

## 科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成 24 年 6 月 12 日現在

機関番号：82606

研究種目：基盤研究（C）

研究期間：2009～2011

課題番号：21591620

研究課題名（和文）癌細胞の接着機構に起因する放射線抵抗性因子を標的にした放射線感受性増感の研究

研究課題名（英文） The radiobiological study of radio-sensitization targeting molecules and/or signal transduction pathways that are involved in cell adhesion.

研究代表者

秋元 哲夫（AKIMOTO TETSUO）

独立行政法人国立がん研究センター・臨床開発センター・部長

研究者番号：10261851

研究成果の概要（和文）：本研究の目的は“癌細胞の細胞接着機構に起因する放射線抵抗性因子を明らかにし、その分子やシグナル伝達を標的にした放射線感受性増感”を達成することである。今年度は昨年度に引き続き癌細胞の細胞浸潤や転移の制御に関与し、E-cadherin の機能を負に制御する作用のある接着因子である Dyasdherin と放射線感受性との相関を中心に検討して、以下の結果を得ている。

1) 放射線感受性が異なるヒト癌細胞培養細胞を用いて、Dyasdherin の発現と細胞増殖能および放射線感受性を *in vitro* で検討した。その結果、Dyasdherin の発現が高いと増殖マーカーを指標とした増殖能が高く放射線感受性が低い傾向があること。2) 放射線照射による Dyasdherin 発現の変化を検討すると、その局在には変化はないものの照射後に一時的にその発現が増強すること。3) この発現の変化に伴って、EGFR とそのシグナルの活性化が呼応して活性化すること、を確認している。

これらの結果は、癌細胞の放射線応答に細胞接着因子が関わっている可能性を示唆するもので、その機序と関与するシグナル伝達経路を明らかにするため、現在研究をさらに継続しているところである。特に、平行して検討を行っている細胞増殖因子受容体と癌細胞の放射線応答との関係に注目している。EGFR および HER2 の活性化とその局在の変化（細胞表面から核へ）が放射線照射で誘導されるが、その活性化を阻害すると局在の変化も修飾される。その結果、照射による DNA 損傷修復過程を阻害して放射線感受性変化（放射線感受性の増強）に関与することを確認している。これらのシグナル伝達の活性化や細胞死およびその生存に関わるメディエーターについて、細胞接着因子に起因するシグナルとのクロストークを中心に検討を行った。この解析で、主要な働きをしている分子やシグナル伝達が明らかにし、その活性化阻害や発現抑制で、癌細胞の放射線応答がどのように変化するかを確認して、治療標的としての可能性を検討し報告する予定である。

研究成果の概要（英文）：

A purpose of this study is to achieve "the radiosensitive sensibilization that we determine a radioresistant factor due to the cell adhesion mechanism of the cancer cell, and targeted the molecules and signal transduction". We are involved in the control of cellular infiltration and the metastasis of the cancer cell secondary to last year and examine it mainly on Dyasdherin which is an adhesion factor providing it controlling a function of E-cadherin to minus number and a correlation with the radiation sensitivity and obtain the following results this year. Using the human cancer cell cultured cell which varied in radiation sensitivity, we examined manifestation of Dyasdherin and cellular proliferative capacity and radiation sensitivity *in vitro*. As a result, the proliferation potency that assumed a growth marker an index if manifestation of Dyasdherin is high is high, and radiation sensitivity tend to be low. The manifestation enhance the change after the radiation that there is not of the things in the localization temporarily when we examine a change of the Dyasdherin manifestation with 2) irradiation. With a change of these

3) manifestation, we confirm that the activation of the signal acts in concert with EGFR and is activated. These results are places continuing a study more now to determine the mechanism and associated signaling pathway with a thing suggesting the possibility that a cell adhesion factor is associated with the radiation reply of the cancer cell. Particularly, we pay attention to the relations with the radiation reply of a cell growth factor receptor and the cancer cell which we are parallel and examine. Activation of EGFR and HER2 and the localized change (from the cell surface to a nucleus) are induced by irradiation, but the localized change is adorned when we inhibit the activation. As a result, we confirm that we inhibit a DNA lesion repairing process by the radiation and are involved in a radiosensitive change (radiosensitive augmentation). We examined a mediator about activation and cell death of these signal transduction and the survival mainly on the crosstalk with the signal which was due to a cell adhesion factor. Molecules and signal transduction working primary by this analysis find and confirm it how the radiation reply of the cancer cell changes by the activation inhibition and manifestation suppression and we examine the likelihood as the treatment target and are going to report it.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2009年度	2,200,000	660,000	2,860,000
2010年度	600,000	180,000	780,000
2011年度	600,000	180,000	780,000
年度			
年度			
総計	3,400,000	1,020,000	4,420,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：内科系臨床医学 放射線科学

