

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 6 月 12 日現在

機関番号：12602

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2013～2014

課題番号：25670796

研究課題名(和文)放射線照射後の口腔癌における再発起源癌幹細胞の同定とその特性解析

研究課題名(英文) Identification and analysis of cancer stem cells responsible for recurrence after irradiation

研究代表者

三浦 雅彦 (Miura, Masahiko)

東京医科歯科大学・医歯(薬)学総合研究科・教授

研究者番号：10272600

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,800,000円

研究成果の概要(和文)：本研究の目的は、口腔癌に対する放射線治療において、再発の原因となる癌幹細胞の位置を同定することである。そこで、舌癌細胞株に細胞周期を可視化するFucciプローブを発現させた細胞株並びに癌幹細胞を可視化するプロテアソームセンサーを発現する細胞株を樹立した。スフェロイドを作製し、その内部に癌幹細胞の存在を確認した。照射後、内部の細胞は静止期にある間は赤色を保って細胞死が起らず、長期間生存した。増殖条件が揃うと、緑色、赤色へと変化した後、一部細胞死が起こった。これらの観察から、低酸素状態にある癌幹細胞は、静止期にいる間、細胞死は起らず、再発に大きな役割を果たすと考えられた。

研究成果の概要(英文)：The purpose of this study was to identify the position of cancer stem cells responsible for recurrence after irradiation. For this purpose, we established an oral cancer cell line expressing the Fucci probes (a cell cycle visualizing system) or proteasome-sensor probes (a cancer stem cell-visualizing system). After making spheroids, we found that the outer layer was green and inner region was red, and the latter was also proteasome-sensor positive. After irradiation, the outer layer almost became green and increased in its intensity. Thereafter, the outer turned to red and died, and the inner red cells became green with thickness of $\sim 50\mu\text{m}$. These results indicate that cancer stem cells exist in inner region and exhibit radioresistance, and the inner cells are recruited to proliferating state when growth conditions are given.

研究分野：医歯薬学

キーワード：蛍光イメージング

1. 研究開始当初の背景

放射線治療後、腫瘍内のどこから再発が生じるかという問題は、依然として未解決であるが、臨床サイドからその解明が強く求められている。一般に、低酸素状態にあり増殖を停止した癌細胞は、放射線抵抗性を示すことが知られている。従って、こうした癌細胞は、放射線治療後に再発する有力候補として考えられてきた。実際、照射時に *in vivo* で低酸素状態にある細胞をラベルし、その後、酸素化してもラベルされ続ける新技術を用いて、*in vivo* でも低酸素細胞が再発起源となる可能性が、本年初めて示唆された(Harada et al., *Nat Commun*, 2012)。しかしながら、腫瘍血管近傍の増殖活性の高い癌細胞が再発しやすいとの多くの報告も古くから存在する(Yamaura and Matsuzawa, *Int J Radiat Biol*, 1979)。最近では、再発には癌幹細胞が関与すること、さらに、癌幹細胞の性質を維持する場(ニッチ)として、低酸素性ニッチと血管性ニッチの存在が明らかにされている(Takakubo and Suda, *Int J Hematol*, 2012)。申請者は、古くから再発候補とされてきた2種類の細胞の存在領域と、2つの癌幹細胞ニッチが一致することに注目し、この未解決課題は、低酸素領域と血管周囲のどちらのニッチに存在する癌幹細胞が再発の主要因となるか、という問題に帰着できると考えた。本研究は、古典的放射線生物学で議論されてきた重要な課題を、近年の癌幹細胞生物学的知見から捉え直し、最新のイメージング技術を導入することで、臨床的に重要な課題の解決にチャレンジするものである。

2. 研究の目的

癌の放射線抵抗性に関する多くの知見が蓄積されてきたものの、放射線治療後、腫瘍内のどの部分から再発が起こるのかという極めてシンプルかつ重要な問題に対して、明確な答えは未だに得られていない。本研究は、その解明を目指して、特に口腔癌において1) 低酸素領域に存在する増殖活性の低い癌幹細胞、2) 腫瘍血管周囲に存在する増殖活性の高い癌幹細胞にターゲットを絞り、どちらが放射線治療後の再発起源となりうるのかを、リアルタイム蛍光イメージング技術を駆使した観察から、明らかにしようとするものである。

