

**科学研究費助成事業 研究成果報告書**

平成 28 年 6 月 27 日現在

機関番号：82502

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2012～2015

課題番号：24591857

研究課題名(和文) 癌細胞-正常細胞相互作用を介した放射線応答機構の解析

研究課題名(英文) Study of radiation responses via tumor-normal cell interaction

## 研究代表者

下川 卓志 (Shimokawa, Takashi)

国立研究開発法人放射線医学総合研究所・重粒子医科学センター・チームリーダー

研究者番号：20608137

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,100,000円

研究成果の概要(和文)：本課題は癌の微小環境、特に癌細胞と間質細胞(正常細胞)の相互作用が、癌細胞の放射線応答反応にどのような影響を及ぼすかを明らかにする事を目的としている。培養細胞およびマウスモデルを用いた解析により、がん細胞の放射線応答において、正常細胞が周囲に存在することによる細胞間相互作用による効果を示された。またその過程においてWntならびにヘッジホッグシグナル伝達系ががん細胞の放射線影響に大きく寄与していることが示された。また本課題の成果は国際学会などで発表を行った。さらに成果の一部はすでに国際誌に掲載され、残りも投稿中である。

研究成果の概要(英文)：This project aimed to clarify impact of microenvironment, especially interaction between cancer cells and stromal cells (normal cells), on radiation response of cancer cells. By using culture cells and mouse models, we showed that presence of normal cells surround of cancer cells significantly influenced radiation response of cancer cells. In addition, it has been shown that Wnt and Hedgehog signal pathways contribute greatly to radiation effects of cancer cells during the process. We had presented our findings at international conferences. A part of results was published in an international journal, and others have been in submission to international journals.

研究分野：放射線生物学

キーワード：細胞間相互作用 放射線 がん細胞 正常細胞

1. 研究開始当初の背景

癌組織は癌細胞単独で形成されているのではなく、線維芽細胞や血管内皮細胞、免疫系細胞など多くの正常な細胞が混ざって形作られている。これまで多くの癌研究、特に癌治療のための分子標的選出のための解析では主に癌細胞に着目し、いかに癌細胞だけを単離して癌細胞自体で起こっている変化を解析するに力が注がれてきた。近年、臓器形成などで研究されてきた上皮間葉相互作用と同様に、癌細胞と免疫細胞などを含む正常細胞との相互作用の重要性が明らかになりつつあり、着目を集めている。

申請者は、前所属での研究テーマの一つとしてHedgehogシグナル伝達系を介した癌細胞-間質細胞相互作用の解析を主に前立腺癌と膀胱癌について行ってきた。この分野の一連の研究により、癌細胞は正常細胞とHedgehogやWnt, EGFといったシグナル因子を介して相互作用を行っており(Fig.1)、癌細胞単独の解析では不十分である事が明らかになりつつある。

放射線治療は手術・抗癌剤治療と同様に癌

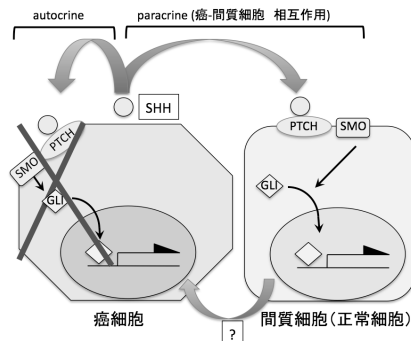


Fig.1 癌-間質相互作用の一例  
癌の種類によって、ヘッジホッグシグナル伝達系は癌細胞が分泌したSHHリガンドが癌細胞自身に作用するケースと、癌細胞自身は応答できず間質細胞に作用して間接的に癌の増殖に寄与するケースが知られている。

治療の中心的な方法の一つとしてすでに確立されており、さらに近年ではQOLを下げない治療法として注目されている。欧米では癌患者の約6割が放射線治療を受けており、今後は日本においても放射線治療を受ける患者の増加が予想される。

重粒子線治療は炭素などの粒子を加速して治療に利用する新しい放射線治療法である。その深部線量分布の特徴から腫瘍部へのピンポイント照射が可能であり、高い抗腫瘍効果と副作用の軽減が知られている。さらに手術が困難な深部のがんや他の治療法では効果の低いがんに対しても効果的である事が報告されている。一方で、他の治療法より良い成績ではあるが、遠隔転移や局所再発または効果が低い症例も報告されている。重粒子線を含む放射線治療のより効果的な適用には、放射線照射による転移抑制(Fig.2)や腫瘍の放射線抵抗性獲得といった腫瘍部における各種の応答反応についてより詳細な分子機構の解明が必要がある。しかしながらこれまでの研究は2次元(2D)細胞培養を用