キーワード：放射線感受性、放射線、分子標的、接着因子、放射線抵抗性

1. 研究開始当初の背景

従来から間質の多い腫瘍や細胞同士の接着が強固な癌、たとえば高分化扁平表皮癌は細胞同士の接着が弱い低分化扁平上皮癌より放射線感受性が低い、といったことが分かっている。癌細胞同士の接着や癌細胞周囲の間質の多寡は病理学的な形態観察でも評価可能であり、これらの形態情報でも放射線感受性の善し悪しがある程度推測はできる場合がある。最近の研究でこの癌細胞同士の接着や癌細胞周囲の間質の多寡や癌細胞と間質（細胞外マトリックス）との相互作用が、細胞接着分子とそのシグナル伝達で精巧に制御されており、これらが癌の悪性度や転移・浸潤能の決定に関与していることが解明されつつある。インテグリン、カドヘリンなどの細胞接着因子がその主要な分子であるが、その局在や機能はそれぞれの接着因子で異なる。しかし、その分子ネットワークにはクロストークや共通の因子が関与していることも明らかとなっていくている。インテグリンを介するシグナル伝達の経路は、増殖因子受容体から伝達されるシグナル伝達経路と

ほぼ重複しており、両者が補完的に働くことによって精緻な細胞の増殖・分化の制御が行われているものと推定されている。細胞外基質（足場）に接着しなくても生存し増殖できる足場非依存性増殖能の獲得は正常細胞と癌細胞とを区別する重要な指標としても用いられてきた。正常な付着細胞では増殖因子やその他の因子の刺激と、インテグリンを介した細胞外基質への接着による刺激の両方が揃って初めて増殖シグナルならびに生存シグナルが伝達され、最終的に増殖が起こる。それに対して癌細胞では、このシグナル伝達のいずれかの段階がバイパスされるかまたは変化するために足場非依存性増殖能が可能と考えられている。さらにこの足場非依存性増殖能の獲得が抗癌剤や放射線治療に対する治療抵抗性の機序の一つである可能性が明らかにされつつある。これらの背景は我々がこれまで行ってきた癌細胞の放射線応答や増殖因子受容体とそのシグナル伝達の活性化と放射線感受性との相関といった研究と密接に関連しており、癌細胞の放射線応答に関わる分子機構のさらなる解明につ

ながる可能性が大きいため本研究は着想された。

## 2. 研究の目的

本研究の目的は、癌細胞の細胞接着に関わる機構が放射線に対する細胞応答や放射線感受性の決定にどのように関与しているかを解明して、放射線治療の効果増強の治療標的としての意義について検討することである。我々は、E-カドヘリンとその裏打ち蛋白である  $\alpha$ -カテニンが腫瘍の自然転移能に関与することをマウスの移植腫瘍を用いた研究で報告したが (Akimoto T et al: Clin Exp Metastasis 1999)、細胞接着因子が癌細胞の放射線応答にも関与していることを明らかにしている。細胞接着因子の一つである E-カドヘリンとその不活化に関わる **Dysadherin** の発現と放射線治療成績の相関について頭頸部扁平表皮癌症例を対象に手術および生検材料を用いた免疫組織学的検索で検討し、放射線治療の局所効果が **Dysadherin** の発現の高い症例で有意に不良で、また **Dysadherin** の発現グレードと E-カドヘリン発現グレードの差が大きい、つまり相対的に **Dysadherin** の発現が高い症例でリンパ節または遠隔再発が有意に高いことを報告した (Muramatsu H, Akimoto T et al: Anticancer Res in press)。この結果は、癌細胞の転移や浸潤能に関与する細胞接着因子が放射線治療後のリンパ節または遠隔再発の予測に有用なだけでなく、放射線治療の局所効果、つまり放射線感受性にも関与している可能性を示唆するものである。放射線が細胞接着因子の発現に与える影響に関して、癌細胞の E-カドヘリンの発現が放射線照射により増強し、癌細胞の浸潤能を修飾することを我々はすでに報告している (Akimoto T et al: Int J Radiat Oncol Biol Phys 1998, Ebara T, Akimoto T et al: Int J Radiat Oncol Biol Phys 1998)。また、インテグリンなどのシグナル伝達とクロストークする **EGFR** などの増殖因子受容体が放射線照射により自己リン酸化を介して活性化することから、放射線照射が細胞接着因子および増殖因子受容体の両者のシグナル伝達の活性化に影響して、癌細胞の放射線応答や治療感受性に密接に関与していることは容易に推測される。これらの結果は細胞接着因子や癌細胞の接着の状態が癌細胞の放射線応答に重要な働きをしていることを示すものと考えている。さらに、治療標的として重要な要件である癌特異性に関しては、細胞接着因子および増殖因子受容体の両者のシグナルの異常または活性化による足場非依存性増殖能の獲得そのものが癌の悪性度に関わる特異的なものであるため、治療標的として有望であると考えられる。インテグリンについ

