

令和 3 年 6 月 21 日現在

機関番号：24601

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2018～2020

課題番号：18K07764

研究課題名(和文) 遅発性活性酸素を抑制するがん細胞特異的因子は放射線治療の標的となりうるか

研究課題名(英文) Basic analysis of secreted factors which suppress delayed ROS for effective radiotherapy

研究代表者

菓子野 元郎 (Kashino, Genro)

奈良県立医科大学・医学部・准教授

研究者番号：00437287

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,400,000円

研究成果の概要(和文)：本研究において、がん細胞特異的な細胞外因子の中で放射線感受性に影響するものを探索した。その結果、ラットグリオーマC6細胞の培養において、培養3日間の培養上清に含まれるVEGFはミトコンドリア代謝を介してミトコンドリアROSを抑制し、放射線抵抗性に導くことが分かった。一方、培養上清におけるグルタミン酸枯渇状態は、放射線増感作用を示すことが分かった。これらの結果は、培養上清におけるサイトカイン分泌レベルとアミノ酸や糖代謝に関わる栄養因子の量の変動は、放射線感受性を左右する重要な治療効果改善のための標的因子であることを示唆している。

研究成果の学術的意義や社会的意義

放射線治療による治療効果をより高くするためには、正常細胞とがん細胞の性質を理解し、正常細胞では放射線による障害を抑え、がん細胞では放射線による致死効果が高くなるような工夫が必要である。本研究で、細胞分泌性因子の中でVEGFががん細胞特異的な放射線抵抗性因子である可能性を示すことが出来た。この因子を標的とした放射線治療が有効となる可能性が高い。また栄養因子の影響もがん細胞では現れやすいことがわかった。このような基礎研究の結果が、将来の新しい放射線治療の開発に結びつくことを期待したい。

研究成果の概要(英文)：In this study, we searched for cancer cell-specific extracellular factors that affect radiosensitivity. As a result, it was found that in the culture of rat glioma C6 cells, VEGF contained in the culture supernatant for 3 days of culture suppresses mitochondrial ROS via mitochondrial metabolism, leading to radiation resistance. On the other hand, it was found that the glutamic acid depleted state in the culture supernatant showed a radiation sensitizing effect. These results suggest that fluctuations in cytokine secretion levels in culture supernatants and the amount of trophic factors involved in amino acid and glucose metabolism are important target factors for improving therapeutic effects that affect radiosensitivity. . .

研究分野：放射線生物学

キーワード：VEGF 活性酸素 放射線治療

1. 研究開始当初の背景

放射線照射後の正常細胞とがん細胞の振る舞いに関するそれぞれの特性を明らかにすれば、それらを放射線治療の標的として役立てることが出来る。例えば、がん細胞特異的な「Warburg効果」による生存戦略は治療を困難にする要因の一つであるので、栄養成分、酸素分圧などの環境要因に対する応答機構は有効な放射線治療の標的となり得る(Harada et al. 2016)。我々は、ラット脳腫瘍由来 C6 細胞において、「放射線による IL-6 誘導は、活性酸素の抑制を介して放射線抵抗性に導く」ことを報告した(Tamari et al, J Radiat Res, 2017)。この結果は、「がん細胞では、サイトカインなどの環境因子が細胞内の活性酸素生成を抑制する」ことを示し、「その機構を介して放射線抵抗性などの生存戦略に貢献している」ことを示唆している。従って、がん細胞特異的な細胞外因子の中で、活性酸素量の調整に関わるものを見出せば、それを治療標的に使える。しかし、細胞外因子による活性酸素制御については、正常細胞とがん細胞における比較検討はまだ十分に行われていない。従って、放射線治療分野においても、この観点で生物学的に治療標的を見出すことはこれからの課題と言える。では、「がん細胞特異的な放射線増感と正常細胞特異的な防護作用の両立を達成する手法を確立すること」は本当に可能となるであろうか？「がん細胞特異的な細胞外因子のうち活性酸素を制御するもの」を解明し、それを治療の基盤として利用することは可能であろうか？このような疑問を掲げ、遅発性活性酸素を標的とした研究に取り組んだ。

