

令和 4 年 6 月 15 日現在

機関番号：82502

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2019～2021

課題番号：19K08111

研究課題名(和文)放射線抵抗性浸潤細胞における特異的パスウェイの解明と抑制方法の提案

研究課題名(英文) Finding molecular pathways specific in the highly invasive radioresistant cancer cells and proposing the way to block their invasiveness

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・量子生命科学研究所・主幹研究員

研究者番号：80580331

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)：我々はこれまでに、放射線は多くの癌細胞株の浸潤抑制に効果的であるが、PANC-1では細胞全体の中に「放射線抵抗性浸潤細胞」が存在するため、照射を受けてもそれら細胞が浸潤や転移のリスクになり得ることを示した。そこで本研究にてさらに7種類の乳がん細胞株を調べたところ、MDA-MB-468とSUM149にも浸潤細胞集団が存在することを見出した。しかしこれら浸潤細胞は放射線抵抗性ではなかったため、放射線で効率よく殺傷できる事が示唆された。さらにこの「高浸潤細胞」は全体の集団と比べ著しく解糖系に依存した代謝系を持つこと、そのため解糖系の阻害剤で「高浸潤細胞」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

放射線癌治療をさらに発展させる為には、治療後の再発や浸潤、転移をいかに抑制できるかが重要である。我々はPANC-1を用いた研究から、細胞全体の集団の中には一部、顕著に浸潤能が高い「高浸潤細胞」の集団が存在することを明らかにしてきた。さらに細胞株によっては、それら浸潤細胞は放射線にも抵抗性を示すことも見出した。本研究では、このような治療においてリスクとなり得る「高浸潤細胞」で共通する重要因子を調べ、これら細胞集団を効率良く抑制する方法を提案した。この成果は、癌の浸潤・転移抑制剤の開発や、治療後の診断マーカーの開発にも役立つ成果であり、学術的意義や社会的意義が非常に高い結果であると考えている。

研究成果の概要(英文)：We have recently reported that radiation is effective in reducing the invasion of many cancer cell lines, however, we also confirmed that a minority of cell lines display enhanced invasion following irradiation, including PANC-1. In the case of PANC-1, there were the distinct invading population (INV) within the whole cultured PANC-1 population, which showed resistant to radiation as well as higher metastatic potential, indicated that INV are risk population for cancer treatment. Thus, in this study, we used 7 breast cancer cell lines to further investigate the existence of INV in other cell lines. We found that MDA-MB-468 and SUM149 also include INV population within whole cell population, but of note, their INV were not radio-resistance, indicated that these INV could be killed with radiation. Moreover, we revealed that INV cells have unique character exhibiting hyper-glycolytic phenotype, and thus, inhibitor for glycolysis was effective in blocking their aggressive invasiveness.

研究分野：放射線生物学、分子生物学

キーワード：癌細胞の浸潤 癌細胞の転移 放射線抵抗性

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 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、重要ながん治療法のひとつである。量子科学技術研究開発機構(旧放射線医学総合研究所)では、X線による癌治療の他、1994年より重粒子線治療を開始しており、2018年の時点では約11000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。このような放射線癌治療をさらに発展させるためには、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。我々はこれまでの研究で、X線や炭素線照射は多くの癌細胞株の浸潤抑制に効果的であるが、PANC-1など特定の細胞株においては照射後に浸潤細胞の数が上昇することを見いだしてきた(31種のヒト癌由来細胞株を用いた検討により、X線では8種類の細胞株で、また、炭素線では3種類の細胞株で浸潤細胞の数が上昇することを明らかにした)(1)。では、照射を受けた後、これら細胞株では何が起きているのか。