ては治療標的として特異抗体や **small molecule agent** が開発され臨床応用され、臨床的な有効性について解明されつつあるが、癌治療における役割については今後の研究が待たれる段階である。

## 3. 研究の方法

本研究目的である、“癌細胞の細胞接着機構に起因する放射線抵抗性因子を明らかにし、その分子やシグナル伝達を標的にした放射線感受性増感”を達成するために、平成 21 年度は放射線感受性や接着機構が異なる培養細胞および正常細胞を用いた *in vitro* の研究を中心に行い、平成 22 年度以降は *in vitro* の研究の継続・発展に加えて、臨床材料を用いた発現解析を行い、臨床的な有用性を検証していく予定である。癌細胞の細胞接着機構に起因する放射線抵抗性因子を明らかにするには、遺伝子や蛋白の発現およびその活性の変化を詳細に検討する必要があり、培養細胞を用いた *in vitro* の定量的な解析が必要である。また、癌細胞の接着の修飾による放射線感受性への影響を解析するためには、細胞外マトリックスのコーティングにより細胞接着を阻害して行う *in vitro* の研究手法は有用である。放射線感受性修飾に関与する重要な分子候補については、候補分子に対する siRNA 導入による特異的な阻害や遺伝子導入による発現増強による影響について検証を行い、これらの標的分子の活性がどのように修飾されるかについても検討する予定である。申請研究者単独の研究であるが、これまで取得した研究手技などや設備により、予定期間内に研究目的に相応する結果が得られると考えている。

### 【平成 21 年度】

1. 放射線感受性が異なる癌細胞株の細胞接着因子発現をウエスタンブロットや蛍光抗体法で定量化する。それぞれの癌細胞の放射線感受性を調べるため、X線発生装置 (現有) にて異なる線量を照射して、細胞生残曲線から放射線感受性の違いを定量的に評価する。細胞生残率はコロニー形成法またはコロニー形成が不適な細胞では MT T アッセイで行う。

X線照射装置は現有の機器を使用し、ウエスタンブロットや蛍光抗体法の定量化も現有の解析装置で可能である。

2. 放射線感受性と細胞接着因子の発現との相関を検討する。癌細胞の細胞接着に関与する分子の発現との相関関係を明らかにし、放射線感受性とどのように相関しているかを解析して、候補分子を明らかにする。

3. 上記で用いた癌細胞の培養に用いているシャーレの底面をラミニンやコラーゲン IV などでコーティングして細胞接着の状態を変えて、接着の有無で増殖能 (足場非依存的増殖能) および放射線感受性がどのように

変化するかを検討する。放射線による細胞死の形態（アポトーシスの多寡）についても、フローサイトメトリーやDNA fragmentation assay で定量化する。また、スライドチャンバー培養下で細胞を照射して、経時的に細胞を固定する。カドヘリン、Dysadherin、インテグリンなどの細胞接着因子の発現や局在の変化を蛍光抗体法で検索し、細胞接着の有無や放射線感受性の違いでどのように発現や局在が異なるかについて検討する。また、増殖因子受容体のリン酸化やそのシグナル伝達の分子の活性化の変化についても、ウエスタンブロットなどで評価する。

#### 4. 研究成果

本研究の目的は“癌細胞の細胞接着機構に起因する放射線抵抗性因子を明らかにし、その分子やシグナル伝達を標的にした放射線感受性増感”を達成することである。今年度は昨年度に引き続き癌細胞の細胞浸潤や転移の制御に関与し、E-cadherinの機能を負に制御する作用のある接着因子であるDysadherinと放射線感受性との相関を中心に検討して、以下の結果を得ている。

