

令和元年6月17日現在

機関番号：82502

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2015～2018

課題番号：15K19833

研究課題名(和文)リアルタイムイメージング法を用いた放射線抵抗性浸潤細胞の解析

研究課題名(英文) Analysis of radio-resistant and highly invasive cells with using real-time imaging system

研究代表者

藤田 真由美 (Fujita, Mayumi)

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：80580331

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,000,000円

研究成果の概要(和文)：放射線治療では、治療後の浸潤、転移をいかに抑制できるかが重要である。申請者らは、PANC-1細胞は放射線を受けた後、浸潤細胞の数が増加することを見出した。そこで本課題では、放射線照射後に生き残り、高い浸潤能を示す細胞の特徴をリアルタイム観察像から解析し、これら放射線抵抗性浸潤細胞は、元々浸潤能が高かったのか、もしくは照射後のストレス応答の過程で浸潤能を獲得したのか調べた。その結果、PANC-1には元々浸潤能が高い集団が存在し、放射線に抵抗性であったため放射線照射後に選択的に生き残ったことが示唆された。またグルタチオン合成阻害剤により、この集団の浸潤能を効率良く抑制できることを見出した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

放射線治療は侵襲のない局所療法であり重要ながん治療法のひとつであるが、今後、生存率をさらに向上させるためには、治療後の再発及び浸潤、転移をいかにして抑制できるかが課題である。我々はこれまでに、炭素イオン線照射はX線に比べ、大多数の癌細胞株の浸潤抑制に効果的であるが、PANC-1など特定の細胞株では浸潤細胞の数が増加することを見いだした。照射によるストレスに打ち勝ち、高い浸潤能を示す放射線抵抗性浸潤細胞は、放射線治療後の再発や浸潤転移につながる可能性が考えられ、これら細胞を効率良く抑制することは極めて重要である。よって本研究の結果は、放射線治療の発展につながる社会的意義が高い成果である。

研究成果の概要(英文)：Radiotherapy is one of the important therapeutic option for cancer treatment. However, metastasis is still the main cause of mortality in cancer patients. We previously reported that number of invasive cells were increased after C-ion irradiation on human pancreatic cancer cell line, PANC-1. In order to block these radio-resistant highly invasive PANC-1 cells, in this study, we established the live cell imaging system and examined the specific phenotype of radiation-survived PANC-1 cells. We found that a distinct population of high invasive cells within whole-cultured PANC-1, and these cells were also resistant to radiation. These radio-resistant highly invasive cells experienced higher oxidative stress, showing lower GSH/GSSG ratios, but also greater resistance to it. Overall, we proposed that the treatment of PANC-1 cells with L-buthionine-sulfoximine (BSO), the inhibitor of GSH biosynthesis, was effective to reduce the intercellular GSH content as well as their invasion.

研究分野：放射線生物学

キーワード：放射線がん治療 細胞浸潤

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19、CK - 19 (共通)

### 1. 研究開始当初の背景

放射線がん治療は侵襲のない局所療法であり、重要ながん治療のひとつである。放医研では、X線がん治療に加え、1994年より重粒子線治療を開始しており、2014年の時点では約8200人のがん患者が治療され、高い抗腫瘍効果が示されてきた。生存率をさらに向上させるためには、治療後の再発及び浸潤、転移をいかにして抑制できるかが重要である。申請者らは、31種のヒト癌由来細胞株を用いた検討により、炭素イオン線照射はX線照射に比べ、大多数の癌細胞株の浸潤抑制に効果的であるが、3種類の異なる細胞株では浸潤細胞数が増加することを見いだした。なぜ特定の細胞株では、放射線を受けた後に浸潤する細胞数が増加するのか。これまで申請者が解析してきた癌細胞の浸潤応答は、照射後2日目に得た結果である。すなわち、照射後2日目の時点で死なずに生き残った細胞の応答を検出している。このような、照射によるストレスに打ち勝ち、なおかつ高い浸潤能を示す「放射線抵抗性浸潤細胞」とはどのような細胞なのか。元々放射線に抵抗性で、かつ、浸潤能が高い細胞集団が選択的に生き残ったのか、または、照射を受けた後のストレス応答に付随して、新たに高い浸潤能を獲得したのか、その詳細は明らかではない。また、これら放射線抵抗性浸潤細胞は放射線治療の際も抵抗性を示す可能性が考えられることから、これら細胞集団が照射後どのような過程を経て存在するようになるのか調べ、その特徴から放射線抵抗性浸潤細胞を効率よく殺傷する方法を提案することは非常に重要である。