いた解析が多く、正常細胞をも含む立体的な腫瘍組織に対する放射線の生物効果については(特に重粒子線照射による生物効果については研究可能な施設が少ない事もあり)不明な点が多い。

2. 研究の目的

本研究では、癌の微小環境、特に癌細胞と間質細胞(正常細胞)の相互作用、が癌細胞の放射線応答反応にどのような影響を及ぼすかを明らかにする事を目的としている。

高度先端医療である重粒子線を用いた放射線治療は、非常に効果的な癌治療法のひとつである。局所制御成績が良い重粒子線治療ではあるが、遠隔転移への対応や腺癌など原発巣制御効果の低い癌の存在などまだまだ課題が多い。本研究テーマでは癌細胞と同様に治療効果に關与する正常細胞の中で特に間質細胞に着目し、間質細胞からのシグナル伝達による癌細胞の放射線応答への影響とその作用機序を解明して、治療効果予測の改善や新規治療標的の同定を最終的な目標としている。

3. 研究の方法

本研究課題では蛍光タンパク質安定発現細胞株を使ったin vitro {2次元(2D), 3次元(3D)培養}, in vivoを用いた(Fig.2)。

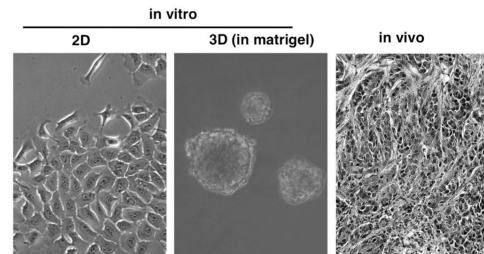


Fig.2 培養条件による癌細胞形態変化  
マウス癌細胞をコートされていないシャーレ上(左図: 2D)、matrigel 中(中央図: 3D)またはマウス下肢に移植(右図: in vivo)して培養した時の細胞形態

細胞は、正常細胞としてNIH3T3 およびMEF細胞を、がん細胞としてマウス由来の癌細胞株(NR-S1, Colon26, LM8, LLC)を用いた。放射線としてX線(200keV, 20mA, 0.5mm Cu+0.5mm Al), 線(60Co)と炭素イオン線(290MeV, mono-energetic beam, LET 70-90keV/um)を用いた。

細胞の生存率はcolony formation assayを用いて評価を行い、回収した細胞はNGS法、real-time qPCR法を用いて遺伝子発現解析を行った。

4. 研究成果

細胞培養系の影響を比較したところ、二次元と三次元培養ではその遺伝子発現が明らかに異なっていた。一方で、三次元培養はスフェア内が中空になるなど、個々の細胞塊ご

とに条件が異なり、定量的な生存率などの評価に影響することが示唆されたため、主に二次元培養と in vivo での解析を行った。

正常細胞と共培養したところ、がん細胞は単独で培養した場合に比べ、放射線抵抗性を示した。さらに遺伝子発現を比較したところ、単独培養と共培養での差が認められた。

さらに繰り返し照射時にがん細胞単独の場合と正常細胞が存在する状況での影響を、樹立された細胞間での性状比較と NGS を用いた遺伝子発現解析を行った。両者では放射線に対する感受性の変化に明確な差が認められ、また性状変化も異なる傾向であった。詳細に比較するために行った NGS による解析では、はっきりとした発現変動が確認でき、放射線感受性の変化への関与が予想される幾つかの候補遺伝子が同定されたが、その変化の方向性に一般性が認められなかった。そこで主成分分析を行ったところ、正常細胞存在下では、その変化が大きくなることが認められた(Fig. 3)。

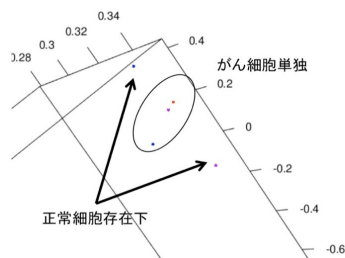


Fig.3 主成分分析結果  
マウス癌細胞を異なる条件で照射を行い、その後樹立された細胞間での遺伝子発現をNGSを用いて解析し、比較を行った。

本課題により、正常細胞とがん細胞の相互作用による放射線応答への影響の一部が明らかになった。本解析により同定された候補遺伝子については更なる個々の解析・評価が必要であり、引き続き解析を行っている。

## 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 1 件)

1. Sato K, Imai T, Okayasu R, Shimokawa T\*. Heterochromatin domain number correlates with X-ray and carbon-ion radiation resistance in cancer cells. Radiat Res, 査読, 182, 2014, 408-419.

