

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 6 月 10 日現在

機関番号：10101

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2013～2014

課題番号：25861045

研究課題名(和文)放射線治療後のがん細胞転移に及ぼす間欠的低酸素の影響評価とその制御を目指した研究

研究課題名(英文)The basic study for evaluation and control of the influence of intermittent hypoxia on metastatic potential of tumor cells

研究代表者

安井 博宣 (Yasui, Hironobu)

北海道大学・(連合)獣医学研究科・助教

研究者番号：10570228

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,100,000円

研究成果の概要(和文)：本研究課題において、間欠的低酸素に曝されたがん細胞が放射線処置を受けた際の、自身の転移能に起こる変化と、放射線誘導細胞死を免れた後に周囲のがん細胞にどのような影響を及ぼすかについて、以下の成果を得た。

1. 間欠的低酸素前処理を行うことで、腫瘍細胞の浸潤能、遊走能が上昇した。
2. X線照射を受けた細胞では線量依存的にEGF産生の上昇が観察され、EGFRの発現も上昇した。これらの変化が原因となり、培養培地上清で処理したがん細胞の浸潤能が上昇した。

研究成果の概要(英文)：In this study, I revealed the biological effect of intermittent hypoxia on the metastatic potential in tumor cells and the influence of X-irradiation on the surrounding cells as a by-stander effect as follows;

1. The preconditioning of tumor cells with intermittent hypoxia increased the migration and invasion potentials compared to normoxia and persistent hypoxia.
2. The conditioned medium of irradiated cell (CM) enhanced invasive ability of cancer cells. EGF mRNA and EGF concentrations was increased in X-irradiated cells and in the CM, respectively. Combined with the result that the CM activated EGFR, it is suggested that X-irradiation induces EGF expression of tumor cells, and increased EGF concentration in the CM, resulting in higher invasive ability of the surrounding cells.

研究分野：放射線生物学

キーワード：間欠的低酸素 固形腫瘍 放射線 転移

1. 研究開始当初の背景

放射線生物学における低酸素の重要性は、Hallらの”Radiobiology for the Radiologist”の教科書にあるように古くから知られている。低酸素細胞に対して放射線治療は、酸素効果の減弱や HIF-1 など悪性形質に関わる転写因子などの発現誘導によって十分な効果が得られないこともよく知られる事象である。

近年、我々のグループは腫瘍内の低酸素領域の 20~30%程度に、慢性的な低酸素に加え、数秒から数時間単位で変化する間欠的な低酸素が含まれていることを明らかにした。この間欠的低酸素と放射線治療効果が密接に相関していることが分かってきているが、慢性低酸素と比較した時の腫瘍形質に与える特徴的な影響やそのメカニズムといった点に関して、いまだ十分な知見が有るとは言えなかった。また我々は、間欠的低酸素暴露されたがん細胞が放射線抵抗性を獲得することを明らかにし、この事から腫瘍内において、照射時に十分酸素が含まれる領域であっても照射前の間欠的低酸素プレコンディショニングががん細胞の放射線感受性を低下させ、治療後に生き残っていることを示唆するものであった。悪性腫瘍などでは放射線治療後の再発転移が大きな問題となっているため、将来的な根治を目指す上で、このように繰り返し低酸素-再酸素化ストレスを受け、生残したがん細胞がどのような挙動を取るのかを詳細に調べる必要があると考えられた。

2. 研究の目的

上記の背景を元に、本申請課題の当初の目的として、腫瘍内部で自然発生的に起こる間欠的低酸素が血管近傍のがん細胞の形質を変化させ、放射線治療後も生き延び、その後の再発、転移の一因になっていると仮説を立て、間欠的低酸素とがん細胞の転移能の相関性およびその獲得メカニズムについて明らかにすることとした。