遅発性活性酸素は、放射線照射後、Dynamine Related Protein 1 (DRP1)の活性化により、ミトコンドリアが断片化することにより生じる活性酸素で、照射 3~7 日後にかけて誘導される(Kobashigawa et al. BBRC, 2011)。我々は、遅発性活性酸素の生物学的意義を考え、「遅発性活性酸素は持続的な細胞周期停止に関わる」と仮説を立て、シリアンハムスター由来 SHE 細胞で実験を行った結果、p53 依存的経路が遅発性活性酸素で持続的(照射数日後)に活性化することを明らかにした(Kobashigawa et al. Mech Ageing Dev, 2015)。また、遅発性活性酸素を効果的に除去する抗酸化剤としてアスコルビン酸 2 グルコシド (AA-2G) を照射後長期間処理することにより、正常細胞の放射線障害が抑制できることを見出した(Kobashigawa et al. Radiat Res, 2015)。

このような背景のもと、がん細胞において特異的に発現する分泌性因子のうち、放射線感受性に影響する因子を探索し、正常細胞には影響せず、がん細胞だけに特異的な放射線抵抗性獲得機構を標的とした増感作用の手法を確立したいと考えた。そのような因子と遅発性活性酸素との関連性を明らかにし、AA-2G による正常細胞の防護作用がより効果的になる手法を確立することが重要であると考えられた。

2. 研究の目的

本研究において、「がん細胞では遅発性活性酸素が細胞外因子により抑制される」という仮説を立てた。この仮説が正しいことを証明できれば、その細胞外因子を抑制することにより遅発性活性酸素による致死作用をがん細胞にもたらし、放射線治療抵抗性を克服できることになる。本研究の目的は、第一に「遅発性活性酸素を抑制する細胞外因子をがん細胞の培養上清より見出すこと」である。第二に、「その因子を標的とした放射線治療効果を検証すること」である。

3. 研究の方法

3 - 1 培養上清成分の解析

ラットグリオーマ C6 細胞を通常培地 (DMEM + 10%FBS) で培養し、培養期間を変えて培養上清を回収した。細胞植え込み 1 日後に培地を交換し、そこから 2, 3, 4 日後に培養上清を回収し、1,500rpm で遠心後の上清をチューブに回収し、凍結保存した。培養上清に含まれるサイトカインについては、Bioplex サイトカインアレイ法 (Biorad) で検出可能な 24 種 (ラット用) のサイトカインの発現レベルを調べた。培養上清中のエクソソームは、エクソソーム抽出キット (Capturem™ Exosome Isolation Kit (Cell Culture)) により回収し、冷蔵保存し、1 か月以内に使用した。

3 - 2 培養上清による放射線感受性の変化

ラットグリオーマ C6 細胞、ヒトすい臓がん MiaPaca-2 細胞、ヒトグリオーマ Becker 細胞、ヒトグリオーマ U251MG 細胞を通常培地 (DMEM + 10%FBS) で培養した。ヒト線維芽細胞 BJ/hTERT は E-MEM に 10%FBS を加え、さらに添加物を加えた培地で培養した。細胞植え込み 1 日後に培地を交換し、そこから 2, 3, 4 日後に培養上清を回収し、1,500rpm で遠心後の上清を別のチュ

ープに回収し、凍結保存した。各培養期間により回収した培養上清の影響を同一の培養条件でそろえるため、前日に同時に植え込んだ C6 細胞へそれぞれ 24 時間処理した。その後、6 Gy 照射後の生存率をコロニー形成法で調べた。照射後の DNA 二本鎖切断の数やその修復動態が培養上清により変化することを調べるため、培養上清を 24 時間処理した細胞に 1 Gy 照射し、1 ~ 24 時間後における DNA 二本鎖切断部位に集積する 53BP1 のフォーカス形成の数を蛍光免疫染色法で調べた。