1) 放射線感受性が異なるヒト癌細胞培養細胞を用いて、Dysadherinの発現と細胞増殖能および放射線感受性をin vitroで検討した。その結果、Dysadherinの発現が高いと増殖マーカーを指標とした増殖能が高く放射線感受性が低い傾向があること。2) 放射線照射によるDysadherin発現の変化を検討すると、その局在には変化はないものの照射後に一時的にその発現が増強すること。3) この発現の変化に伴って、EGFRとそのシグナルの活性化が呼応して活性化すること、を確認している。

これらの結果は、癌細胞の放射線応答に細胞接着因子が関わっている可能性を示唆するもので、その機序と関与するシグナル伝達経路を明らかにするため、現在研究をさらに継続しているところである。特に、平行して検討を行っている細胞増殖因子受容体と癌細胞の放射線応答との関係に注目している。EGFRおよびHER2の活性化とその局在の変化（細胞表面から核へ）が放射線照射で誘導されるが、その活性化を阻害すると局在の変化も修飾される。その結果、照射によるDNA損傷修復過程を阻害して放射線感受性変化（放射線感受性の増強）に関与することを確認している。これらのシグナル伝達の活性化や細胞死およびその生存に関わるメディエーターについて、細胞接着因子に起因するシグナルとのクロストークを中心に検討を行った。この解析で、主要な働きをしている分子やシグナル伝達が明らかにし、その活性化阻害や発現抑制で、癌細胞の放射線応答がどのように変化するかを確認して、治療標的としての可能性を検討し報告する予定である。

#### 5. 主な発表論文等

（研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線）

〔雑誌論文〕（計5件）

1. Nakamura K, Akimoto T, Mizowaki T, Hatano K, Kodaira T, Nakamura N, Kozuka T, Shikama N, Kagami Y. Patterns of practice in intensity-modulated radiation therapy and image-guided radiation therapy for prostate cancer in Japan. *Jpn J Clin Oncol.* 42(1): 53-7, 2012 (査読有り).
2. Okamoto M, Ishikawa H, Ebara T, Kato H, Tamaki T, Akimoto T, Ito K, Miyakubo M, Yamamoto T, Suzuki K, Takahashi T, Nakano T. Rectal Bleeding After High-Dose-Rate Brachytherapy Combined with Hypofractionated External-Beam Radiotherapy for Localized Prostate Cancer: The Relationship Between Dose-Volume Histogram Parameters and the Occurrence Rate. *Int J Radiat Oncol Biol Phys.* 2012 82(2): 211-7(査読有り).
3. Zenda S, Matsuura K, Tachibana H, Homma A, Kirita T, Monden N, Iwae S, Ota Y, Akimoto T, Otsuru H, Tahara M, Kato K, Asai M. Multicenter Phase II Study of an Opioid-based Pain Control Program for Head and Neck Cancer Patients Receiving Chemoradiotherapy. *Radiother Oncol.* 2011 101(3): 410-4(査読有り).
4. Akimoto T, Mitsuhashi N: Radiation Oncology and Molecular-Targeted Therapy for EGFR and its Signal Transduction Pathways: Molecular Basis and Clinical Application for Improvement of Radiotherapeutic Outcomes. *Curr Signal Transduct Ther* 5(3): 197-205, 2010(査読有り).
5. Nakamura K, Tahara M, Kiyota N, Hayashi R, Akimoto T, Fukuda H, Fujii M, Boku N. Phase II trial of concurrent chemoradiotherapy with S-1 plus cisplatin in patients with unresectable locally advanced squamous cell carcinoma of the head and neck: Japan Clinical Oncology Group Study (JCOG0706). *Jpn J Clin Oncol.* 39(7): 460-3, 2009(査読有り).