3. 研究の方法

(1)細胞株

実験には、既にこれまでも使用している細胞周期を可視化する Fucci プローブを発現させた HeLa-Fucci 細胞ならびに本研究において新たに樹立した舌癌細胞株 SAS-Fucci 細胞を使用した。

(2)スフェロイドモデル

細胞が接着しない培養プレートを用いて細胞を培養し、直径約 500 μm 程に3次元構

築させた多細胞スフェロイドを作製した。観察は、組織切片を作製するかわりに、共焦点蛍光顕微鏡を用いてその内部観察を行った。この方法では、表層から 100 μm 程の深部までしか観察できなかったため、さらに深部を観察するために、組織透明化試薬 scale を用いて、観察を行った。放射線を照射後、緑色と赤色の蛍光変化ならびに細胞死を反映する蛍光消失の様子を、経時的な蛍光イメージングにより追跡した。

(3)背部皮下ウインドウチャンパーモデル

通法に従い、ヌードマウス背部皮下に腫瘍を移植し、ガラス窓を設置して、経時的に観察を行った。

(4)ヌードマウス皮下移植腫瘍モデル

ヌードマウス皮下に腫瘍細胞を移植し、数 mm から 1cm 程度まで成長した固形腫瘍を実験に用いた。組織切片を作製し、内部の蛍光を観察した。また、フotonイメージャーを用いて、緑色蛍光、赤色蛍光のリアルタイムイメージング、さらに、その強度を定量化して、赤色に対する緑色の比率を経時的に求めた。

(5)癌幹細胞の検出

癌幹細胞は、プロテアソーム活性が低下することが知られており、これを利用して、この活性が低下することで緑色蛍光を発するプロテアソームセンサーを SAS 細胞に発現させた細胞株(SAS-stem sensor 細胞)を樹立して実験に用いた。

4. 研究成果

(1)HeLa-Fucci 細胞での知見

Fucci を既に発現している HeLa-Fucci 細胞を用いて、スフェロイドモデル、背部皮下ウインドウチャンパーモデル、ヌードマウス皮下移植腫瘍モデルを作製し、10Gy 照射後の変化を追跡した。その結果のまとめを図 1 に示す。スフェロイドモデル：

非照射時には、スフェロイドの外部、内部いずれも赤色蛍光優位で、その区別はつかなかった。

照射 16 時間後、表層では、ほぼすべての細胞が緑色を呈したが、深部では、深さ約 70 μm の幅を持つ緑色細胞層とその内部の赤色層の 2 つに明確に区分された。

照射後、緑色を呈した層は、48 時間経過しても緑色優位な状態が続いていた。

内部の赤色層は、その後緑色に変化した。

その後、次第に蛍光を発する細胞の数の減少を認めたが、再増殖する様子は見られなかった。

線量を 50Gy に落として同様の観察を行ったところ、22 日まで蛍光を発する細胞の存在を確認したが、その後、形態を維持できず崩壊した。

背部皮下ウインドウチャンパーモデル：

チャンバー内に腫瘍の生着を確認し、血管の観察も可能であった。

数日を経過すると、ガラスが不透明に変化し、観察が不能になることがわかった。

照射後、再発に至るまでの経過を観察することは困難であった。

腫瘍血管を破壊する試薬による血管の変化の観察には適していた。

ヌードマウス皮下移植腫瘍モデル：

ヌードマウス皮下に腫瘍を形成させ、組織切片を作製した所、スフェロイド同様、赤色と緑色に局在の違いは認められなかった。

10Gy 照射 1 日後、周辺部が緑色、壊死部周辺が赤色になり、明確に分離することがわかった。

照射 2 日後には、ほとんどの細胞が緑色になり、驚くべきことに、5 日後も持続していた。G2 期マーカーで、5 日後の細胞はほとんどがマーカー陽性であり、G2 期にあることを確認した。

