

令和 元年 6 月 17 日現在

機関番号：82502

研究種目：国際共同研究加速基金（国際共同研究強化）

研究期間：2016～2018

課題番号：15KK0323

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（国際共同研究強化）

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

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） 10,600,000円

渡航期間： 12ヶ月

研究成果の概要（和文）：がんの放射線治療では、技術の進歩により効果的な原発巣の殺傷効果が得られるようになってきたが、今後さらに高い生存率を得るためには、治療後の再発や浸潤・転移をいかに抑制できるかが課題である。申請者らは、ある特定の細胞株では細胞全体の集団の中に、放射線に抵抗性で、かつ、高い浸潤能を有する「放射線抵抗性浸潤細胞」が存在する事を発見した。この細胞集団は、放射線に打ち勝ち生き残り、浸潤転移の原因になる可能性が考えられる。本研究により「放射線抵抗性浸潤細胞」は一酸化窒素を産生していること、また、マウスを用いた実験から、一酸化窒素の合成阻害剤が「放射線抵抗性浸潤細胞」の転移の抑制に効果的であることを見出した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

がん放射線療法は侵襲のない局所療法であり、高齢化社会に移行しつつある日本では重要な治療法の一つである。中でも重粒子線治療装置は1993年に世界で初めて放医研に設置され、世界から注目されている。このような日本発の高いポテンシャルを有した放射線がん治療をさらに発展させる為、本研究では米国の癌研究の拠点であるNIHの著名な研究者と共同研究を行い、放射線に抵抗性でかつ高い浸潤転移リスクを持つ細胞集団を効率良く抑制する方法を見出した。本研究で得られた成果及び強固な国際ネットワークは、今後世界へ向けた粒子線研究の発展の架け橋となり、日本を中心とした国際ネットワークの飛躍的な拡充にも繋がるものと期待できる。

研究成果の概要（英文）：Radiation therapy has emerged as an important therapeutic option for advanced cancers. However, it is also known that some malignant tumors exhibit resistance to radiotherapy. In addition, metastasis is the main cause of patient mortality as it is extremely difficult to treat. Thus, understanding the characteristics of the cancer cell population that exhibits radio-resistant and highly invasive phenotype is fundamental for further developing radiation therapy. Herein, we establish that invasive cell phenotype that leads to the metastatic spread of pancreatic cancer is a discernible and persistent phenotype that is resistant to radiation. This phenotype showed upregulation of nitric oxide (NO) production, and was effectively targeted using a NO synthase inhibitor for improved therapy response in mouse model by reversing the metastatic potential. Our results convincingly establish that inhibition of NO production is a viable therapeutic option to improve efficacy of radiation therapy.

研究分野：放射線生物学

キーワード：放射線がん治療 浸潤 転移

1. 研究開始当初の背景

がんの放射線治療では、技術の進歩により効果的な原発巣の殺傷効果が得られるようになってきたが、今後さらに高い生存率を得るためには、治療後の再発や浸潤・転移をいかに抑制できるかが課題である。申請者らはヒト癌細胞株 31 種を用いた研究により、炭素イオン線照射は大多数の細胞株の浸潤抑制に効果的であるが、PANC-1 など、ある特定の細胞株では浸潤細胞数が増加することを明らかにした。この浸潤変化は、照射後 2 日目に得られた結果である。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、生き残り、さらに高い浸潤能を示す「放射線抵抗性浸潤細胞」とはどのような細胞群なのか？ PANC-1 を用いた研究により、放射線抵抗性浸潤細胞は一酸化窒素(NO)を産生していること、また、NO 合成阻害剤により、これら細胞群の浸潤能を抑制できることを見出した。では、NO は放射線抵抗性浸潤細胞の浸潤能にどう関わるのか。この研究の最終目的は、臨床応用を視野に放射線抵抗性浸潤細胞の抑制方法を提案することである。そのためには、*in vitro*の研究にとどまらず、放射線抵抗性浸潤細胞が実際に腫瘍組織でどのような挙動を示すか、より生体環境に近い 3D のアッセイ系や *in vivo*の実験系を用い、浸潤・転移能を検証する必要がある。さらに、放射線抵抗性浸潤細胞の浸潤・転移能における NO の意義を調べ、その阻害剤が 3D のアッセイ系や *in vivo*の実験系でも効果的か明らかにする必要がある。この研究を格段に進展させるため、国際共同加速基金にて、アメリカ国立衛生研究所(NIH)、国立癌研究所(NCI)の Wink A. David 博士と共同研究を計画した。Wink 博士は NO 研究の世界的権威であり、*in vitro*、*in vivo*両方の系を用いて NO が癌の成長や転移に与える影響を調べ、数々の著名な国際雑誌に報告している。NO は不安定な分子で、その扱いは非常に難しい。Wink 博士のラボに滞在し、直接 NO 実験のノウハウを学び、共に新しいアッセイ系を立ち上げられれば、本研究は格段に進展するものと考えられる。さらに、Wink 博士は米国の癌研究の拠点である NIH、NCI の Molecular Mechanism Section の代表であり、米国内で広い研究ネットワークを有している。本共同研究にて、我々の持つ繊細な実験技術と、Wink 博士らの膨大な知識や経験があわさり、放射線がん治療の発展に役立つ基礎データの基盤を構築できれば、その成果は世界へ向けた放射線がん研究の発展の架け橋となり、日本を中心とした国際ネットワークの飛躍的な拡充にも繋がるものと期待される。以上の理由から、国際共同加速基金にて、Wink A. David 博士との共同研究を計画した。