3 - 3 培養上清によるミトコンドリア活性酸素及びミトコンドリア代謝への影響

C6 細胞の培養により回収した培養上清を同一の培養条件でそろえた Recipient C6 細胞へそれぞれ 24 時間処理し、細胞内活性酸素量を APF 蛍光量で相対的に比較した。APF は主にミトコンドリアへの局在が高く、ミトコンドリア活性酸素との反応性が高いので、APF の相対的蛍光量がミトコンドリア活性酸素を反映していると考えられる。ミトコンドリア代謝については、細胞外フラックスアナライザー (XFp, Seahorse) を用い、ミトコンドリアにおける酸素消費量の変化により調べた。

4 . 研究成果

4 - 1 C6 培養上清中におけるサイトカインとエクソソームの解析

C6 (ラットグリオーマ細胞) の培養上清に含まれるサイトカインを調べ、培養日数の違いにより変化するものを探索した。その結果、培養 2 日目から 3 日目にかけて VEGF (血管新生増殖因子) が急激に増えることがわかった。培養日数の増加に伴う VEGF 量の増加は、非腫瘍の神経グリア由来 RNB 細胞でも見られたが、その増加レベルは C6 の方が極めて多かったので、この因子を「がん細胞が特異的に分泌している液性因子」として扱った。

培養日数の増加に伴うエクソソーム量と質の変化を調べた。もともと FBS 中に含まれるエクソソームが多いので無血清培養における条件を検討した結果、Advanced DMEM 培地においては 1% FBS の添加でも C6 細胞は十分に増殖できることがわかり、以後この条件でエクソソーム回収を行った。名古屋大学の熊谷純先生との共同研究で、培養 2 日及び 3 日間のエクソソームの解析を依頼し、NTA (ナノトラック解析) により粒径分布を調べた結果、確かに C6 細胞でエクソソーム成分が分泌されていることを確認した。抽出されたエクソソーム粒径は、放射線照射により変化することも明らかとなった。

4 - 2 C6 培養上清処理による放射線感受性の変化の解析

1, 2 日間培養後の培養上清を処理された C6 細胞では、放射線感受性に有意な変化は見られなかったが、3 日間培養後の培養上清を処理された細胞で放射線抵抗性 (6 Gy 照射後の生存率の増加 (図 1)) がみられた。4 日後の培養上清を処理された細胞では放射線増感効果 (6 Gy 照射後の生存率の低下 (図 1)) がみられた。C6 細胞の培養では、培地交換後 2 ~ 3 日後にかけて VEGF が劇的に増加することが分かったので、VEGF が 3 日後の培養上清による放射線抵抗性の原因である可能性が考えられる。そこで両者の因果関係を調べたところ、ラット組換え VEGF (rVEGF) により、放射線抵抗性が誘導された。次に C6 細胞の VEGF 発現を siVEGF で抑制した細胞より得られた 3 日間培養の培養上清を回収し、それを処理された細胞の 6 Gy 照射後における生存率は、コントロール細胞の生存率と変わらず、3 日間培養による VEGF 発現を抑制しても放射線抵抗性が抑制されるという結果は得られなかった。また、3 日間培養の培養上清を処理する際、VEGF 受容体の阻害剤である Axitinib を同時に処理した場合の放射線感受性の変化も調べたが、3 日間培養の培養上清による放射線抵抗性の獲得が抑制されることはなかった。これらの VEGF 経路を抑制しても放射線抵抗性が抑制されない原因は不明であるが、今後、より適切な実験系を確立する必要があると考えられる。

VEGF による放射線抵抗性獲得の原因に、細胞内活性酸素の変化があると考え、ミトコンドリアの酸素消費量の変化と細胞内酸化度 (主にミトコンドリア活性酸素) を調べた。その結果、2 日間培養の培養上清に rVEGF を加えて C6 細胞に処理したところ、ミトコンドリア代謝が抑制され、APF 蛍光で調べた細胞内酸化度が低下することがわかった。このことから、VEGF はミトコンドリアの代謝を抑制することで細胞内酸化度を低下させ、放射線の活性酸素を介した初期 DNA 二本鎖切断生成を抑制している可能性が示唆された。そこで、1 Gy 照射後の DNA 二本鎖切断の生成を 53BP1 タンパク質のフォーカス形成数で調べた。その結果、rVEGF 処理した細胞では、照射後の 53BP1 生成量が抑制されることがわかった。3 日間培養の培養上清を処理された C6 細胞でも同様に照射後の 53BP1 のフォーカス形成が抑制されることが分かった。従って、VEGF は放射線による活性酸素を介した間接作用を抑制したことにより、放射線細胞死を抑制する可能性が示唆された。

