

令和 2 年 5 月 6 日現在

機関番号：82626

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2017～2019

課題番号：17K16668

研究課題名（和文）遊走浸潤を介した脳腫瘍幹細胞の放射線逃避システムの解明

研究課題名（英文）Investigation of mechanism for radiation induced brain tumor stem cell migration

研究代表者

孫 略 (Sun, Lue)

国立研究開発法人産業技術総合研究所・生命工学領域・研究員

研究者番号：40757704

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,100,000円

研究成果の概要（和文）：放射線抵抗性を示す脳腫瘍幹細胞様細胞(ONS-F8とA172-T2)を2つの細胞株(ONS-76とA172)から樹立した。A172からはコントロールとして、幹細胞性の弱いA172-T1も樹立した。ONS-F8とA172-T2は解糖系が亢進する、ということがわかった。また、ONS-F8とA172-T2には、放射線0.5～1Gy照射後に浸潤能の亢進が見られた。さらに、リアルタイムPCRを用いて、関連すると思われる遺伝子の発現解析を行った。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究は、放射線照射後の細胞の遊走浸潤という独自の視点から、脳腫瘍幹細胞様細胞の新たな放射線抵抗性メカニズムを解明しようと試みるものである。研究の成果は、遊走阻止効果を期待した薬剤併用療法に関して、理論的根拠を導くことができる。

研究成果の概要（英文）：We investigated mechanism for radiation induced brain tumor stem cell migration using we established brain tumor stem like cell line.

研究分野：放射線生物学

キーワード：放射線治療 脳腫瘍幹細胞 転移 浸潤

様式 C-19、F-19-1、Z-19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

腫瘍組織内不均一性のひとつとして、2010 年前後に注目されたのが、幹細胞性による不均一性である。がん細胞は、組織再構築能や自己複製能、多分化能を持つ、がん幹細胞と呼ばれる一部の細胞と、そのがん幹細胞から分化した(より成熟した)がん細胞とに分けられる、というものである。2010 年当時、がん幹細胞が強い腫瘍構築能と治療抵抗性を持つこと、つまり治療後再発の起点となることが報告され、がん幹細胞の根絶ががんの完治につながると期待されていた。近年、この幹細胞性は非常に曖昧なもので、微小環境や遺伝子変異によって可塑性が生じる可能性がある」と指摘されており、研究が比較的下火となっている。いずれにせよ(がん幹細胞というレッテルを貼れるかどうかは別として)、同じ組織内の腫瘍細胞でも治療抵抗性や腫瘍再構築能には違いがあり、その両方ともが強い細胞を効率的に叩くことが、がんの根絶に重要でだろうと考えている。

脳腫瘍は、最も初期にがん幹細胞が報告されたがんで、頻度こそ高くないものの予後が悪いがんとして知られている。その原因として、① 周囲の正常組織に浸潤しており、手術で取り除けない ② 脳の正常細胞は放射線感受性が高く、がん細胞根絶に必要な線量を照射できない ③ 使える抗がん剤が限られていることが知られている。

また、脳腫瘍は最も初期にがん幹細胞が報告された癌でもある。

我々はがん幹細胞の放射線抵抗性を明らかにするため、ONS-76 という髄芽腫細胞株から、ONS-F8、ONS-B11、ONS-F11 という幹細胞性と放射線抵抗性を合わせもつ脳腫瘍幹細胞様細胞株を樹立し、その特性解析を行ってきた¹⁾²⁾。さらに、放射線照射後に ONS-F8 の遊走浸潤能が増加することを見出し、「放射線照射を契機として脳腫瘍幹細胞が照射野外逃避することが、脳腫瘍の再発に関与する」可能性を考えた。

2. 研究の目的

本研究では、種類の異なる複数の脳腫瘍細胞株から幹細胞様細胞を樹立し、その特性解析を行うとともに、放射線照射を契機とした遊走浸潤に関する解析を行った。

3. 研究の方法

① 脳腫瘍細胞株からの幹細胞様細胞樹立

ONS-76 から ONS-F8、ONS-B11、ONS-F11 を樹立した時と同様に、レプリカマイクロウェル法を用いて、複数の脳腫瘍細胞株から幹細胞様細胞株樹立を試みた。