具体的には、まず間欠的低酸素ががん細胞の浸潤能に与える影響について検討し、その原因となっている分子を明らかにすることを目的とした。

また、放射線照射による細胞死を免れたがん細胞が、周囲のがん細胞に対してどのような形質変化を与えるかを遊走能、浸潤能を指標とした評価を行った。加えて、この作用メカニズムを明らかにするために、分子生物学的検討を行った。

3. 研究の方法

(1)間欠的低酸素処理によるがん細胞の浸潤能への影響

A549 細胞を接着させた 60 mm プラスチックシャーレを、ガス交換チャンバー内に移して 95% N₂ と 5% CO₂ を含む混合ガスを 10 分間通気することで低酸素化した。持続的な低酸素

処理として、チャンバーを密閉して 37 °C 条件下で 6 時間維持した。間欠的低酸素処理には、37 °C、低酸素条件下で 1 時間維持した後、チャンバーを開放して 37 °C、5% CO₂ 条件下で 30 分維持し、再び低酸素化するという作業を 4 回繰り返した(図 1)。その後、細胞を回収し、前述のインベージョンアッセイにて細胞の浸潤能を調べた。

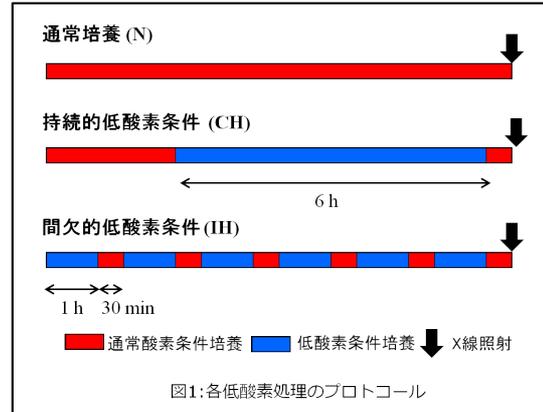


図1:各低酸素処理のプロトコール

(2)放射線照射したがん細胞の培養培地が、がん細胞の上皮成長因子 (EGF) およびそのレセプター (EGFR) に与える影響

X線照射後のがん細胞における EGF の mRNA 発現はリアルタイム PCR 法にて検討した。細胞に X 線を照射した後、経時的に細胞を回収し、SV Total RNA Isolation System (Promega) を用いて総 RNA を抽出した。一定量の RNA を Reverse Transcription System (Promega) を用いて逆転写反応させ、リアルタイム PCR 反応は LightCycler® Nano System (Roche) および FastStart Essential DNA Green Master (Roche) を用いて行った。内因性コントロールとして GAPDH を使用した。

CM 中における EGF 濃度の測定は、EGF Human ELISA Kit (abcam) を用いて行った。

CM で処理した細胞における EGFR のリン酸化レベルの評価はウェスタンブロットにて行った。CM 処理後、SDS サンプルバッファーを用いて直接細胞を溶解し、7.5% SDS-ポリアクリルアミドゲルに展開した。ニトロセルロース膜に転写後、メンブレンをブロッキングの上、抗 EGFR 抗体 (Santa Cruz) および抗 phospho EGFR (pEGFR) 抗体 (Cell Signaling Technology) と 4 °C で一晩反応させた。HRP 標識二次抗体と室温で 1 時間反応させたメンブレンを Western Lightning™ Chemiluminescence Reagent Plus kit (Perkin Elmer Life Sciences) を用いて化学発光による検出を行った。

(3)放射線照射したがん細胞の培養培地が、がん細胞の浸潤能に与える影響

腫瘍細胞として、ヒト乳がん由来 MDA-MB-231 細胞およびヒト肺がん由来 A549 細胞を用いた。細胞を接着させた 60 mm プラスチックシャーレに無血清培地を加え、即座に X 線を照射し、24 時間培養した。得ら