以上の結果は、がん細胞の培養上清が、栄養成分の枯渇に伴う複合的な因子の変化に対応するため、防護機構を備えていること、その時、ミトコンドリアの代謝を含む酸化ストレス制御機構が重要な役割を果たしていることを示唆している。次に別の細胞株、主にヒトがん細胞で調べた。

しかし、3 日間培養の培養上清で放射線抵抗性を獲得する細胞株は現在までに見られなかった。一方で、培養 4 日後の培養上清を処理した C6 細胞では放射線増感作用がみられたため、他のヒト細胞でも調べた。その結果、ヒトすい臓がん細胞の MiaPaca2 と Panc1 細胞では同様に 4 日間の培養上清処理で増感作用がみられ、ヒトグリオーマ細胞の U251MG 細胞でも増感作用がみられた(図 2)。ヒトグリオーマの Becker 細胞とヒト線維芽細胞 BJ/hTERT では増感作用は見られなかった(図 2)。C6 細胞において増感作用がみられる原因を調べたところ、メタボローム解析によりグルタミン酸代謝経路の関与が示唆されたが、ヒト MiaPaca2 細胞ではグルタミン酸を 4 日後の培養上清に加えても生存率の低下は回復しなかった。これらの結果は、細胞株によって放射線増感の機構は異なるものの、C6 細胞においてはグルタミン酸経路が 4 日間培養の培養上清による増感効果に関わる可能性が示唆される。

エクソソームが関与する可能性についても検討を行った。しかし、抽出したエクソソームを 24 時間処理された C6 細胞において、細胞内に取り込まれたエクソソームを観察する手法の検討に時間を要し、エクソソームが放射線感受性に影響するか否かについては結論が得られなかった。

C6 細胞では、各培養日数の違いで、培養上清に含まれるサイトカイン、栄養因子の量に変化が生じ、それらの複合的作用により放射線感受性に違いが見られることが示唆される。今後、さらなる機構の解明が必要であるが、今回の結果より、培養 3 日間では VEGF 経路を介したミトコンドリア代謝の変化が細胞内酸化度の低下をもたらし、照射後の DNA 二本鎖切断生成を抑制するが、培養 4 日間になると栄養因子の枯渇に伴うグルタミン酸経路の代謝阻害が生じ、酸化ストレスの増加に伴う放射線感受性の亢進が認められることが明らかになった。