② 放射線抵抗性、幹細胞性の確認

放射線抵抗性は、コロニー形成法を用いて解析した。幹細胞性は、免疫不全マウスの皮下での腫瘍形成能、無血清培地でのスフィア形成能、幹細胞遺伝子の発現量により解析した。ハウスキーピング遺伝子は B2M を選択した。

③ 遊走能、浸潤能の解析

Boyden chamber assay、Matrigel invasion assay により評価した。Boyden chamber assay は、直径 8 μ m の穴が無数に空いたインサート上に無血清培地と細胞、インサート下に血清培地を入れ、24 時間インキュベート後、インサート下に移動(遊走)した細胞数をカウントすることで、評価した。Matrigel invasion assay は、インサートの穴を 0.25%のマトリゲルで塞ぎ、インサート下に浸潤した細胞数をカウントすることで、評価した。

④ エネルギー代謝、ミトコンドリア、ROS の解析

グルコース取り込み量、グルタミン酸取り込み量、乳酸排出量は、市販の kit を使用して培地

中の量を測定した。同時に細胞数を計測し、1細胞当たりの取り込み or 排出量を算出した。ミトコンドリア由来 ROS とミトコンドリア量は、トリプシンで剥がした一定数の細胞に市販の蛍光プローブを添加して染色し、フローサイトメトリーを用いて蛍光強度を測定することで、評価した。

4. 研究成果

① 脳腫瘍細胞株からの幹細胞様細胞樹立

レプリカマイクロウェル法を用いて、A172 細胞から幹細胞性の低い T1 細胞と幹細胞性の高い T2 細胞を樹立した。C6 細胞、U251 細胞、U87 細胞からも樹立を試みたが良い細胞が得られなかったため、ONS-76 と ONS-F8 のペアと A172T1 と A172T2 のペアの 2 つを本研究で用いることにした。Fig.1 に A172T1 と A172T2 の顕微鏡画像を示す。A172T2 は丸い形をしており、積み重なって増殖する。

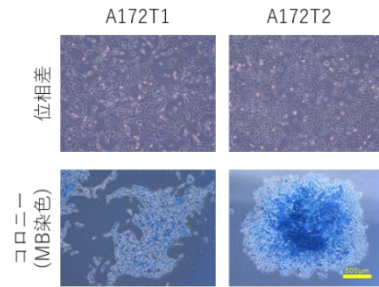


Fig.1

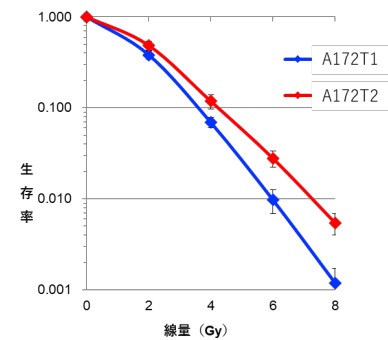


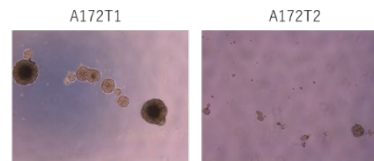
Fig.2

② 放射線抵抗性の確認

コロニー形成法を用いて、A172T1 と A172T2 の放射線抵抗性を確認した。T2 は T1 より放射線抵抗性であった (Fig.2)。

③ 幹細胞性の確認

スフィア形成能、腫瘍形成能、幹細胞遺伝子発現を調べた。結果を Fig.3 に示す。T1 は T2 より大きなスフィアを作ったが、T2 はより早期に免疫不全マウス皮下で腫瘍を形成した。T2 の方が、幹細胞遺伝子 (cMYC、SOX2、Nestin、Musashi、Lgr5) の発現量が高かった。



