

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 6 月 8 日現在

機関番号：23903

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2013～2015

課題番号：25861301

研究課題名(和文) 抗癌剤耐性や肺転移形成と細胞周期との関連 Fucci導入肉腫細胞を用いた解析

研究課題名(英文) Correlation between cell cycle and chemotherapy resistance and lung metastases - Analysis using Fucci transfected sarcoma cells

研究代表者

木村 浩明(KIMRA, HIROAKI)

名古屋市立大学・医学(系)研究科(研究院)・助教

研究者番号：50608693

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,300,000円

研究成果の概要(和文)：細胞周期をリアルタイムで観察できる蛍光蛋白" Fucci " を導入したヒト骨肉腫細胞株143Bにin vitroでシスプラチン・ドキソルビシンを作用させリアルタイムイメージングを行った。その結果、細胞周期による抗がん剤の感受性の違い、抗がん剤の種類によるアポトーシスの起こり方の違いや細胞周期停止の様子を明らかにできた。

研究成果の概要(英文)：we utilized the fluorescence ubiquitination-based cell cycle indicator (FUCCI) imaging system to investigate the correlation between cell-cycle behavior and apoptosis after treatment of osteosarcoma cells with chemotherapeutic drugs. Osteosarcoma cell line 143B expressing FUCCI were treated with doxorubicin or cisplatin, and we revealed that apoptosis behavior, cell cycle arrest, and chemotherapy sensitivity depending on cell cycle differs in each chemotherapy drugs.

研究分野：骨軟部腫瘍

キーワード：細胞周期 イメージング 骨肉腫 化学療法 紫外線

### 1. 研究開始当初の背景

骨肉腫をはじめとする骨軟部肉腫の治療成績は、化学療法の導入によって手術単独群と比べて飛躍的に向上した。しかし一部の症例では化学療法に抵抗性を示し、一旦転移をきたすと予後は極めて不良である。更なる治療成績・予後の改善のためには、転移のメカニズムを明らかにすることや薬剤耐性といった問題点を克服する必要がある。

がん細胞を可視化して生体内で観察することで悪性腫瘍の転移の過程や薬剤耐性の機序を明らかにしようと、これまで我々は米国カリフォルニア大学サンディエゴ校外科学教室およびアンチキャンサー社との共同実験で、がん細胞の生体内イメージングを世界でも先駆的に行ってきた。緑色蛍光蛋白 (GFP) や赤色蛍光蛋白 (RFP) で標識した癌細胞をマウスに血管内注入あるいは移植することにより、原発巣から癌細胞が離脱し、脈管内を流れ、転移巣を形成するまでの一連の現象を明瞭に可視化し、また多様な蛍光タンパクを用いることで *in vivo* で成育するがん細胞と宿主細胞を細胞レベルで識別することを可能にした。また、これまで非常に困難であるといわれてきた肺でのイメージングにも取り組み、生きたままで且つ繰り返し肺を観察できるマウスモデルを確立し、肺転移形成の過程を蛍光蛋白発現がん細胞を用いて観察することに成功した。

近年、他の癌腫においては様々な新規抗癌剤や分子標的治療薬が開発されているものの、骨軟部肉腫の領域においては新たな治療薬の開発は遅れているのが現状である。新規治療薬の登場が見込めない状況下で治療成績を向上させるためには、既存の治療薬を投与方法の工夫や効果を増強させる他の薬剤との併用で効率良く使用していく必要がある。骨肉腫に対する治療の第一選択薬は、20~30年前からシスプラチンとアドリアマイシンの組み合わせであるが、これらの薬剤の作用や薬剤耐性は細胞周期と密接な関係がある事が知られている。すなわち、シスプラチン・アドリアマイシンと細胞周期との関連を深く明らかにしていくことは、これらの薬剤の有効な投与方法や薬剤耐性克服につながるといえる。また肺転移に関しても G0/G1 期の細胞との深い関連が報告されているが、その詳細は不明な点が多い。

Fucci (Fluorescent Ubiquitination-based Cell Cycle Indicator) は蛍光プローブの一種で、G1 期に増加する "Cdt1" と、S/G2/M 期に増加する "Geminin" というタンパクにそれぞれ赤色と緑色を発する蛍光タンパク質を結合させている。Fucci を導入すれば、活動休止中の G0/G1 期の細胞は赤色に、そのほかのフェーズにある細胞は緑色になるので、細胞周期をリアルタイムで観察することができる。我々はすでに肉腫細胞株に Fucci を導入することに成功し、細胞株を樹立している。

### 2. 研究の目的

本研究の目的は、これまでに我々が確立した蛍光蛋白を用いたがん細胞の動態観察モデルと Fucci 導入肉腫細胞を組み合わせることで、肉腫の転移や薬剤耐性などと細胞周期との関連を明らかにすることである。

