

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 8 月 8 日現在

機関番号：14401

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2015～2016

課題番号：15K15455

研究課題名(和文)放射線照射による癌リプログラミングと放射線耐性獲得の解明

研究課題名(英文)Acquiring radioresistance and cancer reprogramming after radiation to cancer cells

研究代表者

大久保 裕史(Okubo, Hirofumi)

大阪大学・医学部附属病院・医員

研究者番号：50740263

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,800,000円

研究成果の概要(和文)：放射線治療によって癌細胞が放射線治療抵抗性を獲得することは、過去の様々な研究結果から知られているが、その放射線治療抵抗性の獲得のメカニズムは明らかになったわけではない。本研究では、放射線治療によって腫瘍の中の癌幹細胞の割合が増加し、治療抵抗性になるのではないかと、という仮説のもとで研究を始めた。放射線耐性株をいくつかの癌細胞株で作成に成功したものの、作成に1年以上という想定外の期間を要した。それらを使い、実験を進めると放射線耐性株では癌幹細胞らしさが亢進していることが判明した。当初、ZEB1やmiR-200がこの癌幹細胞らしさに関わっているのではないかと予想していたが、必ずしもそうではなかった。

研究成果の概要(英文)：It is known from previous research results that cancer cells acquire resistance to radiation therapy by radiotherapy, but the mechanism of acquiring resistance to radiation therapy has not been elucidated. In this study, we started research under the hypothesis that radiation therapy would increase the proportion of cancer stem cells in the tumor and become resistant to treatment. Although it succeeded to create radiation resistant cell lines from several cancer cell lines, it took more than 1 year's unexpected period to prepare. Using them and proceeding with experiments, it turned out that cancer stem-like cells is increased in radioresistant cancer cells. Originally, we predicted that ZEB1 protein and microRNA-200 might be involved in reprogramming of cancer cells, but it was not necessarily the case. In the future, we plan to continue research to identify the key reprogramming factors.

研究分野：放射線生物学

キーワード：放射線治療 治療抵抗性 癌幹細胞

1. 研究開始当初の背景

現在、我が国において癌は2人に1人が罹患し、3人に1人の死因である。今後の高齢化で、癌を「切らずに治す」放射線治療への要請はますます高まると考えられる。放射線治療技術は劇的に進歩したものの難治性の癌は少なくなく、放射線治療の方法には改善の余地はある。

最近、癌幹細胞とよばれる放射線治療抵抗性、抗癌剤抵抗性の細胞集団の存在を示す報告が数多くなされ(Bao et al. Nature 2006 など)、放射線治療後の再発に関わると考えられている。我々のグループでも既に子宮頸癌、骨肉腫の癌幹細胞が放射線耐性であるという報告をしている(Tamari et al. Int J Oncol 2014, Hayashi et al. Int J Oncol 2014)。放射線治療成績のさらなる改善は、この癌幹細胞を根絶するようなアプローチが重要である。従来は「癌幹細胞から癌細胞」への一方的な分化が想定されていたが、最近になり癌細胞から癌幹細胞への転換(リプログラミング)を示唆する報告がなされた (Roesch et al. Cell 2010, Chaffer et al. PNAS 2011 など)。さらに、放射線照射による癌リプログラミングの報告もみられるようになった(乳癌: Lagadec et al. Stem Cells 2012, 肝細胞癌: Ghisolfi et al. Plos One 2012 など)。しかし、この放射線照射による癌細胞のリプログラミングの機序は全く明らかにされていない。

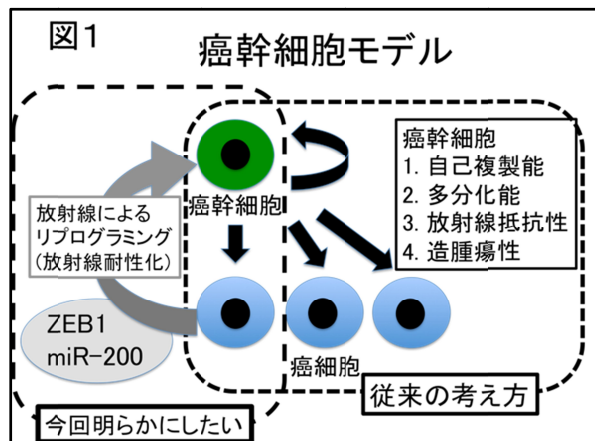
そこで我々が着目したのは癌細胞における ZEB1 の役割である。ZEB1 は癌のリプログラミングに関わるということが示されており(Chaffer et al. Cell 2013)、また ZEB1 はごく最近に新たな放射線耐性の因子(DNA 修復に必要なタンパク)としての働きが報告された(Zhang et al. Nat Cell Biol 2014)。したがって、この ZEB1 が放射線による癌リプログラミングに重要な役割を果たしている可能性がある。また ZEB1 の抑制因子として microRNA(miR)の miR-200 が報告されている(Park et al. Genes Dev 2008)。miR-200 は ZEB1 抑制を介した放射線耐性低下との関連が予想されるが、これまでに報告はない。

