

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 8 月 9 日現在

機関番号：72602

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2015～2016

課題番号：15K15467

研究課題名(和文)がん細胞のX線及び炭素イオン線抵抗性における細胞膜修復能に関する研究

研究課題名(英文) Investigation of plasma membrane repair in X-ray and C-ion resistant cancer cells

研究代表者

佐藤 克俊 (Katsutoshi, Sato)

公益財団法人がん研究会・有明病院 遺伝子診療部・研究員

研究者番号：20589650

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,300,000円

研究成果の概要(和文)：X線及び炭素イオン線抵抗性がん細胞株X60は細胞あたりのリソソーム、ATP、ミトコンドリア、活性酸素種含有量が有意に多く、これらに関わるmTORシグナリングがX線及び炭素イオン線抵抗性に深く関与することが示された。また、X60細胞はストレプトリジンOによって生じる細胞膜損傷に対して抵抗性であること、脂質ラフトの制御や細胞膜修復過程で起こるエンドサイトーシスに関わるFlottilin-1の細胞膜上のドメインが、通常培養状態から多いことが示された。この研究により、がん細胞のX線や炭素イオン線抵抗性には、脂質ラフトの形成やエンドサイトーシスなど細胞膜の代謝が関わる可能性が示された。

研究成果の概要(英文)：X-ray and carbon ion beam (C-ion) resistant cancer cell X60 abundantly contained lysosomes, ATP, mitochondria, and reactive oxygen species. In addition, mTOR signaling, which is associated with regulation of energy production, was promoted in X60 cells. Inhibition of the mTOR signaling significantly decreased the X-ray and C-ion resistance in X60 cells. Therefore our results showed that mTOR signaling contributes the X-ray and C-ion resistance in cancer cells. Furthermore, the X60 cells were significantly resistant to plasma membrane damage which is induced by Streptolysin O treatment. Our results indicated that the X60 cells have a lot of Flottilin-1 domain on plasma membrane, which closely associated with lipid raft formation and endocytosis. Given these results, regulation of plasma membrane including lipid raft formation and endocytosis might also contribute to X-ray and C-ion resistance in cancer cells.

研究分野：医歯薬学

キーワード：粒子線治療 炭素イオン線抵抗性がん細胞株 細胞膜修復

1. 研究開始当初の背景

放射線治療成績は向上したが、未だ局所制御率が低い症例も一部で存在している。この原因として腫瘍内の放射線抵抗性ががん細胞の存在が考えられる。さらに、治療成績を向上させるためには、がん細胞における X 線や炭素イオン線抵抗性の原因の解明が必要である。

2. 研究の目的

がん細胞における細胞膜修復の実験系を樹立し、がん細胞の放射線抵抗性にリソソームの細胞外放に伴う細胞膜損傷修復が関わるかどうか評価する。

3. 研究の方法

がん細胞株としてマウス扁平上皮がん細胞株 NR-S1、NR-S1 に対し 1 回 10Gy の X 線を合計 60Gy 照射して樹立したがん細胞株 X60 細胞及び 1 回 5Gy の炭素イオン線 (290MeV/n) を合計 30Gy 照射して樹立したがん細胞株 C30 細胞を用いた。X60 細胞は X 線及び炭素イオン線に対し抵抗性であり () 一方、C30 細胞は炭素イオン線のみに対し僅かな抵抗性を持つ (主な発表論文)。本研究では、始めに、これらの細胞学的性質を評価するためリソソーム、細胞内活性酸素種 (Reactive Oxygen Species; ROS)、アデノシン三リン酸 (ATP)、ミトコンドリア含有量を解析し、これらの生合成に関わる分子経路と、その障害が各細胞株の放射線抵抗性に与える影響を解析した。次に、細胞膜修復の実験系を樹立し、それを用いて各がん細胞の細胞膜修復能を評価した。