腫瘍形成	day7	day14
A172T1	0/5	0/5
A172T2	3/5	4/5

④ エネルギー代謝

培養の過程で、T2 の培地が黄色くなることに気づき、エネルギー代謝を解析したところ、T2 は乳酸の排出、グルコースの取り込み、ミトコンドリア由来 ROS が高いことがわかった。一方で、ミトコンドリア量、グルタミン酸取り込み量は、T1 と T2 とで差が無かった (Fig.4)。

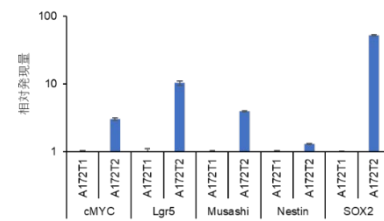


Fig.3

⑤ 遊走能、浸潤能

Boyden chamber assay、Matrigel invasion assay により、T1 と T2 の遊走能および浸潤能を解析した。その結果、照射をしない状態で、T2 は遊走能、浸潤能ともに T1 より高いことがわかった (Fig.5)。

⑥ 放射線照射後の遊走能、浸潤能

ONS-76、ONS-F8、A172T1、A172T2 に放射線を照射し、それらの浸潤を解析した。その結果、ONS-76 と A172T1 は照射後も遊走浸潤能が変化しないが、ONS-F8 と A172T2 は照射後に遊走浸潤能が亢進することを発見した (Fig.6)。

⑦ 遊走能、浸潤能の亢進メカニズム

遊走浸潤能が亢進するメカニズムを解析するため、関連しそうな遺伝子発現を複数解析した

が、候補となり得る遺伝子は見つけれなかった(Fig.7)。

結論：

ONS-76 と ONS-F8 のペアに加えて、A172T1 と A172T2 という脳腫瘍幹細胞様細胞と非幹細胞のペアを樹立した。幹細胞様細胞は、放射線照射により遊走浸潤能が亢進した。一方、非幹細胞では亢進しなかった。これは、脳腫瘍の放射線治療を考える際に、幹細胞の遊走浸潤による照射野外逃避という事象を考慮に入れる必要性を示唆している。

今回、遊走浸潤能が亢進するメカニズムについては、その詳細を解明できなかった。今後の課題としたい。

参考文献：

1. SUN, Lue, et al. In vitro stemness characterization of radio-resistant clones isolated from a medulloblastoma cell line ONS-76. Journal of radiation research, 2013, 54.1: 61-69.
2. SUN, Lue, et al. Metabolic analysis of radioresistant medulloblastoma stem-like clones and potential therapeutic targets. PloS one, 2017, 12.4.

本研究に関する業績：

論文発表：なし

学会発表：Lue Sun, Takashi Moritake, Yoshitaka Matsumoto, Yuzi Wang, Masaoki Kohzaki, Akira Ootsuyama, Ryuji Okazaki and Koji Tsuboi. Energy and ROS metabolism in radioresistant brain tumor cells. 第76回日本癌学会学術総会、パシフィコ横浜、神奈川県横浜市、2017年9月、ポスター