本研究によって、放射線照射による癌リプログラミングによる放射線耐性化の機序が明らかになれば、従来考えられてきた癌幹細胞を標的とした治療に加えて、癌細胞にリプログラミングを起こさないようにする新しい治療法を開発することで、効果的な放射線治療法を提案できる可能性がある。

2. 研究の目的

癌幹細胞が放射線治療抵抗性であることを示す報告は多く、癌の放射線治療抵抗性の機序として重要と考えられる。従来は癌幹細胞から癌細胞への不可逆的な分化が想定されてきたが、放射線照射によって非癌幹細胞が癌幹細胞へ転換(リプログラミング)する現象が近年報告された。したがって、放射線治療の治療効果改善のためには、従来考えられ

てきた癌幹細胞を標的にするだけでなく、このリプログラミングを阻止する方法も重要と考えられる。近年の報告から、標的として ZEB1、miR-200 が重要である可能性があり、本研究ではそこに焦点を当て、放射線照射によって癌細胞がいかに癌幹細胞へリプログラミングされ、放射線耐性を獲得していくかを明らかにし、ZEB1 を標的としたリプログラミング阻害という新たな放射線増感剤開発を目指す(図1)。



3. 研究の方法

(1)放射線耐性株の樹立と ZEB1 上昇、癌幹細胞らしさの確認

放射線耐性株を樹立した研究は過去に様々報告があり、1回 2Gy で合計 60 から 80Gy 照射して樹立する方法や、1回 10Gy 程度の線量を複数回照射し樹立する方法が報告されている(Ogawa et al. Int J Oncol 2006, Fukada, et al. Br J Cancer 2004 など)。我々は既に1回 2Gy で合計 60Gy 照射をする方法で、子宮頸癌細胞株の一部で放射線耐性化に成功しており、耐性株における ZEB1 の遺伝子発現上昇を確認した。他の細胞株でも放射線耐性株を樹立し、それらで ZEB1 の遺伝子発現レベル、タンパクレベルが上昇しているかを PCR 法やウエスタンブロット法にて確認する。また、ZEB1 を抑制する miR-200 の発現も PCR 法で確認する。

また、放射線耐性株が癌幹細胞様の性質を獲得しているかの確認を行う。我々は既に放射線照射によって子宮頸癌細胞株の癌幹細胞の比率が上昇することを確認している。具体的には放射線耐性化が完了した時点で、親株と比べて癌幹細胞の比率が上昇しているかを、癌幹細胞マーカーを用いてフローサイトメトリーで確認をする。また癌幹細胞に特異的な遺伝子(Sox2, Nanog, Oct3/4 など)の発現が上昇しているかも合わせて確認する。他に、親株と放射線耐性株で、スフェアアッセイによる自己複製能の比較、抗癌剤耐性(MTT アッセイ)の比較、マウスの皮下腫瘍形成能の比較を行う。

(2)ZEB1 の過剰発現による放射線耐性の変化

子宮頸癌、膀胱癌、肺癌、骨肉腫の親株に ZEB1 の siRNA による遺伝子ノックダウンを行い、癌細胞の放射線耐性が下がるかどうかの確認と、逆に ZEB1 の遺伝子を細胞に導入し過剰発現すると放射線耐性の上昇がみられるかを、clonogenic survival assay で確認する。これに関しては乳癌細胞株においてすでに先行研究があり (Zhang et al. Nature Cell Biology 2014)、他の癌種でも同様の確認となる。