細胞の浸潤能はマトリゲルをコートしたトランスウェルを用いて検証する。マトリゲルの上に播種した細胞のうち、マトリゲルを越えてトランスウェルの裏側に移動できた細胞を浸潤細胞というが、興味深いことに、マトリゲル上に細胞を播種しても全ての細胞が動くわけではなく、例えばPANC-1細胞では播種した細胞全体の約0.3から1%の細胞のみが浸潤する(2)。この現象はリアルタイムイメージングでも確認しており、PANC-1細胞を用いて細胞塊(Spheroid)を作成し、コラーゲンのゲルに埋め込むと、ごく少数の細胞のみがSpheroidからコラーゲンゲルに飛びでて浸潤する(3, 4)。興味深いことに、我々はこのようなPANC-1の浸潤細胞は、PANC-1全体の集団よりも放射線に対し抵抗性であることを見出した。このことから、PANC-1では細胞全体の中に一部、浸潤能を有する細胞集団が存在し、その集団はPANC-1全体の集団と比べ、放射線に抵抗性である、すなわち、細胞全体の中に「放射線抵抗性浸潤細胞」の集団が存在し、照射後にそれらが選択的に生き残ったために、全体として浸潤細胞の数が上昇していたことが示唆された。さらにこれら浸潤細胞はマウスでの転移能も高いことを確認している。このような、放射線に抵抗性で、かつ、浸潤や転移のリスクが高い細胞集団はどのような特徴を持つ集団なのか。他の細胞株にも存在するのか。存在するのであれば、それら細胞集団で共通する重要なパスウェイやマーカー分子を見出し、そのようなリスク細胞群を抑制することはできないだろうか。

本課題では、複数のヒト癌細胞株を用い、PANC-1以外にも、浸潤細胞集団をもつ細胞株が存在するかスクリーニング・同定する。存在した場合、それら細胞株から浸潤細胞の集団を単離する。次に、単離した浸潤細胞は細胞株全体の集団と比較し、放射線に抵抗性が評価する。

浸潤細胞の集団が放射線に抵抗性だった場合(すなわち「放射線抵抗性浸潤細胞」であった場合)それら「放射線抵抗性浸潤細胞」でキーとなるパスウェイやマーカー分子を見出す。単離した浸潤細胞の集団が細胞株全体の集団と比較し放射線に抵抗性を示さなかった場合でも、放射線抵抗性ではないが、浸潤・転移リスクが高い「高浸潤細胞」であるため、これら細胞集団で共通するキーパスウェイやマーカー分子を見出す。「放射線抵抗性浸潤細胞」や「高浸潤細胞」など、治療にとってリスクとなり得る細胞群を抑制する方法を提案する。

<参考文献>

- 1) Fujita M et al., Semin Cancer Biol. 2015;35:45-52.
- 2) Fujita M et al., Cancer Sci. 2012;103:677-83.
- 3) Fujita M et al., Cancer Sci. 2017;108:961-971.
- 4) Fujita M et al., Nature.com, webcast, Sept 20, 2018.

2. 研究の目的

本研究では、「放射線抵抗性浸潤細胞」や「高浸潤細胞」など、治療にとってリスクとなり得る細胞集団がPANC-1以外の細胞株でも存在するのか調べ、それらリスク細胞で特徴的なパスウェイやマーカー分子を見出す。その結果から、「放射線抵抗性浸潤細胞」や「高浸潤細胞」を効果良く殺傷または抑制する方法を提案する。

3. 研究の方法

1) 浸潤細胞の集団が存在する細胞株をスクリーニングする

まず、7種類のヒト乳がん由来細胞株(BT474, HCC1937, MCF-7, MDA-MB-231, MDA-MB-468, SK-BR-3, SUM149)を用い、それぞれの細胞株を用いてトランスウェル浸潤アッセイを行なった。これにより、全体の中に浸潤細胞の集団を有する細胞株がどのくらい存在するか調べた。トランスウェルの浸潤アッセイでは、全体の集団のうち、どのような細胞が浸潤しているのか(細胞全体が動き出しているのか、もしくは、全体のうち一部の集団のみが浸潤能を有しており動いているのか)は可視化することができない。そのため浸潤が確認された細胞株についてはSpheroidを作成し、コラーゲンゲルに埋め、リアルタイムイメージングを実施した。PANC-1で見られたような、全体の中でごく少数の細胞のみがSpheroidからコラーゲンゲルに浸潤する(すなわち、全体の中に浸潤細胞の集団を有する)細胞株はPANC-1以外にも存在するのか、スクリーニングした。