それぞれの蛍光のリアルタイムイメージングとその定量化に成功し、緑/赤の比率によって、G2 アレストの程度を反映することを確認した。

スフェロイドとマウス皮下腫瘍モデルでは、単層培養に比べ、DNA 二重鎖切断修復 (DSB 修復) が、抑制されていることが判明した。

この腫瘍では、再発による腫瘍体積の再増殖を確認できなかった。

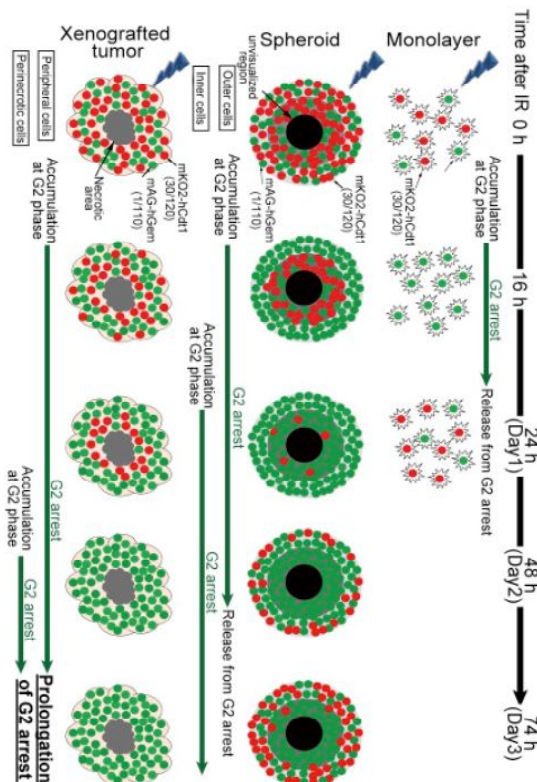


図1 HeLa-Fucci 細胞におけるスフェロイドと皮下移植腫瘍の 10Gy 照射後の蛍光動態

(2) SAS-Fucci 細胞、SAS-stem sensor 細胞出の知見

当初、Fucci を発現させるプラスミドを用いて、2 種類の Fucci プロブを SAS 細胞に導入することを何度も試みたが、片方は入るものの、同時に 2 種類を発現する細胞は得られなかった。そこで、理研よりレンチウイルスを発現するプラスミドを入手して、ウイルスによる導入を試み、ようやく 2 種類を発現する細胞を樹立し、SAS-Fucci と名付けた。細胞周期依存的に蛍光が変化することを確認した。

スフェロイドモデル：

スフェロイドに 10Gy 照射した後の経時的な蛍光像を図 2、図 3 に示す。

HeLa-Fucci 細胞と異なり、初めから外層が緑色、内層が赤色を呈していた。

10Gy 照射すると、次第に緑色が強まっていき、24 時間後をピークに減少を示しながら、少しずつサイズの減少が認められ、外層から細胞の脱落が起こっていると考えられた。