2. 研究の目的

本研究では、Wink 博士らと共に、放射線抵抗性浸潤細胞における NO の意義を明らかにする。同時に、より生体環境に近い 3D アッセイ系や *in vivo*の実験系を立ち上げ、放射線抵抗性浸潤細胞がそれらアッセイ系でも高い浸潤能や転移能を示すか検証する。さらに、それらアッセイ系を用い、放射線抵抗性浸潤細胞の浸潤・転移抑制に NO 合成阻害剤が有効か調べる。より生体に近い条件下で実験を行い、臨床応用を視野に、放射線抵抗性浸潤細胞の抑制方法を提案する。

3. 研究の方法

2016 年度(渡米前)

(1)Wink ラボで直ちに実験が開始できるよう準備をする

Wink ラボでは放射線抵抗性浸潤細胞をマウスへ移植する実験を計画している。2016 年度はその準備として放射線抵抗性浸潤細胞を十分量回収する方法を確立する。我々はすでに、PANC-1 細胞株全体の集団のうち、マトリゲルを超えて浸潤した浸潤細胞を集める方法を確立している。

これら浸潤細胞は、PANC-1 全体の集団と比較し、炭素イオン線に抵抗性であること、すなわちこの集団は放射線抵抗性浸潤細胞集団であることを見出している。そのため、本研究では、この浸潤アッセイ法を用い、PANC-1 細胞全体の集団の中から放射線抵抗性浸潤細胞の集団を回収する。マウスに細胞を移植する際、 2×10^6 個という多くの細胞数が必要となるが、これまでにそのような量を回収した経験はなく、安定して回収するためには試行錯誤が必要である。Wink ラボで直ちに放射線抵抗性浸潤細胞を十分量回収できるように、6well タイプの浸潤アッセイ用トランスウェルを用い、フレッシュな細胞を再現性よく大量に回収する方法を確立する。

Wink ラボでは放射線抵抗性浸潤細胞群が腫瘍組織でどのような挙動を示すか調べるため、放射線抵抗性浸潤細胞が癌の微小環境へ与える影響も検証する予定である。具体的には、血管内皮細胞や免疫細胞、線維芽細胞などとの 3D 共培養を計画している。そのため、それら細胞群に影響を及ぼすサイトカインや成長因子等で放射線抵抗性浸潤細胞特異的に発現変化が見られる因子があるか、DNA マイクロアレイを行い調べる。微小環境細胞のうち、どの細胞と共培養するのが良いか予測する。

2017 年度 (渡米、Wink ラボに滞在) - 2018 年度 (帰国後)

(2)放射線抵抗性浸潤細胞における NO の意義を明らかにする

NO は不安定な分子で、その量は刻一刻と変化する。そのため、放射線抵抗性浸潤細胞が浸潤する際、どの過程で特に NO を利用しているか、細胞の NO 産生をリアルタイムに検出・計測する。Wink ラボには、NO をリアルタイムで測定する機器が揃っているため、それらを利用する。細胞が浸潤する際、特徴的な過程で特に NO が産生される場合は、その過程における NO の意義を調べる (例えば、細胞が動く過程で細胞膜が形を変化させる過程、細胞の足場への接着が喪失した過程等)。NO が産生される過程が明らかになったら、そのステップで必須な遺伝子の発現量を調べる。種々の NO 合成阻害剤を利用し、NO が産生できなかった場合それら遺伝子の発現量がどうなるか調べる (遺伝子発現が消失し、過程も確認されなくなった場合: NO は浸潤の一過程において、遺伝子発現を上流で制御することで重要な役割を担っているということになる)。また、その際、どの NO 合成阻害剤が一番効果的かについても調べる。