今後、がん細胞における栄養成分の枯渇と VEGF などの放射線抵抗性因子が誘導される機構との関連性も含めて明確にして行きたい。

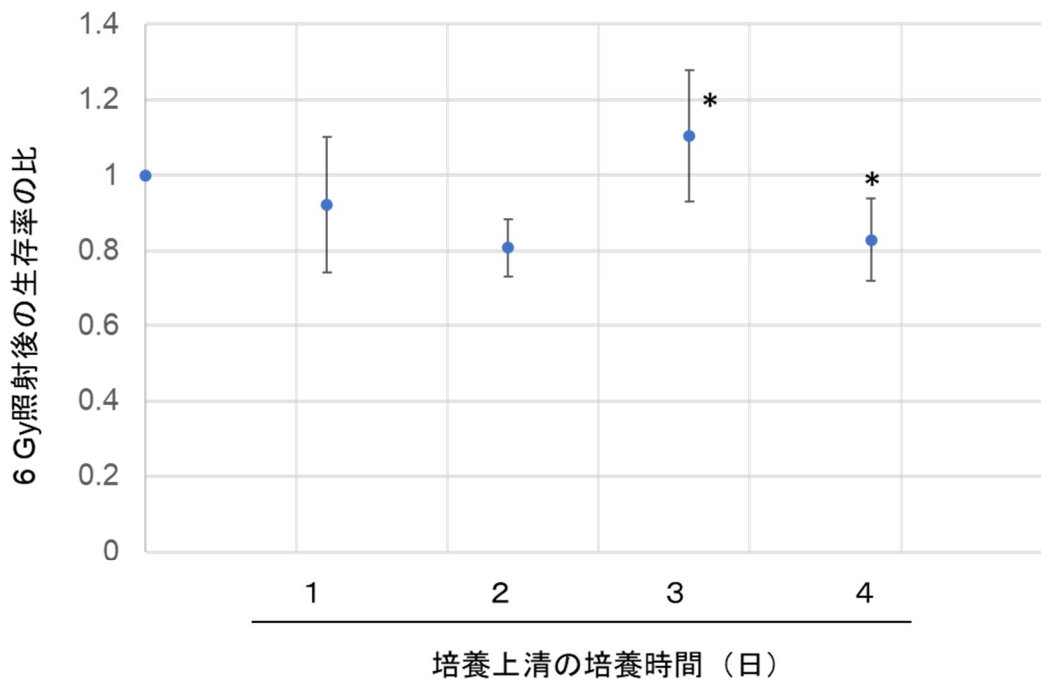


図 1 ラットグリオーマC6細胞の培養上清処理による放射線感受性の変化。
1 ~ 4 日間培養の培養上清処理により6 Gy照射後の放射線感受性は異なる(*
p<0.05 vs control by the Student t test).

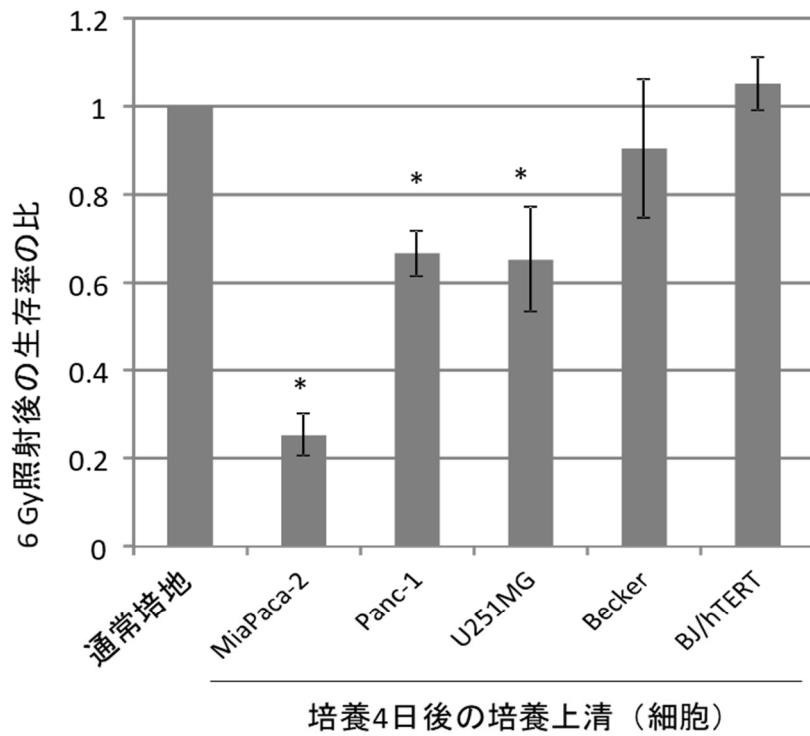


図2 ヒト細胞の培養上清処理による放射線感受性の変化。4日間培養の培養上清処理により6 Gy照射後の放射線感受性はがん細胞で顕著に増加することを示した(* $p < 0.001$ by the Student t test).

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計2件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 菓子野元郎、小橋川新子、熊谷純
2. 発表標題 放射線感受性を変動させる細胞分泌性因子の解析
3. 学会等名 日本放射線影響学会第62回大会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 小橋川新子、菓子野元郎、真田悠生、田野恵三、増永慎一郎
2. 発表標題 グルコピラノシルアスコルビン酸の照射後処理による放射線感受性の変化～正常細胞とがん細胞の比較
3. 学会等名 日本放射線影響学会第61回大会
4. 発表年 2018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
---------------------------	-----------------------	----

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------