線照射を受けた細胞では時間依存的に EdU 陽性細胞率が減少しており、放射線照射により細胞増殖活性が低下していることが明らかとなった。これらの結果から、MEF の X 線照射により細胞老化が誘導されることが示された。細胞老化誘導と線維芽細胞の CAF 化には類似性があることが指摘されており、この点についてのさらなる検討は CAF の放射線応答を明らかにするうえで非常に有益であると考えられる。

##### (3) 放射線照射後の細胞からの ROS 産生

CAF からの液性因子の分泌に、癌組織ならびにその周辺組織に存在する細胞に由来する ROS が関与していることが報告されている。このことに着目し、放射線照射を受けた細胞から ROS が産生され、これが CAF 由来の液性因子分泌や組織炎症の惹起に関与しているのではないかと考え、本仮説の検証を行った。DCFDA 染色により MEF の細胞内 ROS レベルを評価したところ、X 線照射により細胞内 ROS レベルの上昇が観察された。そこで ROS の発生源を明らかにするため、細胞膜上に存在する ROS 産生酵素である NADPH oxidase (NOX) ファミリータンパク質の発現を検討した。マウスに存在する六種類のアイソフォームである NOX1-4 および DUOX1/2 の発現を定量 PCR 法により解析

したところ、MEFにおいてNOX4の遺伝子発現のみが検出され、さらにMEFにX線照射を行うと、NOX4の発現が有意に上昇することが明らかとなった(図3)。

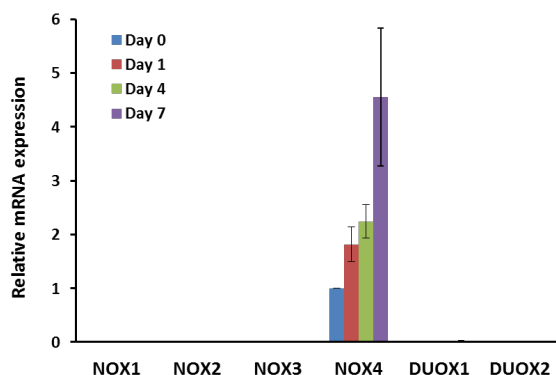


図3: X線照射後のMEFにおけるNOX遺伝子発現

#### (4) NOX4の発現変化が細胞の表現型に与える影響

X線照射によるNOX4の発現上昇が細胞の表現型に与える影響を明らかにするため、NOX1/4阻害剤であるGKT137831(GKT)およびNOX4ノックアウトマウス由来MEF(KO MEF)を用いて解析を行った。X線照射後のROS産生は、GKT処理ならびにKO MEFでは有意に減弱していたことから、放射線照射後に起こるROS産生にNOX4が関与していることが強く示唆された。その一方で、野生型MEFとKO MEFでX線照射による細胞老化の程度に差はなく、また照射を受けたMEFからの液性因子分泌にはNOX4は関与していないことを示唆する結果が得られた。このことは、NOX4に由来するROSは照射を受けた細胞ではなく、その周辺に存在する細胞に影響を与え、組織炎症の誘発に寄与している可能性が示唆された。

#### 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11件)

1. Yamamori T, Sasagawa T, Ichii O, Hiyoshi M, Bo T, Yasui H, Kon Y, Inanami O. Analysis of the mechanism of radiation-induced upregulation of mitochondrial abundance in mouse fibroblasts. *J Radiat Res* 2016;1-10.(査読あり) doi: <https://doi.org/10.1093/jrr/rrw113>
2. Yamamori T, Ike S, Bo T, Sasagawa T, Sakai Y, Suzuki M, Yamamoto K, Nagane M, Yasui H, Inanami O. Inhibition of the mitochondrial fission protein dynamin-related protein 1 (Drp1) impairs mitochondrial fission and mitotic catastrophe after

X-irradiation. *Mol Biol Cell* 2015;26(25):4607-17. (査読あり) doi: 10.1091/mbc.E15-03-0181

3. Sakata K, Kondo T, Mizuno N, Shoji M, Yasui H, Yamamori T, Inanami O, Yokoo H, Yoshimura N, Hattori Y. Roles of ROS and PKC- $\beta$ II in ionizing radiation-induced eNOS activation in human vascular endothelial cells. *Vascul Pharmacol* 2015;70:55-65. (査読あり) doi: 10.1016/j.vph.2015.03.016
4. Nagane M, Yasui H, Sakai Y, Yamamori T, Niwa K, Hattori Y, Kondo T, Inanami O. Activation of eNOS in endothelial cells exposed to ionizing radiation involves components of the DNA damage response pathway. *Biochem Biophys Res Commun* 2015;456(1):541-6. (査読あり) doi: 10.1016/j.bbrc.2014.12.002

[学会発表](計28件)

1. 酒井友里、山盛徹、日吉美恵、鈴木基史、稲波修 「放射線によるストレス誘発性早期老化に伴う活性酸素種生成におけるNOXファミリータンパク質の寄与の検討」第159回日本獣医学会学術集会2016年9月6日 日本大学湘南キャンパス(神奈川県・藤沢市)
2. Tohru Yamamori, Satoshi Ike, Tomoki Bo, Tomoya Sasagawa, Motofumi Suzuki, Yuri Sakai, Hironobu Yasui, Osamu Inanami "Inhibition of the mitochondrial fission protein dynamin-related protein 1 impairs mitotic catastrophe after X-irradiation" 15th International Congress of Radiation Research 2015年5月27日 国立京都国際会館(京都府・京都市)
3. Tohru Yamamori, Hironobu Yasui, Osamu Inanami "The relationship between radiation-induced cell cycle arrest and reactive oxygen species production from mitochondria" 2015年5月29日 国立京都国際会館(京都府・京都市)
4. 山盛徹、池悟志、笹川朋哉、鈴木基史、酒井友里、安井博宣、稲波修 Drp1依存性ミトコンドリア分裂が細胞の放射線応答に与える影響の評価とそのメカニズムの解析 日本放射線影響学会第57回大会 2014年10月1日 鹿児島県民交流センター(鹿児島県・鹿児島市)

[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

<https://www.vetmed.hokudai.ac.jp/organization/radbiol/index.html>

## 6. 研究組織

### (1)研究代表者

山盛 徹 (YAMAMORI, Tohru)

北海道大学・大学院獣医学研究科・准教授  
研究者番号：00512675

### (2)研究分担者

安井 博宣 (YASUI, Hironobu)

北海道大学・アイソトープ総合センター・  
准教授  
研究者番号：10570228

高木 哲 (TAKAGI, Satoshi)

北海道大学・大学院獣医学研究科・准教授  
研究者番号：50396305

### (3)連携研究者

( )

研究者番号：

### (4)研究協力者

( )