(3) 3D アッセイ系や *in vivo* 実験系を立ち上げ放射線抵抗性浸潤細胞の浸潤転移能を検証する

3D アッセイ系: 2016 年の DNA マイクロアレイの結果から、放射線抵抗性浸潤細胞が影響及ぼす可能性があるがん微小環境の細胞を選ぶ (血管内皮細胞 or 免疫細胞 or 線維芽細胞)。選択した微小環境の細胞と、放射線抵抗性浸潤細胞または通常培養 PANC-1 を 3D 共培養し、微小環境細胞への影響の違いを観察する。例えば、血管内皮細胞であれば血管新生への影響、免疫細胞であれば、免疫細胞の分化や遊走能、線維芽細胞であれば線維芽細胞からの MMP の産生や遊走能への影響を比較する。

In vivo 実験系: 放射線抵抗性浸潤細胞を大量に回収し、マウスへ移植する実験を進める。超免疫不全マウスを用い、マウスの脾臓に PANC-1 細胞を移植する同所性移植モデルを立ち上げる。放射線抵抗性浸潤細胞と通常培養 PANC-1 で、マウスの転移能に差があるか検証する。

(4) 3D アッセイ系や *in vivo* 実験系を用い NO 合成阻害剤の有用性を検証する

(3) で立ち上げたアッセイ系に対し、(2) で効果が確認された NO 合成阻害剤を用い、より生体に近い環境下での放射線抵抗性浸潤細胞の浸潤・転移を効果的に抑制できる薬剤を同定する。

4. 研究成果

Wink ラボへは 2017 年 4 月から 1 年間滞在する予定であったため、初年度（2016 年度）は、Wink ラボへ到着後直ちに実験を開始できるよう日本で準備をした。まず、マウスへの移植実験用に、PANC-1 細胞を用いて浸潤アッセイをし、PANC-1 細胞全体のうち、マトリゲルを超えて浸潤する浸潤細胞（放射線抵抗性浸潤細胞）の集団を大量に回収することを試みた。試行錯誤の結果、浸潤アッセイに用いるトランスウェルは 6 well の大きなタイプを使用し、数は 300 トランスウェル(50 プレート分)使うこと、 1×10^6 細胞数/トランスウェルで浸潤アッセイを行い、翌日マトリゲルを超えてトランスウェルの裏側へ到達した細胞を回収し、さらに、回収した細胞は 10cm ディッシュにまき 2 日間培養することで、放射線抵抗性浸潤細胞の集団を大量に再現性よく、フレッシュに回収することに成功した。また、Wink ラボでは、放射線抵抗性浸潤細胞を用いてマウスの実験をするだけでなく、がん微小環境の細胞と 3D 共培養することを計画している。渡米後にどの微小環境の細胞に焦点を置き実験を進めるべきか情報を得るため、2016 年度は PANC-1 の浸潤細胞を回収し、細胞全体と比較した DNA マイクロアレイ解析を行なった。