2) 細胞株全体の中に存在する、浸潤細胞の集団を単離する

1)でスクリーニングされた、全体の中に浸潤細胞の集団を有する細胞株を用い、まず6well plate タイプの大きいトランスウェルで浸潤アッセイを実施した。24時間後にマトリゲルを越

えてトランスウェルの裏側へ移動した浸潤細胞をアキュターゼで剥がし回収した。単離した浸潤細胞は、その後、通常の培養条件で1週間培養し、細胞数を増やしてからその後のアッセイに使用した。アッセイに使用した浸潤細胞については、その一部を用いて浸潤アッセイを行い、1週間の培養を経ても変わらず高い浸潤性を維持していたことを確認し、アッセイに使用した。

3) 浸潤細胞は細胞株全体の集団と比較し放射線抵抗性が評価する

放射線感受性は high density アッセイ法 (HDS アッセイ法) を用いて評価した (Karasawa K *et al.*, J Cell Sci & Therapy, 2014)。細胞に X 線 (0, 1, 2, 3Gy)、および炭素イオン線 (0.5Gy, 1Gy, 1.5Gy, 80KeV) をそれぞれ照射し、HDS アッセイを行なった。細胞株全体の集団、及び、浸潤細胞集団それぞれの生存率から生存曲線を作成し、放射線感受性を比較した。

4) 「放射線抵抗性浸潤細胞」や「高浸潤細胞」で特徴的に変化するキースウェイおよび関与分子を見出す

「放射線抵抗性浸潤細胞」もしくは「高浸潤細胞」を含む細胞株を同定後、それら細胞株を用いて 6 well plate タイプのトランスウェルで浸潤アッセイを実施し、24 時間後にマトリゲルを越えてトランスウェルの裏側へ移動した浸潤細胞をアキュターゼで回収した。次に、単離した「放射線抵抗性浸潤細胞」もしくは「高浸潤細胞」について、メタボローム解析 (ベーシックスキャン, Human Metabolome Technologies) 及び DNA マイクロアレイ解析 (GeneChip Array, Filgen) を行い、これらリスク細胞で特徴的なパスウェイやマーカー分子を見出した。関与が予想されたマーカー分子に関しては、さらに western blotting 法 (NuPAGE, ThermoFisher Scientific) を用いてタンパク質発現量や、そのリン酸化型の発現量を解析した。

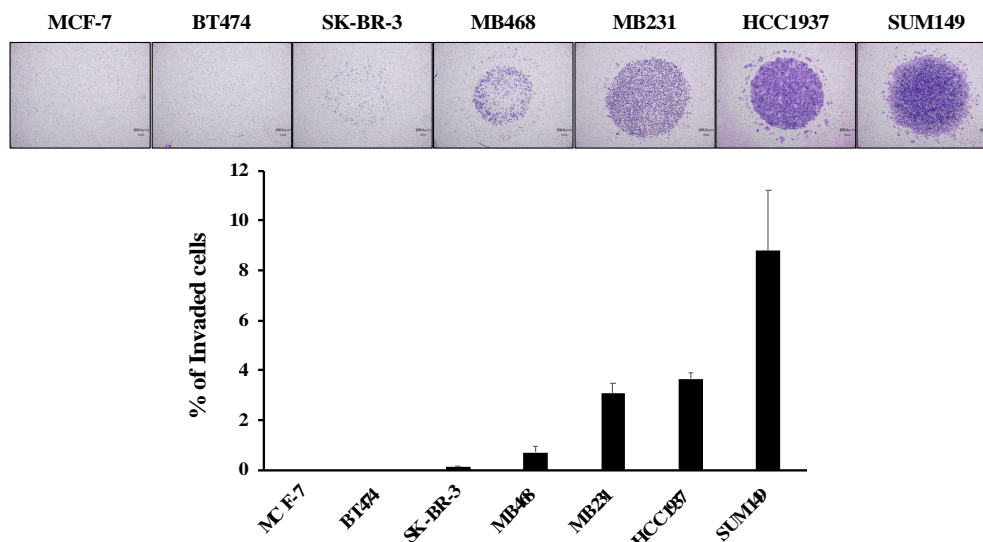
5) 「放射線抵抗性浸潤細胞」や「高浸潤細胞」キーとなる因子を抑制し、それら細胞群の浸潤能を効率よく抑制する方法を提案する