れた培養培地上清を条件培地(CM)とし、以降の実験に用いた。

細胞浸潤能はBD BioCoat Matrigel Invasion Chamber を用いたインベーションアッセイにより評価した。上部チャンバーには薬剤を含む無血清培地に懸濁した細胞を入れ、下部チャンバーには1% FBS を含むCMを入れた。一定時間培養後、メンブレン上面に存在する非浸潤細胞を除き、メンブレン下面の浸潤細胞を1% トルイジンブルーで染色して計測した。細胞浸潤能は、0 Gy CM 処理細胞の浸潤細胞数を1とした相対値で表した。

4. 研究成果

(1) 間欠的低酸素処理によってがん細胞の浸潤能が上昇する

次に、間欠的低酸素環境が、がん細胞自身の浸潤能に与える影響についてインベーションアッセイにて検討した。先の報告で、6回の低酸素と再酸素化を繰り返すことで放射線抵抗性が上昇したことが分かっていたため、浸潤能についても6回の間欠的低酸素処理を行った。その結果、6時間の慢性低酸素処理に比べて、浸潤能が上昇する傾向が得られた。また、この浸潤能上昇の原因と考えられる転写調節因子の発現上昇が観察されたため、現在はsiRNAなどによる遺伝的ノックダウンや特異的阻害剤による効果を検討している。

(2) 放射線照射したがん細胞の培養培地は、がん細胞の浸潤能を上昇させる

CM が細胞の浸潤能に及ぼす影響を調べるために、まずインベーションアッセイを行った。下部チャンバーにMDA-MB-231 細胞およびA549 細胞由来のCMを入れ、上部チャンバーには細胞を入れて6時間および12時間におけるそれぞれの細胞の浸潤能を評価した。図2に示す様に、CM はそれぞれの細胞浸潤能をX線線量依存的に促進した。

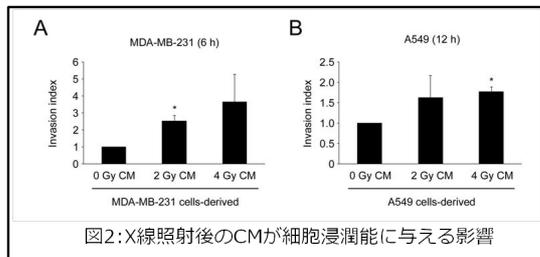


図2: X線照射後のCMが細胞浸潤能に与える影響

(3) EGF は X 線照射により誘導されるバースタンダー因子である

X線照射細胞由来CMが細胞浸潤能を促進したことより、X線照射細胞由来CM中に細胞浸潤能を促進する何らかのバースタンダー因子が存在することが考えられた。そこでX線照射細胞由来CMによる浸潤能促進作用が大きかったMDA-MB-231細胞を用いて、浸潤能に関連するいくつかのタンパク質に関してX線非照射細胞および4 Gy照射細胞のmRNA量をリアルタイムPCR法により比較した。幾つ

かの液性因子の発現を検討し、そのうちEGFのmRNA量は非照射細胞と比較して4 Gy照射細胞においてX線照射後18時間をピークとして有意に増加していた(図3A)。そこで次に、ELISA法により培養培地中のEGF濃度を測定した。EGF濃度は、MDA-MB-231細胞およびA549細胞共に0 Gy CMと比較して4 Gy CMにおいて増加する傾向がみられた(図3B)。また、この傾向はX線照射後12時間の時点でも同様であった。さらに、CMが細胞のEGFRリン酸化に及ぼす影響をウエスタンブロット法により検討した。MDA-MB-231細胞のEGFRリン酸化レベルは、0 Gy CM処理細胞と比較して4 Gy CM処理細胞において処理後3時間をピークとして増加していた(図3C)。これらの結果から、X線照射により細胞のEGF発現が誘導され、細胞外培養培地中のEGF濃度が増加することが示唆された。

