

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 5 月 27 日現在

機関番号：11301

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2012～2013

課題番号：24659174

研究課題名(和文)放射線耐性の克服に向けたミトコンドリア研究の新展開

研究課題名(英文)New developments in mitochondrial study to overcome

研究代表者

福本 学 (FUKUMOTO, MANABU)

東北大学・加齢医学研究所・教授

研究者番号：60156809

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,000,000円、(間接経費) 900,000円

研究成果の概要(和文)：X線照射及びドセタキセル(DTX)処理後、親株ではミトコンドリア(mt)由来の活性酸素種(ROS)が検出されたが、臨床的放射線耐性(CRR)細胞では検出されなかった。過酸化水素耐性細胞は、X線及びDTXに耐性であった。SAS及びHeLa細胞から樹立したmtDNA欠失細胞であるrho0細胞は、X線(10 Gy)照射及びDTX(100 ng/ml)処理後、mt由来のROSは検出されず、両者に耐性を示した。以上から、ミトコンドリア由来のROSがCRR形質及びDTX耐性に関与していることが強く示唆された。

研究成果の概要(英文)：Mitochondrial reactive oxygen species (ROS) was detectable in parental cells but not in clinically relevant radioresistant (CRR) cells after 10 Gy of X-ray irradiation or 100 ng/ml of doxorubicin (DTX) treatment. We established cells resistant to H₂O₂ and they revealed to be resistant both to X-rays and DTX. Mitochondrial DNA depleted rho0 cells were also established. They were resistant both to X-ray irradiation and DTX treatment without ROS production. These suggest that ROS derived from mitochondria are involved in the CRR phenotype and DTX resistance.

研究分野：実験病理学

科研費の分科・細目：基礎医学・実験病理学

キーワード：臨床的放射線耐性 がん細胞 ミトコンドリア ワールブルグ効果

1. 研究開始当初の背景

申請者らは、標準的な放射線療法である 2Gy/日の X 線を 30 日以上照射し続けても増殖する培養細胞を臨床的放射線耐性 (clinically relevant radioresistant; CRR) 細胞と定義し、由来の異なる複数のヒトがん培養細胞から CRR 細胞の樹立に世界で初めて成功した (Kuwahara Y et al. Cancer Sci 100:747-52, 2009)。CRR 細胞は分割照射ばかりでなく、比較的高線量の急照射 X 線 (10Gy) にも耐性を示すこと (Kuwahara Y et al. J Radiat Res 51:297, 2010)、親株に比べて DNA 修復能が高いこと、オートファジー細胞死の誘導が抑えられており、mTOR 阻害剤であるラパマイシン処理により放射線耐性の克服が可能であることを明らかにした。さらに、親株で X 線照射後に誘発されるオートファジー細胞死を抑制すると、X 線に耐性を示すことを明らかにした (Kuwahara Y et al. Cell Death Dis 2:e177, 2011)。

2. 研究の目的

ヌードマウス皮下へ移植した CRR 細胞由来の腫瘍でも、2 Gy/日の X 線照射に耐性を示した。血管新生阻害剤 RAD001 を投与すると抗腫瘍がみられ、親株に比べて CRR 腫瘍の縮小傾向が有意であった。抗腫瘍効果は、血栓形成による血流障害により引き起こされたと考えられる。さらに、親株及び CRR 細胞を低栄養条件で培養すると、CRR 細胞の増殖は親株に比べて顕著に抑えられることを見出した (発表論文 6)。このことは、CRR 細胞は栄養要求性が高いことを意味している。また、シスプラチン、5-FU など複数の抗がん剤を用いた今までのスクリーニング結果から、CRR 細胞は微小管脱重合阻害剤であるドセタキセル (DTX) に耐性を示すことが明らかとなった。

一般的に、DTX 耐性には チューブリンの過剰発現や薬剤排出ポンプであり MDR1 遺伝子にコードされている P-糖タンパクなどの過剰発現が関与していると考えられているが、CRR 細胞では否定された。本研究では、CRR 細胞がなぜ DTX に耐性を示すのかをミトコンドリアが関与しているのではないかとこの視点で解析を行った。