10 日後には、緑色を示す外層が消失し、ほぼ赤色のみを示した。

その後、次第に外層が緑色となり、20 日後には、再度強い緑色が出現した。

30 日後には、外層の脱落により、再度赤色を呈する様になった。

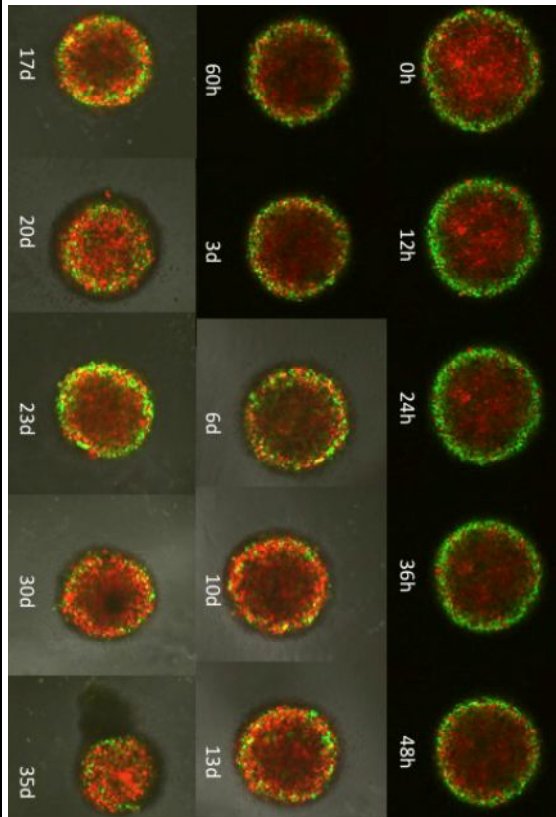


図2 SAS-Fucci 細胞から作製したスフェロイドにおける 10Gy 照射後の経時的蛍光イメージ(1)

別のスフェロイドでは、やはり外層細胞

が緑色に変化、すなわち静止期の細胞が増殖しだすことで細胞死が起って脱落する現象がみられ、このスフェロイドでは、14日以降、内部の赤色がそのまま52日目まで残存し、57日目に蛍光が消失した。

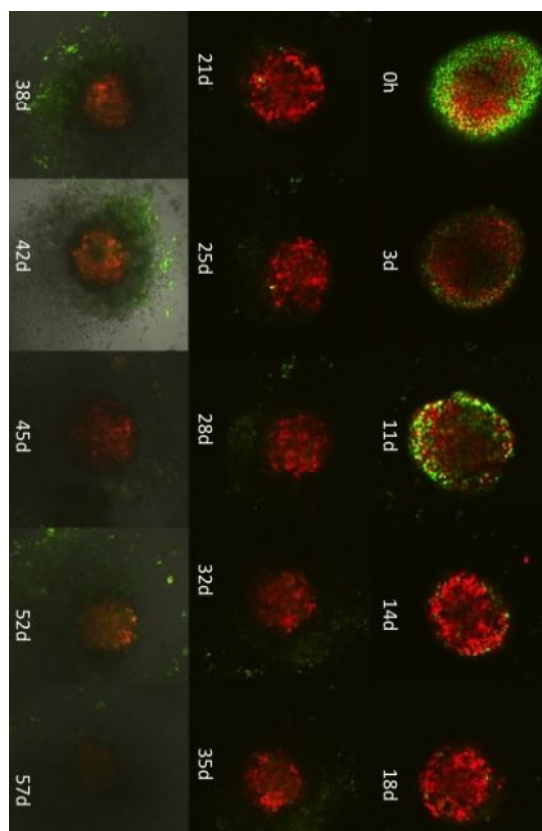


図3 SAS-Fucci 細胞から作製したスフェロイドにおける 10GY 照射後の経時的蛍光イメージ(2)

SAS-stem sensor 細胞を用いてスフェロイドを作製すると、スフェロイド内部に緑色蛍光が認められ、Fucci の蛍光との比較から、内部の赤色領域に癌幹細胞が存在することを示している(図4)

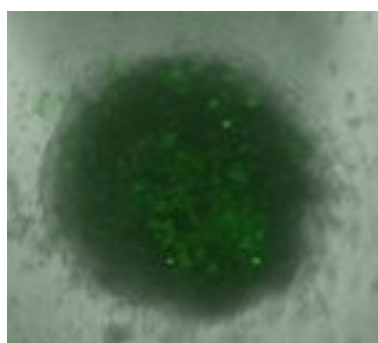


図4 SAS-stem sensor 細胞によって作製されたスフェロイド内部の蛍光像

ヌードマウス皮下腫瘍移植モデル：

ヌードマウスに SAS-Fucci 細胞を移植して孤閉腫瘍を形成させ、組織切片を作製して内部の蛍光を観察した。赤色と緑色の蛍光の

局在については、HeLa-Fucci と同様に特徴的なものは見いだされなかったが、一部緑色が多い領域、赤色が多い領域が散見された。

10Gy 照射6時間後には、明確に緑色と赤色の分離が見え始め、48時間後にも赤色が消失することはなかった。すなわち、スフェロイドの結果と類似した所見であった(図5-7)。