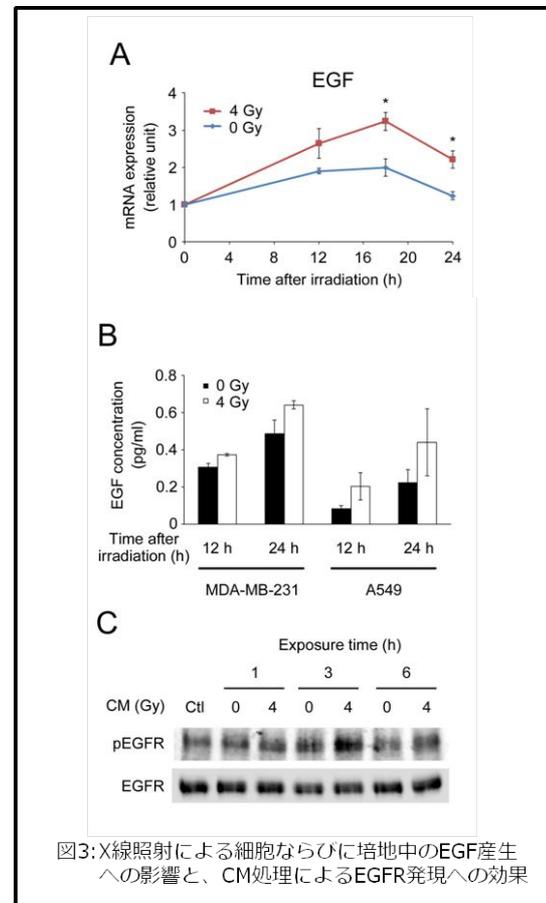
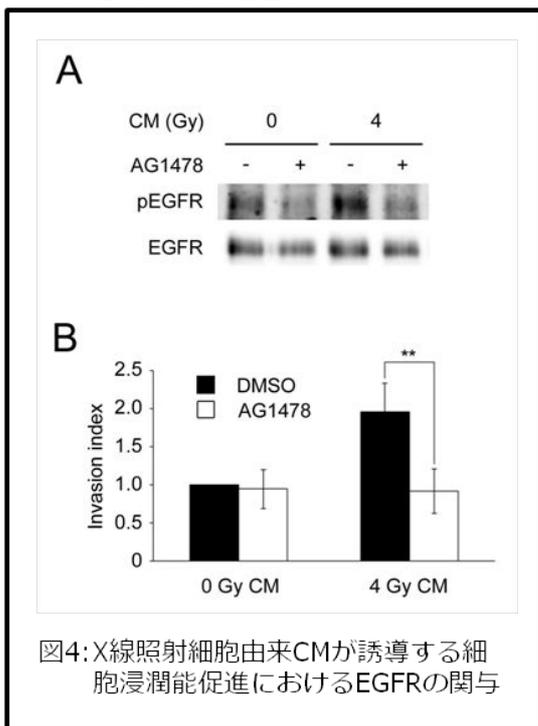


図3: X線照射による細胞ならびに培地中のEGF産生への影響と、CM処理によるEGFR発現への効果

(4) X線照射細胞由来CMが誘導する細胞浸潤能促進におけるEGFRの関与

EGFRの活性化は細胞浸潤能を促進することが報告されている。そこでEGFが増加することが示唆されたX線照射細胞由来CMがEGFRを介して細胞浸潤能を促進しているかどうかを調べるために、EGFRチロシンキナーゼ特異的な阻害剤であるAG1478を用いてMDA-MB-231細胞における検討を行った。まず、ウエスタンブロット法によりAG1478がEGFRリン酸化に及ぼす影響を調べた。CM処理3時間におけるEGFRリン酸化は、0 Gy CM処理細胞と比較して4 Gy CM処理細胞において増加

し、この増加は AG1478 処理により明らかに抑制された (図 4A)。次に、インページョンアッセイにより AG1478 が細胞浸潤能に及ぼす影響を調べた。CM 処理 6 時間における細胞浸潤能は、0 Gy CM 処理細胞と比較して 4 Gy CM 処理細胞で増加し、この増加は AG1478 処理により有意に抑制された (図 4B)。これらの結果は、X 線照射細胞由来 CM は EGFR を介して細胞浸潤能を促進することを示唆した。



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 8 件)