3. 研究の方法

X 線照射および DTX 処理によって、親株及び CRR 細胞でミトコンドリアからの ROS (reactive oxygen species) 発生が亢進するかをミトコンドリアからの ROS を特異的に検出することのできる Mito SOX Red 染色を行い解析する。ROS 耐性が放射線耐性に関与しているかを明らかにするために、親株及び CRR 細胞の過酸化水素 (H_2O_2) への感受性を解析し、さらに H_2O_2 耐性細胞を樹立して

放射線及び DTX に対する交叉耐性の有無を評価する。ミトコンドリア呼吸鎖複合体の放射線感受性への関与を検討するために、ミトコンドリア DNA 欠失 0 細胞を臭化エチジウム (EtBr) 処理により複数の細胞株から樹立して、放射線感受性を解析する。

4. 研究成果

Mito SOX Red 染色による解析から、10 Gy の X 線を照射すると全ての親株において照射 3 時間後からミトコンドリアより ROS が生じることが分かった。この結果は、今までの報告と一致する。しかし、X 線を照射した全ての CRR 細胞からは、ミトコンドリアからの ROS は照射 3 時間後にわずかに検出されたものの、その程度は親株に比べて明らかに低かった。100 ng/ml のドセタキセル (DTX) 処理した親株及び CRR 細胞でも同様の結果が得られた (図 1)。

親株及び CRR 細胞の過酸化水素 (H_2O_2) への感受性を WST アッセイで解析すると、全ての CRR 細胞は親株に比べて H_2O_2 に耐性を示すことが分かった (図 2)。

次に、複数の親株から H_2O_2 耐性細胞を樹立して、これらの細胞が X 線に耐性を示すのかを解析した。その結果、 H_2O_2 (50 ng/ml) で処理し続けても増殖する H_2O_2 耐性細胞を HepG2, SAS, HeLa 細胞から樹立することに成功した。HDS 及び WST assay で X 線及び DTX 感受性を解析すると、樹立した全ての H_2O_2 耐性細胞は、親株に比べて X 線及び DTX に耐性を示した。

以上から、特にミトコンドリア由来の ROS が X 線耐性及び DTX 耐性に関与しているのではないかとこの事が強く示唆された。そこで、ミトコンドリア DNA を欠失させることによって、ミトコンドリアの機能の低下した 0 細胞の樹立を複数の細胞株から行い、X 線及び DTX への感受性を解析することにした。

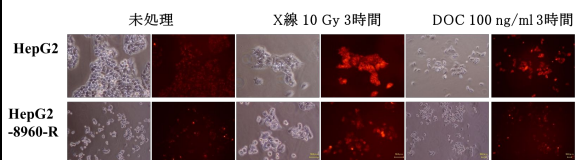


図 1 . Mito SOX Red 染色

親株である HepG2 及び CRR 細胞である HepG2-8960-R 細胞に 10 Gy の X 線照射または 100 ng/ml の DTX を処理して、ミトコンドリアからの ROS を検出した。

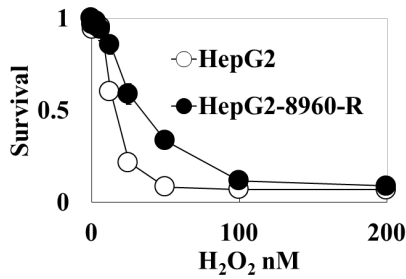


図2 .WST assay による H₂O₂ 感受性の検討
CRR 細胞である HepG2-8960-R 細胞は、親株である HepG2 に比べて H₂O₂ に耐性を示した。

0 細胞の樹立は、HepG2, SAS, HeLa 細胞に 2 カ月以上の臭化エチジウム (EtBr) 処理をするこのにより試みた。0 細胞樹立の確認は、細胞より DNA を抽出して、ミトコンドリア DNA 上にある cytochrome b の増幅の有無を PCR で確認することで行った。EtBr 処理により、SAS 及び HeLa 細胞からの樹立に成功したが、EtBr 処理した HepG2 細胞からは、cytochrome b の増幅が確認できなかったため 0 細胞の樹立は出来なかったと考えられる。SAS- 0 及び HeLa- 0 細胞の X 線感受性を High density survival (HDS) assay で解析すると、親株に比べて耐性を示した(図 3)。