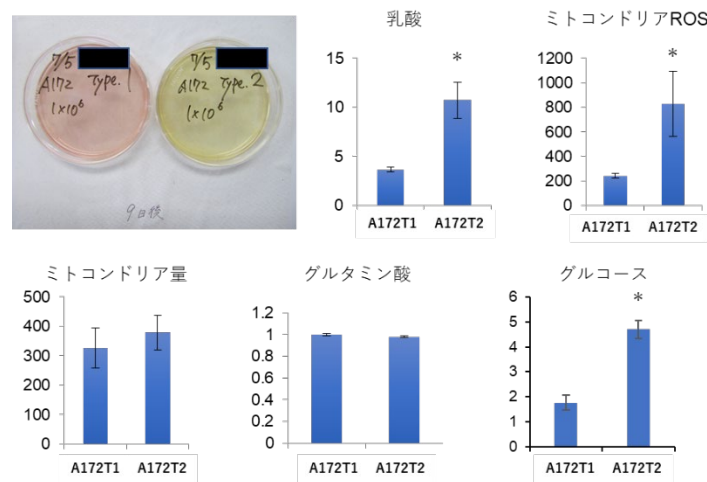


Fig.4

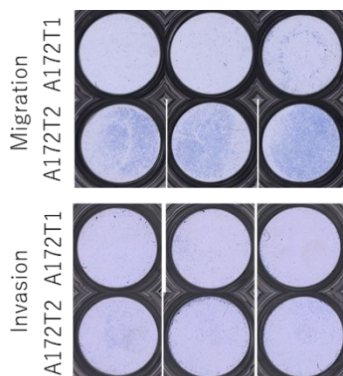


Fig.5

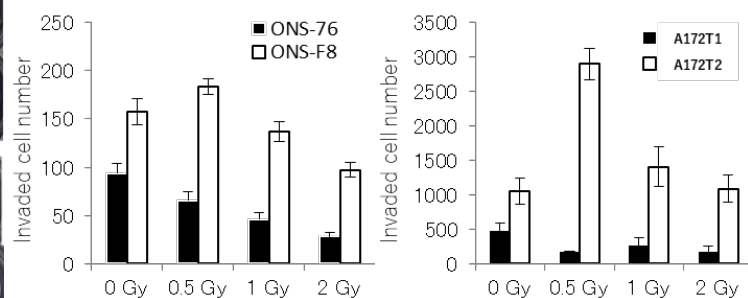


Fig.6

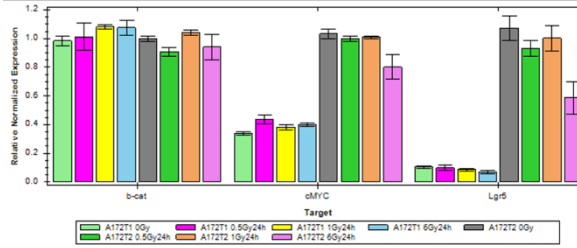
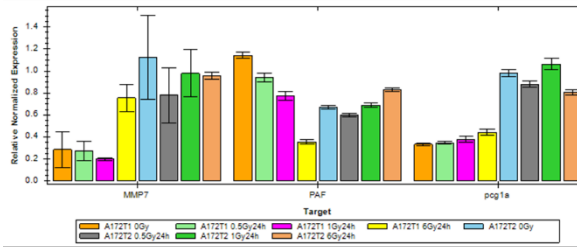
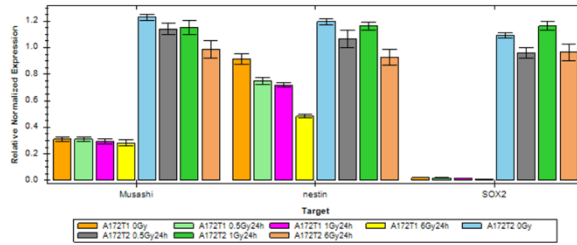


Fig.7a

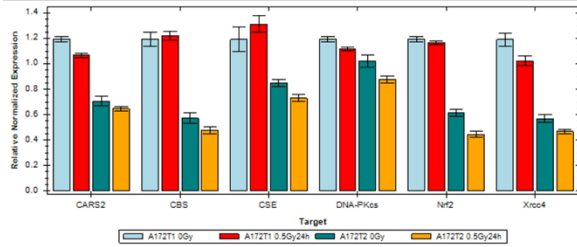
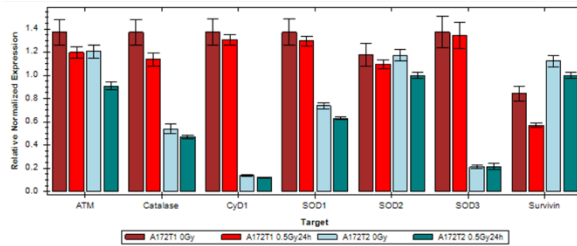
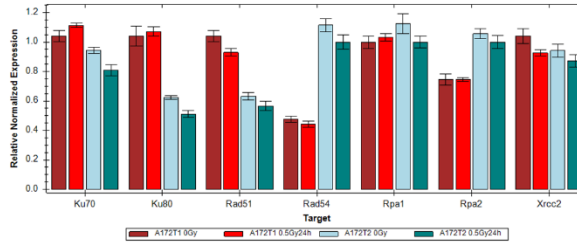
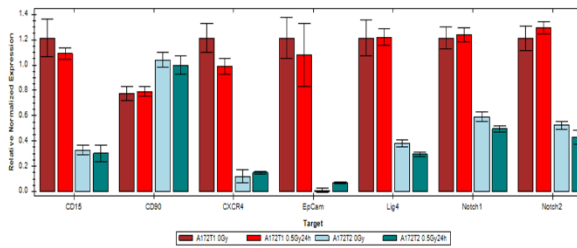