- 1: Sakata K., Kondo T., Mizuno N., Shoji M., Yasui H., Yamamori T., Inanami O., Yokoo H., Yoshimura N., and Hattori Y. Roles of ROS and PKC- II in ionizing radiation-induced eNOS activation in human vascular endothelial cells. *Vascul. Pharmacol. in press.* doi: 10.1016/j.vph.2015.03.016 査読有
- 2: Sakai Y., Yamamori T., Yasui H., and Inanami O. Downregulation of the DNA repair enzyme apurinic/aprimidinic endonuclease 1 stimulates transforming growth factor- 1 production and promotes actin rearrangement. *Biochem. Biophys. Res. Commun. in press.* doi: 10.1016/j.bbrc.2015.03.163 査読有
- 3: Nagane M., Yasui H., Sakai Y., Yamamori T., Niwa K., Hattori Y., Kondo T., and Inanami O. (2015) Activation of eNOS in endothelial cells exposed to ionizing

radiation involves components of the DNA damage response pathway. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 456(1):541-546. doi: 10.1016/j.bbrc.2014.12.002 査読有

- 4: Yasui H., Takeuchi R., Nagane M., Meike S., Nakamura Y., Yamamori T., Ikenaka Y., Kon Y., Murotani H., Oishi M., Nagasaki Y., and Inanami O. (2014) Radiosensitization of tumor cells through endoplasmic reticulum stress induced by PEGylated nanogel containing gold nanoparticles. *Cancer Lett.* 347(1):151-158. doi: 10.1016/j.canlet.2014.02.005. 査読有
- 5: Goodwin J., Yachi K., Nagane M., Yasui H., Miyake Y., Inanami O., Bobko A.A., Khrantsov V.V., and Hirata H. (2014) In vivo tumour extracellular pH monitoring using electron paramagnetic resonance: the effect of X-ray irradiation. *NMR Biomed.* 27:453-458. doi: 10.1002/nbm.3081. 査読有
- 6: Nishida N., Yasui H., Nagane M., Yamamori T., and Inanami O. (2014) 3-Methyl pyruvate enhances radiosensitivity through increasing mitochondria-derived reactive oxygen species in tumor cell lines. *J. Radiat. Res.* 55(3):455-463. doi: 10.1093/jrr/rrt142 査読有
- 7: Yamamori T., Meike S., Nagane M., Yasui H., and Inanami O. (2013) ER stress suppresses DNA double-strand break repair and sensitizes tumor cells to ionizing radiation by stimulating proteasomal degradation of Rad51. *FEBS Lett.* 587(20):3348-3353. doi: 10.1016/j.febslet.2013.08.030 査読有
- 8: Nagane M., Yasui H., Yamamori T., Zhao S., Kuge Y., Tamaki N., Kameya H., Nakamura H., Fujii H., and Inanami O. (2013) Radiation-induced nitric oxide mitigates tumor hypoxia and radioresistance in a murine SCCVII tumor model. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 437(3):420-425. doi: 10.1016/j.bbrc.2013.06.093 査読有

[学会発表](計 39 件)

- 1: “ミトコンドリア指向性ニトロキシドにおける分子骨格と放射線増感作用との相関性に関する研究” 安井博宣、西村英里、永根大幹、笹川朋哉、山盛徹、山崎俊栄、山田健一、稲波修 第 17 回癌治療増感研究