4. 研究成果

(1) リソソーム、ATP、ROS、ミトコンドリア含有量

放射線抵抗性ががん細胞株 X60 細胞は、NR-S1 細胞及び C30 細胞に比べて細胞内に空胞を多く持つことに着目した。この空胞はリソソームであることが示唆されたため、リソソームに集積する蛍光色素 LysoTracker Red DND-99 (LysoTracker) を細胞に投与し、フローサイトメーターによりその蛍光強度を測定した。その結果、X60 細胞における LysoTracker の蛍光強度は、NR-S1 細胞より約 4.8 倍高かった。一方、C30 細胞におけるその蛍光強度は、NR-S1 細胞とほぼ同等であった。この結果により X60 細胞は NR-S1 細胞や C30 細胞よりも細胞内にリソソームを多く持つことが示された。

リソソーム内には ATP が豊富に含まれていることが知られている。そこで、X60 細胞における ATP、ATP 産生を担うミトコンドリア、そして ATP 産生に伴う ROS の含有量を、それぞれ Luciferin-Luciferase アッセイ、フローサイトメーターによる mitotracker-Green FM、CellRox-Green からの蛍光強度測定により解析した。X60 細胞の ATP、ミトコンドリア及

び ROS 含有量は、それぞれ NR-S1 細胞より 10.5、1.8 及び 2.1 倍高かった。C30 細胞では、統計的有意差は無かったが、それぞれ 3.2、1.2、1.4 倍高かった。この結果より、X60 細胞ではリソソーム、ATP、ミトコンドリア及び ROS 含有量が他の細胞に比べて有意に高いことが示された。

(2) mTOR シグナリングの亢進

上記 (1) の結果は、X60 細胞はエネルギー代謝が他の細胞よりも高いことを示唆している。そこでエネルギー代謝に関係する mTOR (Mechanistic target of rapamycin) 及びそのシグナル経路の下流に位置する p70 S6K (Ribosomal protein S6 kinase B1) のタンパク質発現及びリン酸化についてウェスタンブロット法により解析した。その結果、X60 細胞では、mTOR の活性を決めるリン酸化部位セリン 2448 のリン酸化が他の細胞に比べて有意に高く、また p70 S6K のスレオニン 386 のリン酸化も高かった。この結果により、X60 細胞における顕著な X 線及び炭素イオン線抵抗性には mTOR シグナリングが関与していることが示された。

(3) ラパマイシンによる放射線増感作用

X60 細胞では mTOR シグナリングが亢進していることが示されたため、その阻害剤であるラパマイシンを投与することで X 線と炭素イオン線抵抗性が減少するかどうか評価した。各細胞株にラパマイシンを 100nM 投与し、その 24 時間後に X 線を 6Gy または炭素イオン線を 4Gy 照射し、その後コロニー形成法を行った。その結果、ラパマイシン投与により各細胞は顕著に X 線及び炭素イオン線増感された。特に X60 細胞では、ラパマイシン投与により X 線及び炭素イオン線感受性が、NR-S1 細胞と同等にまで減少した。この結果により、がん細胞に生じた X 線と炭素イオン線抵抗性には、mTOR シグナリングが深く関与していることが示された。

(4) 細胞膜修復能評価のための実験系

次にリソソームの増加に伴う細胞膜修復能の亢進を解析するための実験系の樹立を行った。はじめに、Adam らの研究 () を参考にして、ジギトニンによる細胞膜の損傷と、その後の細胞膜修復の観察を行った。しかし、ジギトニンは細胞膜の可溶化することから、その後の細胞膜の様子を観察することが困難であった。そこで、細胞膜に穿孔を与えることのできるストレプトリジン O (SLO) を用いることで、細胞膜穿孔後の修復能について解析した。

各細胞株を PBS (-) で 2 回洗浄し、PBS (-) により最終濃度 0.08ng/ml になるように調整した SLO を投与し、氷上で 10 分間培養し、次に 37°C で 10 分間培養した。次に培養液を 10% FBS (Fetal Bovine Serum) 含有ダルベッコ変法イーグル培地に置き換え、その直後から

細胞膜が穿孔した細胞を 5 μ g/ml のヨウ化プロピディウム (PI)により経時的にパルスラベリングし、細胞膜修復能を評価した。その結果、観察期間中、X60 細胞における PI 陽性細胞は NR-S1 や C30 細胞に比べて有意に低いことが示された。この結果は、X60 細胞は細胞膜穿孔に対しても抵抗性であることを意味している。