本研究では、放射線抵抗性浸潤細胞がどのように生じたのか明らかにするため、照射後の細胞応答をリアルタイムに観察することを計画した。細胞のストレス応答では、細胞内小器官である小胞体とミトコンドリアが重要な役割を担っている。細胞がストレスに打ち勝ち生存できるか、もしくはアポトーシスへ向かうかは、小胞体ストレスで特徴的なシグナル伝達系の活性化や、小胞体から細胞質やミトコンドリアへ放出されるカルシウムのシグナルが重要である。またこの過程では、小胞体とミトコンドリアの結合という物理的なコンタクトも必須となる。さらに、小胞体からミトコンドリアへのカルシウムシグナルは、ミトコンドリアのエネルギー産生効率を変化させることも知られており、その後の細胞運動能にも深く関わっている。そのため本研究では、照射を受けた細胞の小胞体やミトコンドリアを蛍光ラベルし、カルシウムの流れとともに細胞内小器官の挙動や細胞の運動能をリアルタイムに観察する。これにより、放射線照射後に生き残り、なおかつ高い運動能を示す細胞の特徴を見いだす。また、観察像より、放射線抵抗性浸潤細胞は、元々運動・浸潤能が高い集団が放射線にも抵抗性で生き残ったのか、もしくは照射後のストレス応答の過程で新しく浸潤能を獲得したのか、明らかにする。さらに、放射線抵抗性浸潤細胞の浸潤を効率よく抑制するための方法を提案する。

### 2. 研究の目的

本研究では、放射線照射後に生き残り、なおかつ高い浸潤能を示す細胞の特徴をリアルタイム観察像からヒントを得て解明すること、またこれら放射線抵抗性浸潤細胞は、元々浸潤能が高かったのか、もしくは照射後のストレス応答の過程で高い浸潤能を獲得したのか、明らかにする。さらに、の結果から、放射線抵抗性浸潤細胞の浸潤を効率よく抑制するための方法を提案する。

### 3. 研究の方法

本研究では、炭素イオン線照射後に浸潤細胞数が増加する PANC-1 を用い実験を行った。

初年度(平成27年度)

(1) ストレス応答で重要な細胞内小器官を蛍光ラベルし、リアルタイムに観察する系を確立する

細胞の小胞体及びミトコンドリアを、ER-Tracker™ 及び MitoTracker を用いて蛍光ラベルする。ラベルした細胞を IncucyteZoom 生細胞イメージングシステムを用いてリアルタイムに撮影し、小胞体及びミトコンドリアの挙動を、細胞の動きと合わせて観察する系を確立する。

また、細胞内のカルシウムイオンの濃度変化について蛍光強度の変化で観察できる試薬 (Calcium Kit - Fluo 4) を用い、細胞内小器官と共に細胞内のカルシウムの流れをリアルタイムに観察できる系を立ち上げる。

(2) X線または炭素イオン線照射後に蛍光ラベルした細胞をリアルタイムに観察し、照射後に生き残れる細胞と細胞死へ向かう細胞の違いを明らかにする。

X線または炭素イオン線照射後に蛍光ラベルした細胞を細胞内小器官の挙動やカルシウムの流れの特徴から明らかにする。小胞体とミトコンドリアの形態や数、動きの違いはあるか、小胞体とミトコンドリアのコンタクトは確認されるか、小胞体からミトコンドリアへのカルシウムの放出は認められるか観察する。