4. 研究成果

(1)放射線耐性株の樹立と ZEB1 上昇,癌幹細胞らしさの確認

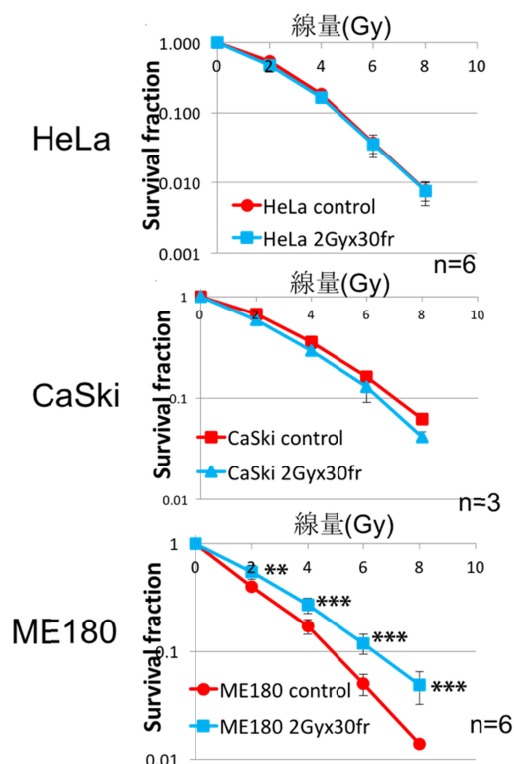


図 2. 放射線耐性株の作成

まず、60Gy を 30 分割で照射することで、放射線耐性株を ME-180 で樹立することに成功した。他の細胞株 (HeLa, CaSki) も作成を試みたものの、成功したのはこれらのみであった (図 2)。

ZEB1 の遺伝子発現については、ME180 では耐性株が親株に対して有意に発現が低かった。したがって、当初考えていた放射線耐性株で ZEB1 の遺伝子発現が高いのではないかという仮説は、違うということがわかった。miR-200c の発現については、ME180 で耐性株は親株に比べ有意に発現量が低下した。したがって、これについても当初考えていた放射線耐性株で miR200c が低いという仮説は、違っていたことがわかった。(図 3)

放射線耐性株でのスフェアフォーメーションアッセイを行い、放射線耐性株で有意にスフェア系性能が高いことがわかった (図 4)。したがって、放射線耐性株では癌幹細胞

胞性が上がることが示された (図 4)。

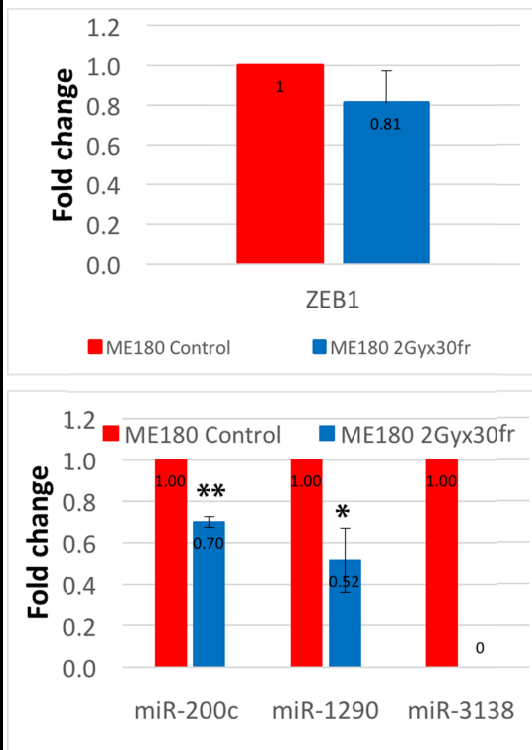


図 3. 放射線耐性株での ZEB1, miRNA の発現

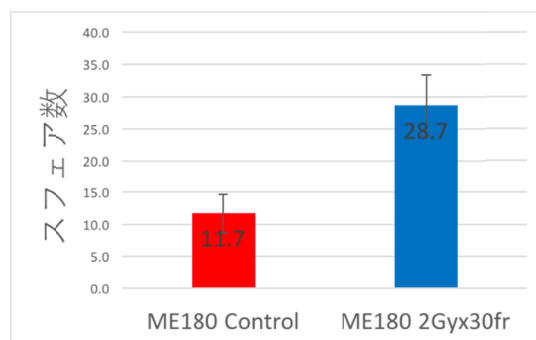


図 4. 放射線耐性株でのスフェア形成能

(2)ZEB1 の過剰発現による放射線耐性の変化

ZEB1 の強制発現株の作成を試みたものの、薬剤選択後の (ZEB1 強制発現されているはずの) 細胞株で ZEB1 の発現亢進がみられず、当初予定していた ZEB1 強制発現細胞株での放射線感受性変化を見ることができなかった。

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 0 件)

〔学会発表〕(計 0 件)

〔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

大久保裕史 (Hirofumi Okubo) (大阪大学医学部附属病院・放射線治療科・医員)

研究者番号：50740263

(2) 研究分担者

瀬尾 雄二 (Yuji Seo) (大阪大学大学院医学系研究科・放射線治療学・助教)

研究者番号：00302000

玉利 慶介 (Keisuke Tamari) (大阪大学大学院医学系研究科・放射線治療学・特任助教)

研究者番号：30718995

(3) 連携研究者

石井秀始 (Hideshi Ishii) (大阪大学大学院医学系研究科・癌創薬プロファイリング学・特任教授(常勤))

研究者番号：10280736

(4) 研究協力者

小川 和彦 (Kazuhiko Ogawa) (大阪大学大学院医学系研究科・放射線治療学・教授)

研究者番号：40253984