細胞膜修復は、穿孔後の細胞内への Ca²⁺イオンの流入と、それに次いで起こるリソソムの細胞外放出を伴うことが知られている()。そこで、細胞膜穿孔後の比較的早期の細胞内リソソムの分布を Lysotracker を用いた蛍光染色により解析した。その結果、NR-S1 及び C30 細胞では細胞膜穿孔 10 分後にリソソムが増加したが、X60 細胞では観察時間中のどの時点でも投与前とほぼ同様のリソソム分布を示した。X60 細胞では通常培養時でもリソソム含有量が他の細胞より有意に多いこと、細胞膜穿孔後の PI 陽性細胞がどの時間でも低いことを考えると、SLO による細胞膜穿孔に対して充分に対応できるだけの十分なリソソム量を有していることが示唆された。

(5) Synaptotagmin VII、Flottilin-1 の局在と細胞膜修復との関連

SLO は細胞膜のコレステロールに結合して細胞膜を穿孔する()。このような細胞膜損傷や穿孔は、その直後から上記(4)で述べたリソソムの放出のようなエキソサイトーシスにより修復される()。また、損傷した細胞膜はエンドサイトーシスにより除去されることも報告されている()。X60 細胞は他の細胞に比べて SLO による細胞膜穿孔に対して抵抗性であることは、X60 細胞の細胞膜のコレステロール画分が NR-S1 や C30 細胞と異なることを示唆している。また、X60 細胞では細胞あたりのリソソム含有量も多かったことは、他の細胞に比べて、エキソサイトーシスやエンドサイトーシスを含む細胞膜や細胞内小胞の制御機構に何らかの違いがあることを示している。

そこで、各細胞間における細胞膜損傷後のエキソサイトーシスやエンドサイトーシスの様子进行评估するため、Synaptotagmin VII と Flottilin-1 の細胞膜損傷前後の局在を解析した。Synaptotagmin VII は Ca²⁺イオンの細胞内流入により起こるエキソサイトーシスのマーカーであり()、Flottilin-1 は脂質ラフトのマーカーの一つと考えることができ、かつエンドサイトーシスにも関わっている()。細胞膜に存在する脂質ラフトは、細胞膜でもコレステロールに富むことから、Flottilin-1 が X60 細胞における細胞膜修復の解析に有用といえる。

研究成果(4)で求めた実験条件により各細胞に細胞膜穿孔を与え、その 20 分後に Synaptotagmin VII 及び Flottilin-1 の局在を蛍光免疫染色により評価した。これらは細

胞膜上に一様に、斑点状に分布している。ここでは、それを「ドメイン」と称する。解析の結果、Synaptotagmin VII はどの細胞においても細胞膜穿孔前後で変化がなかった。一方、細胞膜穿孔後における細胞膜上の Flottilin-1 ドメインは、穿孔前に比べて拡大、顕在化することが示された。特に、この Flottilin-1 ドメインの顕在化は、NR-S1 と C30 細胞で顕著だった。X60 細胞における Flottilin-1 ドメインは、その大きさが SLO 非投与時から NR-S1 と C30 細胞より大きく、SLO による細胞膜穿孔後にさらに拡大した。すなわち、X60 細胞では NR-S1 や C30 細胞に比べて通常状態で Flottilin-1 ドメインが多く、さらに細胞膜穿孔後にさらに増加することが示された。

Flottilin-1 は脂質ラフトに集積し、かつ、エンドサイトーシスに関わるタンパク質である()。これは、NR-S1 細胞や C30 細胞と比べて、X60 細胞の脂質ラフトの量が多く、かつ穿孔後のエンドサイトーシスが亢進している可能性があることを示している。研究成果(2)では、X60 細胞は mTOR シグナリングが亢進しており、これが X 線と炭素イオン線抵抗性の亢進に寄与することを示した。mTOR は細胞のエネルギー代謝だけでなく、脂質の合成も制御する。従って、X60 細胞における Flottilin-1 ドメインの増加は mTOR シグナリングの亢進に起因している可能性がある。脂質ラフトに制御や細胞膜損傷修復における mTOR シグナリングは、我々の知る限り未だ研究されていないことから、新しい細胞のストレス応答である可能性がある。