平成28年度以降

(3) リアルタイムイメージング像から予測されるストレス応答系に関連する因子の発現変化を調べ、照射に打ち勝ち生存できる細胞群の特徴を調べる

例えば、生存する細胞で、ミトコンドリアの形態や量がアポトーシス誘導細胞と違う場合は、ミトコンドリアの融合や分裂、動きを制御する遺伝子(融合関連や GTPase 群、細胞骨格関連)に焦点をあてる。小胞体からミトコンドリアのコンタクトが確認されないのであれば、その結

合を制御する遺伝子 (PACS2 や Grp75 等) に焦点をあてる。コンタクトは確認されるがミトコンドリアへ放出されるカルシウム量が少ないのであれば、カルシウム放出を制御する遺伝子 (Ca<sup>2+</sup> ポンプ関連等) に焦点をあてる。

(4)生き残った細胞群の特徴から、放射線抵抗性浸潤細胞は元々高い浸潤能を有する細胞集団が放射線に抵抗性であったために選択的に生き残ったのか、もしくは、元々は高い浸潤能を有していなかった細胞群が照射後のストレス応答の過程で高浸潤能を獲得したのか、明らかにする。

放射線抵抗性な高浸潤細胞群が存在し照射後にそれらが選択的に生き残っていた場合：放射線抵抗性な高浸潤細胞群のイメージング観察から得られた特徴に着目し、関与遺伝子の siRNA もしくはその遺伝子産物の機能を抑制する阻害剤を用いて、これら細胞群を効率よく殺傷する方法を調べる。

照射後のストレス応答の過程で細胞運動能が活性化していた場合：リアルタイムイメージングから、照射後どのタイミングで運動能が活性化するのか、明らかにする。ストレス応答系のどのステップが細胞運動能変化と関連しているか、イメージングから予測し、ストレス応答と細胞運動をリンクさせているパスウェイ遺伝子を調べる。

(5)放射線抵抗性浸潤細胞の抑制方法の提案につながるデータを取得する

(1)-(4)の結果から見出された放射線抵抗性浸潤細胞の特徴から、この細胞集団を効率良く抑制する方法を提案する。

#### 4. 研究成果

(1)ストレス応答で重要な細胞内小器官を蛍光ラベルし、リアルタイムに観察する系を確立する

(2)X線または炭素イオン線照射後に蛍光ラベルした細胞をリアルタイムに観察し、照射後に生き残れる細胞と細胞死へ向かう細胞の違いを明らかにする。

まず、PANC-1 細胞のミトコンドリアを蛍光染色し、照射後の挙動をリアルタイムに観察する系を立ち上げた。同時に、細胞の運動能を評価するため、96 well plate を用いたスクラッチアッセイ (創傷治癒アッセイ) をリアルタイムで観察する系を立ち上げた。その結果、照射後に生き残り高い運動能を示す細胞群では、ミトコンドリアの強固な染色像が確認されることが明らかとなった。また興味深いことに、細胞の移動方向にミトコンドリアが集積することを見いだした。ミトコンドリアは、細胞の ATP 産生において非常に重要な酸化的リン酸化の場である。本実験で用いたミトコンドリアの蛍光染色試薬は、酸化的リン酸化が活性化しているミトコンドリアでより強い蛍光を発する試薬であったため、照射後に生き残り、高い運動能を示す細胞群では、酸化的リン酸化による ATP 産生が亢進していた可能性が示唆された。また本課題では、ミトコンドリアの他に、小胞体についても蛍光ラベルし、カルシウムの流れとともに細胞内小器官の挙動や細胞の運動能をリアルタイムに観察することを試みた。しかし、小胞体やカルシウムの染色は、蛍光の退色が早く、試薬の細胞毒性が非常に強かったため、ミトコンドリアのように安定した染色像を得ることができず、試行錯誤したが、リアルタイムで観察することはできなかった。