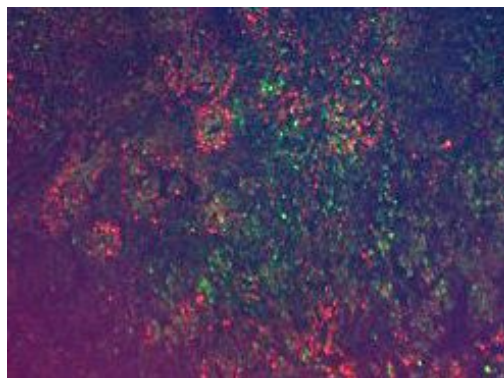


図5 SAS-Fucci 細胞から作製した固形腫瘍切片における蛍光像

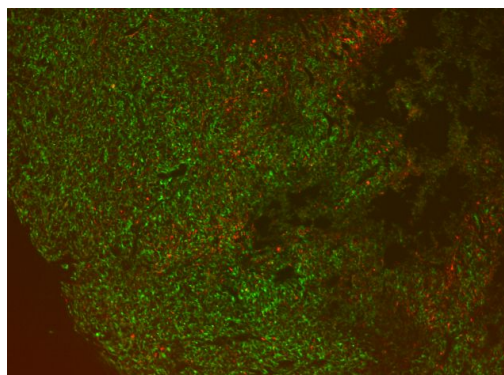


図6 SAS-Fucci 細胞から作製した固形腫瘍切片における 10Gy 照射6時間後の蛍光像

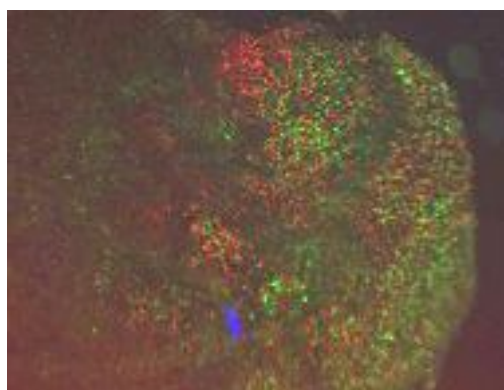


図7 SAS-Fucci 細胞から作製した固形腫瘍切片における 10Gy 照射48時間後の蛍光像

(3)考察

細胞周期を可視化する Fucci システムを導入した HeLa 細胞と舌癌細胞の2種類の細胞株を使用することによって、スフェロイド、固形腫瘍内での放射線照射後の細胞周期動態を明確に捉えることに成功した。その結果、HeLa 細胞では、非照射時には増殖分画と静止

期分画において、いずれも赤色優位で区別がつかなかったが、10Gy 照射後、増殖分画のみが緑色に移行して G2 アレストを示し、静止期分画が赤に留まることで、明確に2つが分離された。その後、静止期にある赤色分画が緑色分画に移行したことから、照射後、G0 期から細胞周期が回転する様子も捉えたことになる。さらに、スフェロイドでは、照射後の緑色期の延長が有意に認められ、驚くべきことに、固形腫瘍では5日間も持続することがわかった。このことは、DSB 修復の抑制と関連していると考えられ、現在、詳細を検討している。しかしながら、HeLa 細胞では、再発の様子を可視化することは困難であった。