また、DTX 感受性を HDS assay 及び WST assay で解析しても 0 細胞は親株に比べて耐性を示した。さらに、X 線(10 Gy)を照射して、ミトコンドリアからの ROS の検出を試みたが、0 細胞は CRR 細胞と同様に、ミトコンドリアからの ROS は検出されなかった。

同様の結果は、DTX 処理後にも認められた。

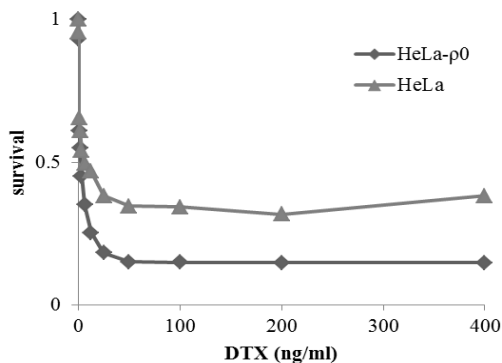


図3 .WST アッセイによる DTX 感受性の解析

HeLa- 0 細胞は HaLa 細胞に比べて DTX に耐性を示した。

以上から CRR 細胞の X 線と DTX への交叉耐性はミトコンドリア由来の ROS 産生が抑制されていることに起因していることが示唆された。

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 6 件、全て査読有)

1. Kuwahara Y, Mori M, Kitahara S, Fukumoto M, Ezaki T, Mori S, Echigo S, Ohkubo Y, Fukumoto M: Targeting of tumor endothelial cells combining 2 Gy/day of X-ray with Everolimus is the effective modality for overcoming clinically relevant radioresistant tumors. *Cancer Med.* doi: 10.1002/cam4.185, 2014.
2. Sakurai T, Kudo M, Watanabe T, Itoh K, Higashitsuji H, Arizumi T, Inoue T, Hagiwara S, Ueshima K, Nishida N, Fukumoto M, Fujita J: Hypothermia protects against fulminant hepatitis in mice by reducing reactive oxygen species production. *Dig Dis* 31(5-6):440-6, 2013. (doi: 10.1159/000355242)
3. Shimura T, Fukumoto M, Kunugita N: The role of cyclin D1 in response to long-term exposure to ionizing radiation. *Cell Cycle* 1;12(17):2738-43, 2013.(doi: 10.4161/cc.25746)
4. Shimura T, Ochiai Y, Noma N, Oikawa T, Sano Y, Fukumoto M. : Cyclin D1 overexpression perturbs DNA replication and induces replication-associated DNA double-strand breaks in acquired radioresistant cells. *Cell Cycle* 1;12(5):773-82, 2013. (doi: 10.4161/cc.23719)
5. Liu Y, Higashitsuji H, Higashitsuji Hi, Itoh K, Sakurai T, Koike K, Hirota K, Fukumoto M, Fujita J: Overexpression of gankyrin in mouse hepatocytes induces hemangioma by suppressing factor inhibiting hypoxia-inducible factor-1 (FIH-1) and activating hypoxia-inducible factor-1. *Biochem Biophys Res Commun* 432(1):22-7, 2013. (doi: 10.1016/j.bbrc.2013.01.093)
6. Shimura T, Noma N, Oikawa T, Ochiai Y, Kakuda S, Kuwahara Y, Takai Y, Fukumoto M: Activation of the AKT/cyclin D1/Cdk4 survival signaling pathway in radioresistant cancer stem cells. *Oncogenesis* 1: e12, 2012. (doi:10.1038/oncsis)

6 . 研究組織

(1) 研究代表者

福本 学 (FUKUMOTO MANABU)
東北大学・加齢医学研究所・教授
研究者番号 : 60156809

(2) 研究分担者

(3)連携研究者

桑原 義和 (Kawahara Yoshikazu)

東北大学・加齢医学研究所・助教

研究者番号：00392225

志村 勉 (Shimura Tsutomu)

国立保健医療科学院・生活環境研究部

上席主任研究官

研究者番号：40463799