(3)リアルタイムイメージング像から予測されるストレス応答系に関連する因子の発現変化を調べ、照射に打ち勝ち生存できる細胞群の特徴を調べる

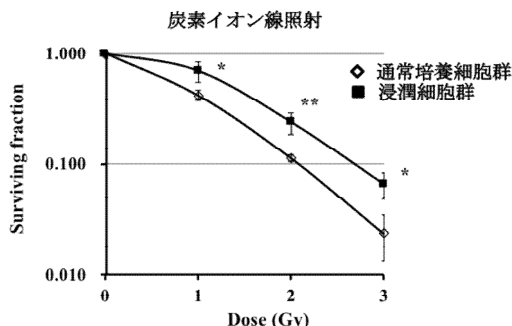
(1)(2)の結果より、PANC-1 細胞全体の中で、特に照射後に生き残り、高い運動能を示す細胞集団では、ミトコンドリアによる酸化的リン酸化が亢進していた可能性が示唆された。そのため、H28 年度は酸化的リン酸化の阻害剤である Rotenone を用い、PANC-1 の浸潤が抑制できるが検証した。Rotenone の添加により、PANC-1 の浸潤能は 46%低下したことから、PANC-1 は浸潤する際、確かに酸化的リン酸化由来の ATP を利用していることが示唆された。また、酸化的リン酸化が活性化している細胞では、電子伝達系の過程で活性酸素が産生されることが知られている。我々は、PANC-1 細胞全体の集団のうち、浸潤能を有する細胞集団をトランスウェルから回収し、活性酸素の除去で重要な因子である、還元型グルタチオン (GSH) 及び、酸化型グルタチオン (GSSG) の産生量を測定した。それらの量比は、細胞の酸化ストレスの指標となることが知られているが、PANC-1 浸潤細胞では、還元型グルタチオン (GSH) / 酸化型グルタチオン (GSSG) 比が有意に低下すること、すなわち、通常培養細胞群と比べ、より高い酸化ストレスがかかっていることを見出した。

(4)生き残った細胞群の特徴から、放射線抵抗性浸潤細胞は元々高い浸潤能を有する細胞集団が放射線に抵抗性であったために選択的に生き残ったのか、もしくは、元々は高い浸潤能を有していなかった細胞群が照射後のストレス応答の過程で高浸潤能を獲得したのか、明らかにする。

これまでの結果を総合し、PANC-1 細胞全体の集団のうち、浸潤能を有する細胞群は、酸化的リン酸化が活性化しており、活性酸素による酸化ストレスにさらされていること、また、同時に高い抗酸化能力も持つため、そのようなストレス下でも生存・浸潤できるのではないかということが予想された。抗酸化能力が高い細胞は、放射線に対しても抵抗性である可能性が考えられる。そこで次に、PANC-1 全体の集団の中で特に高い浸潤能を有する細胞集団が、放射線に対しても抵抗性を示すか、コロニーフォーメーションアッセイにより検証した。その結果、浸潤

細胞群は、通常培養細胞群よりも特に炭素イオン線に対し抵抗性であることが明らかとなった(図1)。これらの結果から、放射線照射後に生き残り高い浸潤能を示す放射線抵抗性浸潤細胞は、照射のストレス応答の過程で新しく浸潤能を獲得したのではなく、元々高い浸潤能を有する細胞集団が放射線に抵抗性であったために選択的に生き残った集団であることが示唆された。

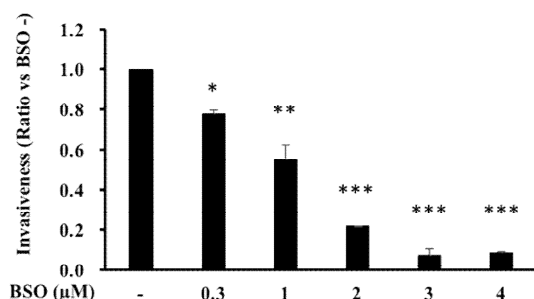
<図1:炭素イオン線照射に対する抵抗性の比較(通常培養細胞群 vs 浸潤細胞群)>



#### (5)放射線抵抗性浸潤細胞の抑制方法の提案につながるデータを取得する

本研究により、放射線抵抗性浸潤細胞は、との特徴として酸化リン酸化を利用していること、そのため活性酸素による酸化ストレスにさらされているが、同時に高い抗酸化能力も持つことが予想された。そこで、放射線抵抗性浸潤細胞の浸潤能を抑制する薬剤として、抗酸化能力で重要となるグルタチオンの合成阻害薬剤 L-buthionine-sulfoximine (BSO)に着目した。BSOを用い、浸潤アッセイをしたところ、BSOの添加により浸潤細胞の浸潤を効率よく抑制できることを見出した(図2)。本研究課題により、放射線抵抗性浸潤細胞の特徴が明らかとなり、放射線照射後の浸潤抑制に効果的な阻害剤の候補を提案することができた。