Fig.7b

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計4件（うち査読付論文 4件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 4件）

1. 著者名 Sun Lue, Moritake Takashi, Ito Kazuya, Matsumoto Yoshitaka, Yasui Hironobu, Nakagawa Hidehiko, Hirayama Aki, Inanami Osamu, Tsuboi Koji	4. 巻 12
2. 論文標題 Metabolic analysis of radioresistant medulloblastoma stem-like clones and potential therapeutic targets	5. 発行年 2017年
3. 雑誌名 PLOS ONE	6. 最初と最後の頁 e0176162
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） https://doi.org/10.1371/journal.pone.0176162	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -
1. 著者名 Yuzi Wang, Lue Sun, Xiaokang Li, Koji Tsuboi	4. 巻 35
2. 論文標題 A combined local treatment with anti-PD-1 antibody and bone marrow derived dendritic cells after x-ray irradiation to subcutaneous melanoma in a murine model.	5. 発行年 2017年
3. 雑誌名 Journal of Clinical Oncology	6. 最初と最後の頁 e14541
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1200/JCO.2017.35.15_suppl.e14541	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -
1. 著者名 Yuzi Wang, Lue Sun, Xiaokang Li, Koji Tsuboi	4. 巻 109
2. 論文標題 Abscopal Effect Induced by a Combined Treatment with Anti-PD-1 Antibody and BM-DCs after X-ray in a Melanoma Mouse Model	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 CANCER SCIENCE	6. 最初と最後の頁 117
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） なし	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -
1. 著者名 Sun Lue, Yuzi Wang, Masaoki Kohzaki, Tsuboi Koji	4. 巻 109
2. 論文標題 Energy and ROS metabolism in radioresistant brain tumor cells	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 CANCER SCIENCE	6. 最初と最後の頁 267
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） なし	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -

〔学会発表〕 計3件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 2件）

1. 発表者名 Yuzi Wang, Lue Sun, Xiaokang Li and Koji Tsuboi.
2. 発表標題 A Combined Local Treatment with Anti-PD-1 Antibody and Bone Marrow Derived Dendritic Cells after X-ray Irradiation to Subcutaneous Melanoma in a Murine Model.
3. 学会等名 The 2017 ASCO Annual Meeting (国際学会)
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 Lue Sun, Takashi Moritake, Yoshitaka Matsumoto, Yuzi Wang, Masaoki Kohzaki, Akira Ootsuyama, Ryuji Okazaki and Koji Tsuboi.
2. 発表標題 Energy and ROS metabolism in radioresistant brain tumor cells.
3. 学会等名 第76回日本癌学会学術総会 (国際学会)
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 Yuzi Wang, Lue Sun, Xiaokang Li, Koji Tsuboi
2. 発表標題 Abscopal Effect Induced by a Combined Treatment with Anti-PD-1 Antibody and BM-DCs after X-ray in a Melanoma Mouse Model
3. 学会等名 第76回日本癌学会学術総会
4. 発表年 2017年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
---------	---------------------------	-----------------------	----