「放射線抵抗性浸潤細胞」もしくは「高浸潤細胞」で特徴的なパスウェイや分子の解析から、関与が予想された分子に対する阻害剤を用い、「高浸潤細胞」の浸潤能を抑制できるか検証した。

4. 研究成果

1) 浸潤細胞の集団が存在する細胞株として、MDA-MB-468 と SUM149 を同定した

まず、7 種類のヒト乳がん由来細胞株 (BT474, HCC1937, MCF-7, MDA-MB-231, MDA-MB-468, SK-BR-3, SUM149) を用い、浸潤細胞の集団が存在する細胞株をスクリーニングした。トランスウェル浸潤アッセイの結果より、7 種のうち 4 種類の細胞株 (HCC1937, MDA-MB-231, MDA-MB-468, SUM149) では、浸潤する細胞の存在が確認された (図 1)。しかし、トランスウェル浸潤アッセイでは、全体の集団のうち、どのように細胞が浸潤しているのかは可視化できない (細胞全体が動き出して、24 時間後にトランスウェルの裏側に到達した細胞を単に検出しているのか、もしくは、全体のうち一部の集団のみが浸潤能を有して動いており、その高浸潤細胞の集団を捉えているのか可視化することはできない。) そのため、トランスウェル浸潤アッセイに加えてスフェロイド浸潤アッセイを行い、全体の中に浸潤細胞の集団が存在するのか確認したところ、HCC1937, MDA-MB-231 は、スフェロイドを構成する細胞全体がばらけてコラーゲンゲルに広がり浸潤する様子が観察された。すなわち、HCC1937 と MDA-MB-231 は、どの細胞も浸潤能を有することが明らかとなった。一方で、MDA-MB-468 と SUM149 では、スフェロイドを構成する細胞集団のうち一部の細胞のみが浸潤する様子が見出された。これらの結果から、MDA-MB-468 と SUM149 は、細胞株全体の中に浸潤細胞の集団が存在することが明らかとなった。



(BMC Cancer. 2020 Sep 29;20(1):929.)

図 1. ヒト肺癌由来細胞株7種における浸潤細胞の有無

2) MDA-MB-468 および SUM149 細胞株全体の中に存在する、浸潤細胞の集団を単離した

1) で同定された細胞株 (MDA-MB-468 と SUM149) を用い、6 well plate タイプのトランスウェルを利用して浸潤細胞を単離した。PANC-1 と同じ方法 (1×10^6 /TW) で浸潤アッセイを行い、24 時間後にアキュターゼを用いて浸潤細胞を回収したところ、SUM149 からは元気な浸潤細胞が単離することができた。しかし、MDA-MB-468 から回収した浸潤細胞は数が少なく、回収後の成長も悪かった。そのため、トランスウェルへの細胞まき数を、PANC-1 で確立した方法よりも 5 倍に増やして回収したところ、MDA-MB-468 からでも元気な浸潤細胞を単離することができた。