〔学会発表〕(計 14 件)

1. Shimokawa T. Biological Research at HIMAC, NIRS: Biological advantages of Carbon ion irradiation for cancer therapy, IAEA Technical Meeting, 2015.11.12, Vienna(Austria)

2. Shimokawa T. Immune response modulation with 12C ion therapy. ISIT, 2015.10.15-18, Dallas(U.S.A)
3. 佐藤 克俊, 今井 高志, 下川 卓志. Homologous recombination repair is enhanced in X-ray and carbon ion beam resistant cancer cells. 日本癌学会, 2015.10.8-10, 名古屋
4. Sato K, Ma L, Sakamoto Y, Imai T, Shimokawa T. Repeated  $\gamma$ -ray Irradiation but Not C-ion Irradiation Promotes Malignant Progression of Regrown Tumor. International Congress of Radiation Research, 2015.5.25-29, 京都
5. Shimokawa T, Fujita H, Sato K, Fujita T, Ma L, Ando K, Irie D, Imai T. Elucidating the mechanisms behind radiation induced pneumonitis and pulmonary fibrosis. International Congress of Radiation Research, 2015.5.25-29, 京都
6. 佐藤 克俊, 今井 高志, 下川 卓志. 放射線治療後の再増殖腫瘍モデルの樹立とこれらの性質変化の解析. 日本放射線影響学会, 2014.10.1-3, 鹿児島
7. 佐藤 克俊, 今井 高志, 下川 卓志. Repeated carbon ion beam irradiations confer the carbon ion beam resistance but not X-ray resistance in cancer cells. 日本癌学会, 2014.9.25-27, 横浜
8. Shimokawa T, Sato K, Ma L, Daisuke Iizuka, Kanai, A, Irie D, Ohtsuka H, Suga K, Imai T. Identification of Molecular Markers to Develop Carbon ion therapy. RIRBM, 2014.2.13-14, 広島
9. Shimokawa T. Combination of Carbon-ion Irradiation and Immunotherapy in Mouse Models. NIRS & MedAustron, 2013.12, Vienna(Austria)
10. Shimokawa T, Fujita H, Hosoi A, Sato K, Kakimi K, Imai T. Analysis of underlying mechanisms for combination therapy of carbon-ion irradiation and dendritic cell immunotherapy. The Japanese Cancer Association, 2013.10.3-5, 横浜
11. Sato K, Imai T, Shimokawa T. Heterochromatin focus number correlates with X-ray and carbon ion beam resistance in cancer cells. The Japanese Cancer Association, 2013.10.3-5, 横浜
12. Sato K, Irie D, Nakawatari M, Nakamura E, Moritake H, Imai T, Shimokawa T. Establishment and characterization of novel carbon-ion

beam resistance cells. HITSRS2013, 2013.05, 千葉

13. Shimokawa T, Nakamura E, Sato K, Iizuka D, Kanai A, Irie D, Nakawatari M, Imai T. Next-Generation Sequencing for Identification of Molecular markers in Prognosis of Carbon ion therapy. RIRBM, 2013.2, 広島
14. 下川 卓志、藤田 英俊、安藤 謙、佐藤 克俊、鶴岡 千鶴、中村 悦子、中渡 美也子、今井 高志. 重粒子線-樹状細胞併用療法による転移制御の検討. 「個体レベルでのがん研究支援活動」ワークショップ、2013.2, 滋賀

〔図書〕(計 0 件)

〔産業財産権〕

出願状況(計 0 件)

名称：  
発明者：  
権利者：  
種類：  
番号：  
出願年月日：  
国内外の別：

取得状況(計 0 件)

名称：  
発明者：  
権利者：  
種類：  
番号：  
取得年月日：  
国内外の別：

〔その他〕

ホームページ等

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

下川 卓志 (SHIMOKAWA Takashi)

放射線医学総合研究所・重粒子医科学センター・チームリーダー

研究者番号：20608137