

平成 30 年 6 月 18 日現在

機関番号：11101

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2015～2017

課題番号：15K09985

研究課題名(和文)放射線曝露細胞由来DAMPsが癌病態に及ぼす影響解明と制癌への応用

研究課題名(英文) Effects of DAMPs from cancer cells exposed to radiation on the properties of cancer cells

研究代表者

吉野 浩教 (Yoshino, Hironori)

弘前大学・保健学研究科・助教

研究者番号：10583734

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,700,000円

研究成果の概要(和文)：本研究では、放射線曝露細胞由来DAMPs(ダメージ関連分子パターン)が癌病態に及ぼす影響をDAMPsを含有する放射線曝露細胞由来馴化培地(ICCM)を用いて検討した。結果として、ICCMで前処理したヒト肺癌細胞は放射線誘発細胞死に対して抵抗性を示すこと、そしてICCM処理によってX線照射後の細胞移動能の低下が減弱することが示唆された。以上より、ICCM中のDAMPsが放射線治療効果において負の影響を与える可能性が考えられた。

研究成果の概要(英文)：In the present study, we investigated the effects of damaged-associated molecular patterns (DAMPs) from X-irradiated cancer cells on the properties of cancer cells using irradiated cell conditioned medium (ICCM) containing DAMPs. The lung cancer cells pre-treated with ICCM from X-irradiated lung cancer cells were resistant to X-ray irradiation-induced cytotoxicity compared with non-treated control. Furthermore, the treatment with ICCM attenuated the X-ray irradiation-induced decrease in the lung cancer cell migration. Considering these results, there is a possibility that DAMPs contained in ICCM impairs the anti-cancer effects by radiation therapy.

研究分野：放射線生物学

キーワード：ダメージ関連分子パターン 放射線曝露細胞由来馴化培地 放射線 放射線抵抗性 Nrf2 細胞移動能

1. 研究開始当初の背景

ダメージ関連分子パターン (DAMPs) はストレスに傷害された細胞から放出される因子である。がん治療において癌細胞由来 DAMPs は抗腫瘍免疫誘導因子の一つとして注目されているが、ストレスや DAMPs の種類によっては腫瘍の増殖や転移を促進するなど不利益な点も明らかとなってきた。

放射線治療は有効ながん治療であるが、放射線曝露細胞由来 DAMPs が癌病態に及ぼす影響は不明である。

2. 研究の目的

本研究の目的は、放射線曝露細胞由来 DAMPs が癌病態に及ぼす影響を解析することである。そのために、DAMPs を含有する放射線曝露細胞由来馴化培地 (ICCM) を用いて、癌細胞由来 ICCM が癌細胞の細胞増殖や放射線応答性などに及ぼす影響を解析するとともに、ICCM の細胞傷害性と放射線感受性との関連について検討した。

3. 研究の方法

(1) 細胞

ヒト肺癌細胞 A549 及び H1299 は ATCC より購入した。細胞は 10%ウシ胎児血清含有 RPMI1640 培地で培養した。ヒト臍帯静脈内皮細胞 HUVEC (Cell Application, Inc) はヒト内皮細胞増殖培地 ECBM で培養した。

(2) Nrf2 のノックダウン

Nrf2 に対する Silencer Select Pre-designed siRNA (Ambion 社) と RNAiMAX (Invitrogen) を用い、Nrf2 発現抑制 A549 細胞を調製した。

(3) 細胞への放射線照射

X線照射は X線発生装置 (MBR-1520R-3) を使用して行った。

(4) ICCM の回収

肺癌細胞に X線を照射し、24時間培養した。培養後、培養培地を回収、遠心し上清を回収した。その後 0.45 μm フィルターを用いてろ過し、ICCM として使用した。図 1 に ICCM を用いた実験の概要を示した。

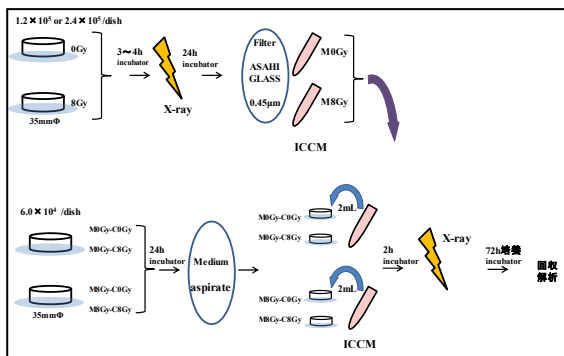


図 1 ICCM を用いた実験の概略図

(5) 細胞増殖試験と細胞死解析

細胞を ICCM で 72 時間培養し、生細胞数をトリパンプルー色素排除法にて計数するとともに、蛍光標識 Annexin V を用いて細胞死解析を行った。一部実験では、ICCM 添加 2 時間後に X 線照射を行った (図 1)。