3) MDA-MB-468 と SUM149 の浸潤細胞は細胞株全体の集団と比較し放射線抵抗性は示さなかった次に、MDA-MB-468 と SUM149 の浸潤細胞が放射線に抵抗性が HDS アッセイ法を用いて調べた。まず X 線に対する感受性を調べたが、1Gy、2 Gy、3Gy 全てにおいて、浸潤細胞が細胞株全体の集団よりも X 線に抵抗性を示す特徴は確認されなかった。SUM149 については炭素線に対する感受性も調べたが、0.5Gy、1Gy、1.5Gy 共に、やはり浸潤細胞が抵抗性を示す特徴は見られなかった。これらのことから、MDA-MB-468 および SUM149 細胞株では、細胞全体の集団の中に一部、高い浸潤能を示す集団は存在するが、それら集団は PANC-1 浸潤細胞のように放射線抵抗性ではないこと、すなわち、それら集団は「放射線抵抗性浸潤細胞」ではなく、「高浸潤細胞」であることが明らかとなった。また、この「高浸潤細胞」は放射線で効率よく殺傷できる事が示唆された。

4) 「高浸潤細胞」で特徴的なパスウェイとして解糖系の代謝経路が重要であることを見出したこれまでの研究で見出された「高浸潤細胞」を有する細胞株 2 種 (SUM149 および MDA-MB-468) のうち、まず、浸潤細胞を回収しやすい SUM149 を用いて「高浸潤細胞」の集団を単離した。次に、SUM149 細胞の全体の集団、及び、単離した「高浸潤細胞」集団を用い、メタボローム解析を行ったところ、「高浸潤細胞」は細胞全体の集団と比較し、glucose-6-phosphate (G6P) の含有量が少なく、乳酸の産生量が多い、即ち、著しく解糖系に依存した代謝系を持つことが見出された (図 2)。この特徴は、PANC-1 の浸潤細胞においても同様に確認されたことから、「高浸潤細胞」において解糖系の代謝経路は重要なパスウェイであることが予想された。実際に「高浸潤細胞」では細胞全体の集団と比較し、培地中の糖の取り込みが多いこと、また、DNA マイクロアレイや western blotting の結果より、ピルビン酸脱炭酸反応を触媒する酵素である pyruvate dehydrogenase (PDH) の発現量、及び、そのリン酸化が有意に増加していることが確認された。PDH の発現量やリン酸化の度合いは、エネルギー代謝系において重要な役割を担っており、PDH の発現量やリン酸化の度合いが高いと、酸化リン酸化へのシフトを抑制し、解糖系を亢進させた代謝系へシフトさせることが知られている。このことから「高浸潤細胞」では、全体の細胞集団と比較し、解糖系が亢進していたことが示唆された。