一方、SAS-Fucci 細胞では、HeLa-Fucci 細胞とは異なる蛍光動態を示した。非照射時においても赤色と緑色が分離しており、照射後は、増殖分画における G2 アレストによる緑色強度の増加が認められた。スフェロイドでは、その後、G2 アレストの解除が認められるとともに、細胞死が起こって外層部の脱落が認められた。内部の赤色細胞のみとなるが、再度緑色分画が外層に出現するとともに、細胞の脱落が起こった。すなわち、スフェロイドの内部に存在する細胞は、単層培養では根絶する線量でも G0 期に留まりながら生存可能であるが、増殖分画に移行する際に細胞死を引き起こすことがわかる。癌幹細胞のマーカー解析から、癌幹細胞は、スフェロイド内部で静止期に留まっていることがわかった。本実験では、その後増殖する転機が訪れる度に細胞死が起こっていたが、その間に DNA 修復を行う機会には十分にあることから、この分画に存在する癌幹細胞が再発の原因となっている可能性は、極めて高いと考えられた。血管周囲に存在する癌幹細胞の存在は、今回、技術的に確認することができなかったが、常に増殖していると考えられるそうした細胞が、照射後も生存する可能性は低いと考えられた。静止期に存在する細胞は、低酸素状態にもあり、極めて放射線抵抗性であることから、こうした細胞が再発の原因になっている可能性を提唱する。

5 . 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計 4 件)

1. Tsuchida E, Kaida A, Pratama E, Ikeda M-A, Suzuki K, Harada K, Miura M: Effect of X-irradiation at different stages in the cell cycle on individual cell-based kinetics in an asynchronous cell population. **PLOS One**, in press 査読有

2. Hayashi Y, Takeno H, Chinen T, Muguruma K, Okuyama H, Taguchi A, Takayama K, Yakushiji F, Miura M, Usui T, Hayashi Y. Development of a new benzophenone-diketopiperazine-type potent antimicrotubule agent possessing 2-pyridine structure. **ACS Med Chem Lett**. 査読有

5(10):1094-1098,2014 DOI:10.1021/ml5001883

3. Nahar K, Goto T, Kaida A, Deguchi S, Miura M: Effects of Chk1 inhibition on the temporal duration of radiation-induced G2 arrest in HeLa cells. **J Radiat Res**, 査読有 55(5):1021-1027, 2014 DOI:10.1093/jrr/rru038

4. Kaida A, Miura M: Visualizing the effect of tumor microenvironments on radiation-induced cell kinetics in multicellular spheroids consisting of HeLa cells. **Biochem Biophys Res Commun**, 査読有, 439:453-458, 2013 DOI: 10.1016/j.bbrc.2013.093

〔学会発表〕(計 5 件)

1. 三浦雅彦: 分子標的薬の併用において考慮すべき放射線生物学. 第10回新潟 Radiology Update 学術講演会, 2015年2月28日, 新潟 (朱鷺メッセ)

2. 三浦雅彦: 腫瘍微小環境が照射後の腫瘍細胞動態に及ぼす影響の可視化: 第5回国際放射線生物学会大会シンポジウム. 2015年2月21日, 高崎 (高崎シティギャラリー)

3. 三浦雅彦 シンポジウム: 放射線照射後の腫瘍細胞動態の可視化から見える腫瘍微小環境が生み出す新たな放射線抵抗性機構の可能性. 第16回癌治療増感シンポジウム 2014年2月7日~8日 奈良

4. Masahiko MIURA 招待講演: Potential utility of Fucci in radiobiology KIRAMS Symposium 2013. For better understanding of radiation signaling in cancer 2013年8月23日 ソウル・韓国

5. Masahiko MIURA 招待講演: Biological Response after Radiation Exposure: Visualization of cell cycle kinetics in tumor cells after radiation exposure using Fucci. The 3rd Asian Congress of Radiation Research 2013年5月10-13日 北京・中国

〔図書〕(計 0 件)

〔産業財産権〕

出願状況 (計 0 件)

取得状況 (計 0 件)

〔その他〕

<http://www.tmd.ac.jp/mdth/index.html>

6 . 研究組織

(1) 研究代表者

三浦 雅彦 (MIURA, Masahiko)

東京医科歯科大学・大学院医歯学総合研究科・教授・研究者番号: 10272600