- シンポジウム in 奈良県文化会館 (奈良市, 奈良) 2015.2.6-7
- 2: "Longitudinal ESR imaging of tumor oxygenation for cancer radiotherapy combined with the metabolic-targeted drug" Yasui H., Saito K., Nishida N., Matsumoto S., Yamamori T., Krishna M.C. and Inanami O. *Joint Conference of Asia-Pacific EPR/ESR Symposium 2014-International EPR/ESR Society Symposium-53rd The Society of Electron Spin Science and Technology (SEST) Annual Meeting* in Todaiji Culture Center (Nara) 2014.11.12-16
 - 3: "金粒子含有ナノゲルによる小胞体ストレスを介した放射線増感作用" 安井博宣、武内亮、永根大幹、山盛徹、池中良徳、昆泰寛、室谷憲紀、大石基、長崎幸夫、稲波修 *日本放射線影響学会第 57 回大会* in かがしま県民交流センター (鹿児島市, 鹿児島) 2014.10.1-3
 - 4: "放射線と癌微小環境" 安井博宣 *Free Radical School in Tateyama* in 筑波大学館山研修所 (館山市, 千葉) 2014.8.7-9
 - 5: "Optimization of the metabolic-targeted radiosensitizing treatment by longitudinal analysis of tumor oxygenation" Yasui H., Saito K., Nishida N., Matsumoto S., Yamamori T., Krishna M.C., Inanami O. *The 17th Biennial Meeting of Society for Free Radical Research International (SFRR 2014)* in Kyoto International Conference Center (Kyoto) 2014.3.23-26
 - 6: "LONGITUDINAL ANALYSIS OF TUMOR OXYGENATION AFTER THE METABOLIC-TARGETED TREATMENT WITH DICHLOROACETATE USING PULSED ESR IMAGING" Yasui H., Saito K., Nishida N., Matsumoto S., Yamamori T., Krishna M.C., Inanami O. *The FIRST Joint International Symposium (Sapporo meeting)/ The 1st GI-CoRE Medical Science and Engineering Symposium* in Sapporo Park Hotel (Sapporo) 2014.2.23-24
 - 7: "がん代謝標的薬剤ジクロロ酢酸処理後の腫瘍内酸素環境の経時的解析と放射線併用プロトコールの最適化" 安井博宣、齋藤圭太、西田直哉、松元慎吾、山盛徹、Murali C. Krishna、稲波修 *第 16 回癌治療増感研究シンポジウム* in 奈良県文化会館 (奈良市, 奈良) 2014.2.7-8
 - 8: "The metabolic-targeted treatment with dichloroacetate transiently decreases tumor oxygenation in a murine squamous cell carcinoma model" Yasui H., Saito K., Nishida N., Matsumoto S., Yamamori T., Krishna M.C., Inanami O. *The 20th Annual Meeting of the Society for Free*

- Radical Biology and Medicine* in Grand Hyatt San Antonio (San Antonio, TX, USA) 2013.11.20-24
- 9: "パルス EPR イメージングを用いたがん代謝標的薬剤ジクロロ酢酸処理後の腫瘍内酸素環境の経時的解析" 安井博宣、齋藤圭太、西田直哉、松元慎吾、山盛徹、Murali Krishna、稲波修 *第 52 回電子スピンサイエンス学会年会* in 大宮ソニックシティ (さいたま市, 埼玉) 2013.10.24-26
 - 10: "電子スピン共鳴法を用いた酸素イメージングによる腫瘍内間欠的低酸素の描出とその意義" 安井博宣、松元慎吾、齋藤圭太、山盛徹、Murali C. Krishna、稲波修 *日本放射線影響学会第 56 回大会* in クラウンパレス青森 (青森市, 青森) 2013.10.18-20
 - 11: "ラットグリオーマ細胞における間欠的低酸素曝露による細胞周期調節を介した放射線抵抗性獲得機構" 安井博宣 *第 72 回日本癌学会学術総会* in パシフィコ横浜 (横浜市, 神奈川) 2013.10.3-5
 - 12: "The assessment of mitochondrial-derived ROS production in X-irradiated tumor cells by ESR spin-trapping and oximetric methods" Yasui H., Yamamori T., Inanami O. *The 1st Sapporo Summer Seminar for One Health* in Hokkaido University (Sapporo) 2013.9.25-26

他、共同演者として、27 件。

〔その他〕
ホームページ等

6. 研究組織

(1) 研究代表者

安井 博宣 (YASUI HIRONOBU)
北海道大学・大学院獣医学研究科・助教
研究者番号：10570228