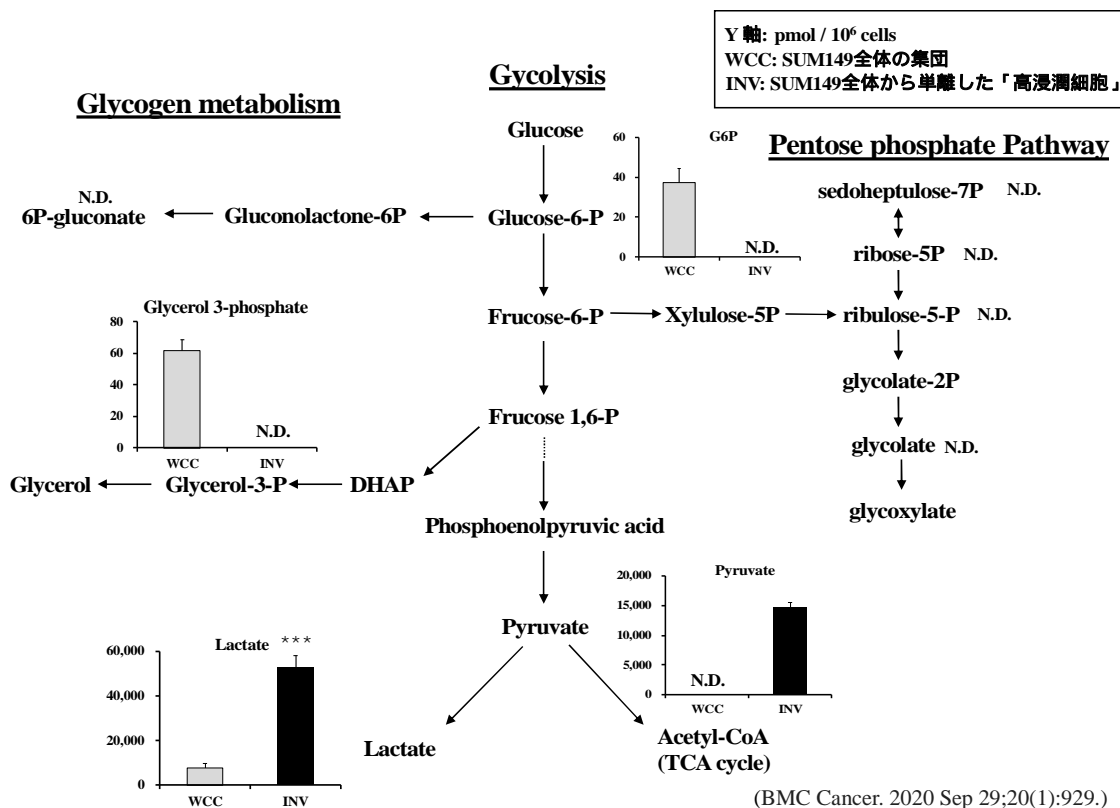
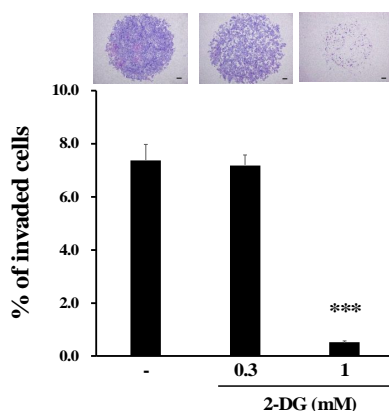


図2. 「高浸潤細胞」で確認された特徴的な代謝経路 (解糖系の亢進)

5) 「高浸潤細胞」でキーとなる解糖系を抑制し、それら細胞群の浸潤能を効率よく抑制する方法を提案した

「高浸潤細胞」で特徴的なパスウェイの解析より、「高浸潤細胞」では全体の細胞集団と比較し、解糖系の代謝経路が重要であることが見出された。そこで、解糖系の阻害剤を用い、SUM149 や MDA-MB-468 の浸潤能を抑制できるか検証した。解糖系の阻害剤である 2-deoxy-D-glucose (2-DG) は 2-ヒドロキシル基が水素原子に置換されたグルコースアナログであり、細胞に取り込まれても解糖系による代謝を受けないため、結果として解糖系の代謝経路を阻害する。我々はまず、2-DG を 0.3, 1, 2, 3 mM と濃度を振って細胞に添加したところ、2 mM 以上になると細胞死が誘導されることを確認した。2-DG は実際に副作用が問題視される薬剤である。がん細胞は正常細胞よりも解糖系にシフトしていることは古くから知られており(ワーブルグ効果)、抗がん作用を期待し 2-DG を用いた臨床試験も試みられてきた。しかし、副作用が強く現在臨床には用いられていない。実際に、2-DG を用い細胞殺傷効果を調べた報告はたくさんあるが、そのほとんどは 5 mM の 2-DG を用いている。本実験より、「高浸潤細胞」は癌細胞全体の集団よりもさらに顕著に解糖系に依存した代謝系を持つことを見出した。同じ遺伝子をもつ同一細胞株の集団の中で、一部だけ高い浸潤能を持つ集団が存在し、その集団は著しく解糖系に依存した代謝系を持つことから、我々はこの更なる解糖系の亢進によるエネルギーは、高い浸潤能に用いられているのではないかと予想した。そこで、本実験では細胞死が誘導されない低濃度(0.3 mM と 1 mM)を用い、「高浸潤細胞」の浸潤能を抑制することができるか検証した。その結果、1mM という低濃度で SUM149 や MDA-MB468 の浸潤能を効率よく抑制できることを見出した(図3)。2-DG は濃度によって副作用が問題視される薬剤であるが、本実験では、細胞生存率に影響のない低濃度で「高浸潤細胞」の浸潤能を効率よく抑制できることを明らかにした。