本研究の目的は、X 線及び炭素イオン線抵抗性における細胞膜修復の関与を明らかにすることである。このためには細胞膜修復の障害が X 線や炭素イオン線抵抗性に与える影響を評価する必要がある。この評価のため細胞膜の透過性を低下させることが出来るタンニン酸()、エキソサイトーシスを障害する Vacuolin-1()、リソソムの機能を障害するクロロキン()及び本研究で X60 細胞に対して顕著な X 線及び炭素イオン線増感作用を示したラパマイシンの細胞膜穿孔修復へ与える影響も解析したが、細胞膜穿孔後のこれらの薬剤の投与は細胞に対する毒性が高く、目的の現象を評価することができなかった。これは放射線照射による細胞膜の修復に関する研究を展開する上での課題として残された。また、細胞膜損傷後早期にエキソサイトーシスによる細胞膜の継当てがなされるが、この修復過程は一般的に数十秒後程度で終了する可能性が高く()、本研究で用いた解析装置では正確に解析することが難しかった。これら进行评估するためには、細胞膜損傷から修復までをリアルタイムに、かつ細胞膜を高分解能で評価可能な全反射照明顕微鏡などが必要である可能性がある。

(6) まとめ

本研究の成果を以下にまとめる。マウス扁平上皮がん細胞株 NR-S1 に対し、それぞれ X 線及び炭素イオン線を繰り返し照射することで樹立したがん細胞株 X60 及び C30 細胞を用いて、がん細胞における X 線及び炭素イオン線抵抗性機構について解析を行った。X 線と炭素イオン線に著しい抵抗性を持つ X60 細胞は、NR-S1 と C30 細胞に比べて細胞あたりのリソソーム、ATP、ミトコンドリア、ROS 含有量が有意に多かった。また、X60 細胞では mTOR のリン酸化が他の細胞に比べて亢進しており、mTOR シグナリングの阻害剤であるラパマイシンにより X 線及び炭素イオン線抵抗性を著明に減少させることができた。この研究によりがん細胞に生じる X 線及び炭素イオン線抵抗性には mTOR が深く関与していることが示された。

さらに、細胞膜修復能を解析するための実験系を樹立し、X60 細胞における細胞膜損傷について解析した。その結果、X60 細胞は NR-S1 と C30 細胞に比べて SLO によって生じる細胞膜穿孔に著しく抵抗性であることが示された。X60 細胞は通常培養時から細胞内のリソソームが多かったが、細胞膜穿孔に伴って生じるリソソームの増加は X60 細胞よりも NR-S1 と C30 細胞で多くみられた。X60 細胞における細胞膜修復について更に評価するため、リソソームの合成や放出にも関連するエキソサイトーシスやエンドサイトーシスについてそれぞれのマーカーと考えられる Synaptotagmin VII と Flotillin-1 の局在を解析した。その結果、NR-S1 や C30 細胞に比べて X60 細胞では通常培養状態でも細胞膜上の Flotillin-1 ドメインが明瞭に確認でき、細胞膜穿孔後にはさらに Flotillin-1 ドメインが拡大した。この結果により X60 細胞では脂質ラフトの制御や細胞膜損傷修復に伴うエンドサイトーシスが亢進していることが示唆された。

<引用文献>

- K. Sato, et al. Heterochromatin domain number correlates with X-ray and carbon-ion radiation resistance in cancer cells. *Radiat. Res.*, 182, 408-19, 2014.
- S. A. Adam, et al. Nuclear protein import in permeabilized mammalian cells requires soluble cytoplasmic factors. *J. Cell Biol.*, 111, 807-16, 1990.
- A. Reddy, et al. Plasma membrane repair is mediated by Ca²⁺-regulated exocytosis of lysosomes. *Cell*, 106, 157-69, 2001.
- M. Palmer, et al. Assembly mechanism of the oligomeric streptolysin O pore: the early membrane lesion is lined by a free edge of the lipid membrane and is extended gradually

during oligomerization. *EMBO J.*, 17, 1598-605, 1998.

V. Idone, et al. Repair of injured plasma membrane by rapid Ca²⁺-dependent endocytosis. *J Cell Biol.* 180, 905-14, 2008.