(6) コロニー形成能の評価

細胞を ICCM で 7-10 日間培養し、50 個以上の細胞からなるコロニーを計数した。

(7) スクラッチアッセイによる細胞移動能の評価

コンフルエント状態の細胞をイエローチップでスクラッチ後、ICCM 存在下で培養し、創傷面積を経時的に解析した。一部実験では ICCM 添加 2 時間後に X 線を照射した。

HUVEC 細胞の細胞移動に及ぼす A549 細胞由来 ICCM の影響評価はインサートウェルを用いた共培養により評価した。

4. 研究成果

(1) ヒト肺癌細胞に対する ICCM の細胞傷害性の検証並びに細胞の放射線感受性と ICCM の細胞傷害性との関連性の検証

まず DAMPs を含有する放射線曝露細胞由来馴化培地 (ICCM) 処理がヒト肺癌細胞 (A549 および H1299) の細胞増殖に及ぼす影響を検討した。その結果、生細胞数及びコロニー形成能に対する ICCM 処理の顕著な影響は観察されなかった。更に、酸化ストレス応答において重要な役割を果たす Nrf2 遺伝子の発現抑制により放射線感受性を高めた A549 細胞においても ICCM の細胞傷害性は観察されなかったことから、ICCM の細胞傷害性と放射線感受性の関連性は低いことが示唆された。

(2) ICCM 処理肺癌細胞の X 線に対する応答性の検証

次に、ICCM 前処理がヒト肺癌細胞の X 線に対する応答性に及ぼす影響を検討した。非照射及び 8 Gy 照射 ICCM で前処理した A549 細胞に X 線を照射したところ、いずれの細胞群も 8 Gy 照射により細胞死細胞集団が増加したが、8 Gy 照射 ICCM で前処理した細胞群では非照射 ICCM 処理群と比べて照射後の細胞死細胞集団の割合が有意に低く、ICCM 前処理により放射線誘発細胞死に対して抵抗性を示すことが示唆された。また、p53 遺伝子を欠損した H1299 においても同様の結果が確認されたことから、この現象は p53 に依存しないと考えられた。

(3) ヒト肺癌細胞及び血管内皮細胞の細胞移動能に及ぼす ICCM の影響

ICCM 処理がヒト肺癌細胞 A549 の細胞移動能に及ぼす影響を検討した。その結果、8 Gy 照射 ICCM 処理 A549 細胞の細胞移動能は非照射 ICCM 処理細胞と同程度であった。しかしながら、非照射 ICCM 処理 A549 細胞に 8 Gy

を照射したところ、照射により細胞移動能が低下した一方で、8 Gy 照射 ICCM 処理 A549 細胞では照射による細胞移動能の低下は観察されなかったことから、ICCM 処理によって X 線照射後の細胞移動能の低下が減弱する可能性が示唆された。

癌細胞の転移においては血管新生を担うヒト血管内皮細胞の役割が重要であるため、最後に X 線曝露 A549 細胞とヒト血管内皮細胞 HUVEC をインサートウェルを用いて共培養し、HUVEC 細胞の移動能を検討した。その結果、非照射 A549 細胞との共培養、8 Gy 照射 A549 細胞との共培養間で HUVEC 細胞の細胞移動能に有意な変化は認められなかった。

(7) 結論

上記の ICCM が癌細胞に引き起こす影響は放射線治療効果において不利益となると考えられるため、今後はその作用機序を解明し、がん放射線治療有効性向上に繋げる必要がある。

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)