(BMC Cancer. 2020 Sep 29;20(1):929.)

図3. 2-DGによる「高浸潤細胞」の浸潤抑制効果(SUM149細胞)

本研究により、治療においてリスクがある「高浸潤細胞」は共通して著しく解糖系に依存した代謝系を持つことが明らかとなり、それらリスク細胞の浸潤を効率よく抑制できる薬剤の候補を提案することができた。

[雑誌論文]

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.

Fujita M, Imadome K, Somasundaram V, Kawanishi M, Karasawa K, Wink DA, Metabolic characterization of aggressive breast cancer cells exhibiting invasive phenotype: impact of non-cytotoxic doses of 2-DG on diminishing invasiveness BMC Cancer. 2020 Sep 29;20(1):929. doi: 10.1186/s12885-020-07414-y.

Kawanishi M, **Fujita M**, Karasawa K., Combining Carbon-Ion Irradiation and PARP Inhibitor, Olaparib Efficiently Kills BRCA1-Mutated Triple-Negative Breast Cancer Cells, Breast Cancer (Auckl). 2022 Mar 23;16:11782234221080553. doi: 10.1177/11782234221080553. eCollection 2022.

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計3件（うち査読付論文 3件/うち国際共著 2件/うちオープンアクセス 3件）

1. 著者名 Mayumi Fujita, Kaori Imadome, Veena Somasundaram, Miki Kawanishi, Kumiko Karasawa, David A Wink	4. 巻 20
2. 論文標題 Metabolic characterization of aggressive breast cancer cells exhibiting invasive phenotype: impact of non-cytotoxic doses of 2-DG on diminishing invasiveness	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 BMC Cancer	6. 最初と最後の頁 929
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1186/s12885-020-07414-y.	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 該当する

1. 著者名 Fujita M, Somasundaram V, Basudhar D, Cheng RYS, Ridnour LA, Higuchi H, Imadome K, No JH, Bharadwaj G, Wink DA.	4. 巻 22
2. 論文標題 Role of nitric oxide in pancreatic cancer cells exhibiting the invasive phenotype.	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Redox Biology	6. 最初と最後の頁 101158
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.redox.2019.101158	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 該当する

1. 著者名 Kawanishi Miki, Fujita Mayumi, Karasawa Kumiko	4. 巻 16
2. 論文標題 Combining Carbon-Ion Irradiation and PARP Inhibitor, Olaparib Efficiently Kills BRCA1-Mutated Triple-Negative Breast Cancer Cells	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Breast Cancer: Basic and Clinical Research	6. 最初と最後の頁 1-11
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1177/11782234221080553	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2件（うち招待講演 0件/うち国際学会 1件）

1. 発表者名 Fujita M, Somasundaram V, Basudhar D, Cheng RYS, Ridnour LA, Imadome K, No JH, Bharadwaj G, Wink DA
2. 発表標題 Role of nitric oxide in the invasive pancreatic cancer cells
3. 学会等名 AACR ANNUAL MEETING 2020（国際学会）
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 Fujita M, Somasundaram V, Basudhar D, Cheng RYS, Ridnour LA, Imadome K, No JH, Bharadwaj G, Wink DA
2. 発表標題 Role of nitric oxide in pancreatic cancer cells exhibiting the invasive potential
3. 学会等名 第80回日本癌学会学術総会
4. 発表年 2021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