M. Corrotte, et al. Toxin pores endocytosed during plasma membrane repair traffic into the lumen of MVBs for degradation. *Traffic*. 13, 483-94, 2012.

I. Martinez, et al. Synaptotagmin VII regulates Ca²⁺-dependent exocytosis of lysosomes in fibroblasts. *J Cell Biol.*, 148, 1141-49, 2000

O. O. Glebov, et al. Flotillin-1 defines a clathrin-independent endocytic pathway in mammalian cells. *Nat. Cell Biol.*, 8, 46-54, 2006.

J. Cerny, et al. The small chemical vacuolin-1 inhibits Ca²⁺-dependent lysosomal exocytosis but not cell resealing. *EMBO Rep.*, 5, 883-8, 2004.

H. Zhao, et al. Chloroquine-mediated radiosensitization is due to the destabilization of the lysosomal membrane and subsequent induction of cell death by necrosis. *Radiat. Res.*, 164, 250-7, 2005.

T. Castro-Gome, et al. Plasma Membrane Repair Is Regulated Extracellularly by Proteases Released from Lysosomes. *PLoS One*. 11, e0152583, 2016.

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 2件)

S. J. Baek, K. Sato, N. Nishida, J. Konishi, R. Azuma, K. Kawamoto, M. Konno, K. Hayashi, T. Satoh, Y. Doki, M. Mori, H. Hideshi, K. Ogawa, MicroRNA miR-374, a potential radiosensitizer for carbon ion beam radiotherapy. *Oncol. Rep.*, 36, 2016, 2946-2950.

K. Sato, M. Nishikino, T. Kawachi, T. Shimokawa, T. Imai, T. Teshima, H. Nishimura, M. Kando, A laser-plasma-produced soft X-ray laser at 89 eV generates DNA double-strand breaks in human cancer cells. *J. Radiat. Res.*, 56, 2015, 6433-638.

[学会発表](計 5件)

K. Sato, R. Azuma, L. Ma, T. Shimokawa, T. Imai, mTOR phosphorylation is a key

factor of acquired radioresistance. The 41st Naito Conference, July 5, Chateraise Gateaux Kingdom SAPPORO (Sapporo, Hokkaido).

K. Sato, L. Ma, T. Imai, T. Shimokawa, Homologous recombination repair is enhanced in X-ray and carbon ion beam resistant cancer cells. The 74th Annual Meeting of the Japanese Cancer Association, Oct. 8, 2015, Nagoya Congress Center (Nagoya, Aichi)

S. J. Beak, H. Ishi, N. Nishida, M. Konno, J. Koseki, K. Sato, Y. Doki, M. Mori, K. Ogawa, Microarray analysis of radiation resistant mouse squamous cancer cell lines. The 74th Annual Meeting of the Japanese Cancer Association, Oct. 8, 2015, Nagoya Congress Center (Nagoya, Aichi)

K. Sato, L. Ma, Y. Sakamoto, T. Imai, T. Shimokawa. Repeated g-ray irradiation but not C-ion irradiation promotes malignant progression of regrown tumor. 15th International Congress of Radiation Research, May 25, 2015, Kyoto International Conference Center (Sakyo-ku, Kyoto).

S. J. Baek, H. Ishii, K. Sato, K. Tamari, K. Hayashi, N. Nishida, M. Kondo, J. Koseki, K. Kawamoto, M. Mori, K. Ogawa, Microarray analysis of radioresistant mouse squamous cell carcinoma: Comparison of X-ray resistance and Carbon-ion beam resistance, 15th International Congress of Radiation Research, May 25, 2015, Kyoto International Conference Center (Sakyo-ku, Kyoto).

6. 研究組織

(1) 研究代表者

佐藤 克俊 (KATSUTOSHI, Sato)
公益財団法人がん研究会がん研有明病院遺
伝子診療部・研究員

研究者番号：20589650

(2) 研究分担者

下川 卓志 (TAKASHI, Shinokawa)
国立研究開発法人量子科学技術研究開発機
構・放射線医学総合研究所・放射線障害治療
研究部・主任研究員 (定常)

研究者番号：20608137