- ① Sato Y, Yoshino H, Kazama Y, Kashiwakura I. Involvement of caspase-8 in apoptosis enhancement by cotreatment with retinoic acid-inducible gene-I-like receptor agonist and ionizing radiation in human non-small cell lung cancer. *Molecular Medicine Reports*, 査読有, in press.
- ② Yoshino H, Murakami K, Kazama Y, Nawamaki M, Kashiwakura I. Effects of Nrf2 knockdown on the properties of irradiated cell conditioned medium from A549 human lung cancer cells. *Biomedical Reports*, 査読有, 8:461-465, 2018.
DOI: 10.3892/br.2018.1073
- ③ Yoshino H, Iwabuchi M, Kazama Y, Furukawa M, Kashiwakura I. Effects of retinoic acid-inducible gene-I-like receptors activations and ionizing radiation cotreatment on cytotoxicity against human non-small cell lung cancer in vitro. *Oncology Letters*, 査読有, 15:4697-4705, 2018.
DOI: 10.3892/ol.2018.7867
- ④ Yoshino H, Kashiwakura I. Involvement of reactive oxygen species in ionizing radiation-induced upregulation of cell surface Toll-like receptor 2 and 4 expressions in human monocytic cell. *Journal of Radiation Research*, 査読有, 58:626-635, 2017.

DOI: 10.1093/jrr/rrx011

- ⑤ Yoshino H, Kumai Y, Kashiwakura I. Effects of endoplasmic reticulum stress on apoptosis induction in radioresistant macrophages. *J Molecular Medicine Reports*, 査読有, 15:2867-2872, 2017.
DOI: 10.3892/mmr.2017.6298
- ⑥ Fukushi S, Yoshino H, Yoshizawa A, Kashiwakura I. p53-independent structure-activity relationships of 3-ring mesogenic compounds' activity as cytotoxic effects against human non-small cell lung cancer lines. *BMC Cancer*, 査読有, 16:521, 2016.
DOI: 10.1186/s12885-016-2585-6
- ⑦ Murakami S, Yoshino H, Ishikawa J, Yamaguchi M, Tsujiguchi T, Nishiyama A, Yokoyama K, Kashiwakura I. Effects of ionizing radiation on differentiation of murine bone marrow cells into mast cells. *Journal of Radiation Research*, 査読有, 56:865-871, 2015.
DOI: 10.1093/jrr/rrv061

[学会発表] (計 6 件)

- ① 吉野浩教, 今埜遼香, 小倉巧也, 柏倉幾郎. ヒト単球系細胞の細胞分化に伴う放射線抵抗性獲得と caspase-8 の発現制御の関連. 日本放射線影響学会 第 60 回大会, 2017 年 10 月 25 日-28 日, 京葉銀行文化プラザ (千葉県千葉市).
- ② 吉野浩教, 柏倉 幾郎. 放射線誘発 Toll 様受容体 2 及び 4 の細胞表面発現増強における活性酸素種の関与, 平成 29 年度若手放射線生物学研究会専門研究会, 2017 年 9 月 2-3 日, 東京大学(東京都文京区).
- ③ 吉野浩教. 放射線による Toll 様受容体の細胞表面発現制御機構の探索, 日本放射線影響学会 第 59 回大会, 2016 年 10 月 26-28 日, JMS アステールプラザ (広島県広島市).
- ④ 吉野浩教, 柏倉 幾郎. 小胞体ストレスの放射線抵抗性マクロファージに対するアポトーシス誘導効果. BMB2015 第 38 回日本分子生物学会年会 第 88 回日本生化学会大会 合同大会, 2015 年 12 月 1-4 日, 神戸ポートアイランド (兵庫県神戸市).
- ⑤ 吉野浩教, 柏倉 幾郎. RIG-I 様受容体アゴニストと放射線の併用による抗腫瘍効果増強. 日本放射線影響学会 放射線ワークショップ, 2015 年 10 月 16-17 日, 富山大学 (富山県富山市).
- ⑥ Yoshino H, Kashiwakura I. Synergistic effects of RIG-like receptor stimulus and ionizing radiation on anticancer effects. 15th International Congress of Radiation Research ICRR 2015, 2015 年 5 月 25-29 日, 国立京都国際会館 (京都)

府京都市) .

〔図書〕 (計 1 件)

- ① 編: 松本義久, 著: 松本義久, 片岡隆浩, 堤香織, 島田幹男, 森田明典, 藤井義大, 門前暁, 吉野浩教, 松本孔貴, 鈴木崇彦, MEDICAL VIEW, 人体のメカニズムから学ぶ 放射線生物学, 2017, 142-172

〔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

- ① 弘前大学 研究者詳細 吉野浩教
http://hue2.jm.hirosaki-u.ac.jp/html/100000291_ja.html

6. 研究組織

(1) 研究代表者

吉野 浩教 (YOSHINO HIRONORI)
弘前大学・大学院保健学研究科・助教
研究者番号: 10583734

(2) 研究分担者

なし

(3) 連携研究者

なし

(4) 研究協力者

なし