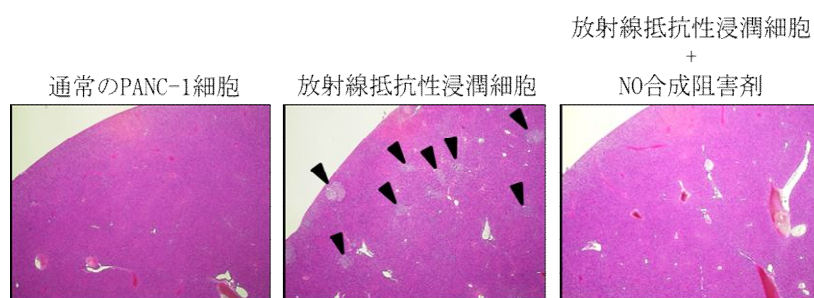
2017 年度は 1 年間 Wink ラボに滞在し、直接 NO 実験のノウハウを学びながら実験を行った。まず、放射線抵抗性浸潤細胞が浸潤のどの過程で特に NO を産生するか、細胞の NO 産生量をリアルタイムに検出・計測したところ、細胞が浸潤する際、足場への接着が喪失された時に特に NO を産生することを見出した。その際、複数の癌転移関連因子（MMP9 や CXCR4）や前転移ニッチ形成関連因子（S100A8 や LOX）及び、stemness 関連因子（CD133、ALDH1、NANOG、SOX2 など）の発現が上昇すること、それら因子の多くは、NO 合成阻害剤で抑制されることから、NO がそれら遺伝子発現の上流因子として関与することが明らかとなった。また、2016 年に実施した DNA マイクロアレイ解析の結果より、放射線抵抗性浸潤細胞は PANC-1 細胞全体の集団と比べ、血管新生に関わるサイトカインを多く発現していたため、3D 微小環境モデルとして血管内皮細胞を選択し、放射線抵抗性浸潤細胞、及び PANC-1 細胞とともに 3D 条件下で共培養を行った（マトリゲル内で共培養した）。しかし、血管新生に対する影響には差は確認されなかった。次に、本課題の重要な目的である、マウスがん転移モデルを立ち上げた。予備的実験にて、PANC-1 細胞をマウスの脚に移植した場合、超免疫不全マウスを用いても顕著な腫瘍形成や転移は確認されないことを経験していたため、本研究では、マウスの膵臓に PANC-1 を同所移植するアッセイ系を計画した。しかし実際試した結果、マウスの膵臓は非常に小さく独立した器官として明確に見分けられないことから、再現性よく膵臓に移植することは難しかった。そのため、膵臓のすぐ近くに位置する脾臓に移植することにした。5 週齢の NSG マウス(超免疫不全マウス)を用い、麻酔下で脾臓に放射線抵抗性浸潤細胞または PANC-1 細胞をそれぞれ移植した。縫合した後、放射線抵抗性浸潤細胞移植群または PANC-1 細胞移植群それぞれに対し、NO 合成阻害剤である L-NAME を飲料水に混ぜた群と混ぜない群に分け（n=10）25 日間飼育した後、肝臓、肺を摘出し、転移の有無を計測した。その結果、放射線抵抗性浸潤細胞は PANC-1 全体の集団と比べ、肝転移能が有意に高いこと、さらに NO 合成阻害剤 L-NAME で転移が抑制されることが明らかとなった。2018 年に帰国した後も、Wink 博士と連携を取りながらさらなる実験を進め、放射線抵抗性浸潤細胞を移植したマウスの肝臓は、組織学的に見ても転移巣の数が多いこと、また L-NAME によりその数が顕著に抑制されることを確認した（図 1）。

本研究では、これまで実験の対象として難しかった NO に関する研究を Wink 博士らと共に飛躍的に発展させることができた。また、日本で達成するのが難しかった膵癌転移モデルマウスを立ち上げることができ、生体内での浸潤細胞の挙動を明らかにすることができた。さらに、本研究の最終目的である、「臨床応用を視野に放射線抵抗性浸潤細胞の抑制方法を提案する」に

ついても、より生体に近いマウスの系で NO 合成阻害剤 (L-NAME) が有用である事を証明した。

また、本国際共同研究で得ることが出来たもう一つの大きな成果は、Wink 博士を含め、Wink ラボの皆様との強固なネットワークを構築できたことである。今後さらに研究を進展すべく、現在も密に連絡を取り合っている。本研究の成果は Redox Biology (筆頭: Fujita M, 2019) に発表したが、Wink 博士は、この内容は日本の研究が元になり発展した課題であることを尊重してくださり、藤田と Wink 博士の Co-レスポンスとして発表した。海外の研究室へ滞在した場合、そこでさらに発展した研究を、その後も日本を中核とした研究として世界へ広げていくことはなかなか難しいが、Wink 博士はその点を非常に尊重してくださり、とても有難く感じている。本国際共同研究で得ることが出来た貴重なネットワークを、今後も大切に研究を広げていけたらと思っている。

<図 1: NSG マウスにがん細胞移植後 25 日目の肝臓切片 (HE 染色像) >



5. 主な発表論文等

(研究代表者は下線)

[雑誌論文](計4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.

[学会発表](計2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 18th 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

〔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

〔主たる渡航先の主たる海外共同研究者〕

研究協力者氏名 : Dr. Wink A. David

ローマ字氏名 : Dr. Wink A. David

所属研究機関名 : National Institutes of Health (NIH)

部局名 : National Cancer Institute(NCI), Cancer and Inflammation Program

職名 : Deputy Program Director, Head, Molecular Mechanisms Section