<図2:浸潤抑制におけるBSOの効果>



## 5. 主な発表論文等

[雑誌論文](計 6 件)

**Fujita M**, Somasundaram V, Basudhar D, Cheng RYS, Ridnour LA, Higuchi H, Imadome K, No JH, Bharadwaj G, Wink DA., Role of nitric oxide in pancreatic cancer cells exhibiting the invasive phenotype., *Redox Biol.* 2019 Apr;22:101158.doi: 10.1016/j.redox.2019.101158.

Somasundaram V, Basudhar D, Bharadwaj G, No JH, Ridnour LA, Cheng RYS, **Fujita M**, Thomas DD, Anderson SK, McVicar DW, Wink DA., Molecular Mechanisms of Nitric Oxide in Cancer Progression, Signal Transduction, and Metabolism., *Antioxid Redox Signal.* 2019 Mar 10;30(8):1124-1143. doi: 10.1089/ars.2018.7527.

Basudhar D, Bharadwaj G, Somasundaram V, Cheng RYS, Ridnour LA, **Fujita M**, Lockett SJ, Anderson SK, McVicar DW, Wink DA., Understanding the tumour micro-environment communication network from an NOS2/COX2 perspective., *Br J Pharmacol.* 2019 Jan;176(2):155-176. doi: 10.1111/bph.14488.

**Fujita M**, Imadome K, Imai T., Metabolic characterization of invaded cells of the pancreatic cancer cell line, PANC-1., *Cancer Sci.* 2017 May;108(5):961-971. doi: 10.1111/cas.13220.

**Fujita M**, Yamada S, Imai T., Irradiation induces diverse changes in invasive potential in cancer cell lines., *Semin Cancer Biol.* 2015 Dec;35:45-52.doi: 10.1016/j.semcancer.2015.09.003.

**Fujita M**, Imadome K, Shoji Y, Isozaki T, Endo S, Yamada S, Imai T., Carbon-Ion Irradiation Suppresses Migration and Invasiveness of Human Pancreatic Carcinoma Cells MIA PaCa-2 via Rac1 and RhoA Degradation., *Int J Radiat Oncol Biol Phys.* 2015 Sep 1;93(1):173-80. doi: 10.1016/j.ijrobp.2015.05.009.

〔学会発表〕(計 4 件)

**Fujita M**, Somasundaram V, Basudhar D, Cheng RYS, Ridnour LA, Wink DA., Role of nitric oxide in pancreatic cancer cells exhibiting the invasive phenotype., ポスター発表(英語), The 18<sup>th</sup> Annual CCR-FYI Colloquium, 2018-03-02

今留香織, **藤田真由美**., 癌細胞の集団遊走におけるミトコンドリアの細胞内局在, ポスター発表, 第 39 回日本分子生物学会年会, 2016-12-02

**Fujita M**, Imai T., Role of Rac1 activity in invasiveness of human pancreatic cancer cell lines irradiated with carbon-ion beams., 口頭発表(英語), 第 74 回日本癌学会学術総会 2015-10-08

**Fujita M**, Imadome K, Shoji Y, Imai T., Effects of Irradiation on Cellular Invasiveness with Regard to Cancer Cell Heterogeneity., 口頭発表(英語), 15th International Congress of Radiation Research (ICRR 2015), 2015-05-26

〔図書〕(計 0 件)

〔産業財産権〕

出願状況(計 0 件)

取得状況(計 0 件)

〔その他〕

メディア掲載

**Fujita M**, Distinct Metabolic Profiling of Invading PANC-1 Pancreatic Cancer Cells, *Nature.com webcasts*, 2018-09

6 . 研究組織

(1) 研究分担者

研究分担者氏名 : なし

(2) 研究協力者

研究協力者氏名 : なし