〔学会発表〕（計22件）

1. Akimoto T, Hashimoto Y, Motegi A,

- Kiyozuka M, Izumi S, Nakamura K, Maebayashi K, Iizuka Tanabe K, Mitsuhashi N: Correlation between the Changes in the EPIC QOL Score and the DVH Parameters in High Dose Rate Brachytherapy combined with Hypofractionated EBRT for Prostate Cancer. 2011 ASTRO annual meeting, 2011 (2011年10月3日、Sandiego, USA).
2. 泉佐知子、秋元哲夫、前林勝也、橋本弥一郎、茂木厚、大久保悠、三橋紀夫：中咽頭癌に対する強度変調放射線（IMRT）治療中の耳下腺体積と線量の変化、日本放射線腫瘍学会、2011（2011年11月17日、神戸）。
  3. 秋元哲夫：放射線治療の将来展望 -放射線生物と放射線治療- 癌治療増感研究会シンポジウム、2011（2011年2月10日、奈良）。
  4. 秋元哲夫：前立腺癌 日本医学放射線学会総会：教育講演、2011（2011年4月8日、東京）。
  5. 秋元哲夫：前立腺癌に対する画像誘導高線量率組織内照射 日本小線源治療部会：シンポジウム、2011（2011年5月8日、東京）。
  6. 秋元哲夫：化学放射線療法：放射線腫瘍医の立場から。日本臨床腫瘍学会：シンポジウム、2011（2011年7月22日、東京）。
  7. 秋元哲夫：頭頸部癌に対する Altered fractionation と化学放射線療法。日本頭頸部癌学会：シンポジウム、2011（2011年6月9日、横浜）。
  8. 秋元哲夫：高リスク前立腺癌に対する放射線治療 - その有効性と治療成績向上の可能性 - 前立腺シンポジウム：パネルディスカッション、2011（2011年12月11日、東京）。
  9. 橋本弥一郎、秋元哲夫、茂木厚、中村香織、泉佐知子、前林勝也、三橋紀夫、飯塚淳平、田邊一成：前立腺癌に対する外部照射併用高線量率組織内照射後の排尿系有害事象とQOLスコアに影響する因子。日本小線源治療部会、2011（2011年5月8日、東京）。
  10. Akimoto T: Acute and late toxicity after hypofractionated intensity-modulated radiotherapy for localized prostate cancer Trilateral International Symposium on Radiation Oncology 2009（2009年10月9日、ソウル）
  11. Akimoto T: Radiobiological response of cancer cells for radiation and molecular target agents the 22nd International Symposium foundation for promotion of cancer research 2009（2009年6月19日、東京）
  12. 秋元哲夫 教育講演：強度変調放射線治療 第68回日本医学放射線学会総会 2009（2009年4月18日、横浜）。
  13. 秋元哲夫：StageC 前立腺癌の治療戦略 -外照射併用高線量率組織内照射の優位性- 前立腺シンポジウム 2009（2009年12月13日、東京）。
  14. 秋元哲夫：放射線治療の進歩による治療成績向上の可能性：小線源治療 第47回日本癌治療学会総会 2009（2009年10月22日、京都）
  15. 秋元哲夫、三橋紀夫 前立腺癌の生物学的特性を考慮した放射線治療方法の可能性 第15回癌治療増感研究会 2009（2009年2月15日、奈良）
  16. 秋元哲夫、清塚 誠、茂木 厚、橋本弥一郎、中村香織、泉佐知子、前林勝也、橋本恭伸、田邊一成、三橋紀夫：前立腺癌に対する強度変調放射線治療を用いた寡分割照射法の急性および晩期有害事象 第22回日本放射線腫瘍学会 2009（2009年9月18日）
  17. 秋元哲夫：（シンポジウム）分子標的治療 日本癌治療学会（平成22年10月22日、京都）、2010。
  18. 秋元哲夫：（シンポジウム）放射線低感受性の克服に関する臨床ならびに基礎研究の概要 日本癌学会（平成22年9月23日、大坂）、2010。
  19. 秋元哲夫：（イブニングセミナー）高リスク前立腺癌の治療戦略 第75回日本泌尿器科学会東部総会（平成22年9月16日、宇都宮）、2010。
  20. 秋元哲夫：（シンポジウム）前立腺癌密封小線源永久挿入治療研究会（平成22年7月18日、東京）、2010。
  21. 秋元哲夫：（教育講演）寡分割照射 日本放射線腫瘍学会小線源治療部会第12回研究会（平成22年5月16日、東京）、2010。
  22. 秋元哲夫：（サテライトセミナー）日本におけるハイリスク前立腺癌の放射線治療の展望 第93回日本泌尿器科学会総会（平成22年4月29日、盛岡）、2010。
6. 研究組織
- (1) 研究代表者：秋元 哲夫 (AKIMOTO TETSUO)  
独立行政法人国立がん研究センター・臨床開発センター・部長  
研究者番号：10261851
  - (2) 研究分担者：なし  
( )  
研究者番号：

(3)連携研究者：なし  
( )  
研究者番号：