具体的には、まずシスプラチンおよびアドリアマイシンの骨肉腫に対する、最も効果的な投与方法を検討する。アドリアマイシンは G1 期に対して抵抗性を持ち、シスプラチンは用量依存性に細胞周期を G2 期で停止させる (G2 arrest) ことが知られている。すなわち、シスプラチンで G2 arrest を起こさせた後にアドリアマイシンを投与することで、これらの抗癌剤の相乗効果が生まれるはずである。実際に投与からどの程度の時間で G2 arrest が起こるかをリアルタイムに観察し、効果的な投与のタイミングを *in vitro* および *in vivo* 両方の実験から模索していく。

また申請者らは骨軟部腫瘍の治療で、化学療法にカフェインを併用することで良好な成績を得ている。DNA に障害を受けた腫瘍細胞は細胞周期を延長し DNA の修復を図るが、カフェインはその細胞周期の延長を阻害することにより DNA に障害を受けた細胞のアポトーシスを誘導するといわれている。しかし、そのメカニズムには不明な点が多く、これを Fucci 導入肉腫細胞を用いて証明する。

またこれまで我々は抗がん剤だけでなく紫外線のガン治療への応用を探索してきた。最終的には腫瘍切除後の再発予防のため、手術野の minimum residual cancer (MRC) を治療するための modality として UV を応用できればと考えている。そこで UV 照射によるがん細胞の細胞周期やアポトーシスに与える影響についても Fucci 導入骨肉腫細胞を用いて調べることにした。

### 3. 研究の方法

#### (1) 平成 25 年度

Fucci を導入したヒト骨肉腫細胞株 143B に、まず 1mM, 2mM, 5mM のシスプラチンを継続的に作用させ、蛍光顕微鏡のタイムラプス機能を用いて経時的に観察した。

またシスプラチン 2mM の濃度で、作用時間を少なくし 6 時間のみ作用させた。

またカフェインによる抗癌剤増強作用を細胞周期の観点から解析した。2mM のシスプラチンを 6 時間作用させた後に培養液を交換してカフェインを添加した。

#### (2) 平成 26 年度

平成 25 年度に行った *in vitro* でのシスプラチンを用いた実験と同様の実験を、薬剤を変更してドキシソルピシンを用いて行った。Fucci を導入したヒト骨肉腫細胞株 143B にドキシソルピシンを 5 $\mu$ M で 3 時間作用させ、その後に蛍光顕微鏡で 72 時間のタイムラプス撮影を行った。

#### (3) 平成 27 年度

Fucci を導入した骨肉腫細胞に UVB を照射し

て、細胞周期をリアルタイムイメージングし、UVB が骨肉腫細胞の細胞周期やアポトーシスに与える影響について観察を行った。方法としては Fucci 導入 143B 骨肉腫細胞に in vitro で UVB を照射し、30 分毎に 72 時間の連続観察を行った。

#### 4. 研究成果

##### (1) 平成 25 年度

5mM では数時間後にはすべての細胞が緑色 (S-G2 期) となって細胞周期が停止し (G2 arrest)、その後は赤色 (G1 期) へ移行すること無く apoptosis を生じながらすべての細胞が死滅した。2mM では G2 arrest を起こすまで時間が長く、18 時間程度でほとんどの細胞が G2 arrest を生じ、約 40 時間を過ぎてから apoptosis を生じ始めたが、最終的には 72 時間後には大多数の細胞が apoptosis に陥った。1mM では G2 arrest を生じるものの、その後細胞周期が再び回転し始め、増殖を再開する細胞も散見されるようになった。

2mM - 6 時間での作用では 18 時間程度で一旦ほとんどの細胞が S-G2 期に移行するが、24 時間後には G1 期に移行する細胞が散見されるようになり、そこからゆっくりと G1 期に移行する細胞の数が増えて、その後は通常の細胞増殖スピードに戻っていった。

カフェインを添加することで G1 期への移行までの時間が早まり、最終的には多数の細胞が細胞周期に関係なく apoptosis に陥っていった。これはカフェイン無しでは見られなかった変化であり、シスプラチンで DNA 損傷を受けた骨肉腫細胞が DNA 損傷を修復させる前にカフェインによって強制的に細胞周期を回されるために細胞死に陥るという我々の仮説に一致した結果であった。

##### (2) 平成 26 年度

ドキソルビシンを作用させて 24 時間以内に G2 arrest が生じ、その後一部の細胞のみが G2 arrest を離脱し mitosis の後にアポトーシスに陥った。またごく一部の細胞は mitosis を起こすことなく G1 期へ移行し、通常の細胞周期へと戻った。mitosis はドキソルビシンを作用させた細胞の生存率と有意に相関しており、また同様にドキソルビシンを作用させた際の mitosis から G1 期への移行も細胞の生存率と有意な相関を認めた。ドキソルビシンを作用させた時点の細胞周期と細胞の生存率には有意な相関はなかった。

ドキソルビシンに反応させる前の細胞は約 60% が赤色 (G1/G0 phase) で約 40% が緑色 (S/G2/M phase) であったが、ドキソルビシンに作用させることでほとんどの細胞が S/G2/M phase で細胞周期を停止させた。ドキソルビシンでは mitosis の後にすぐアポトーシスが起ったが、これは昨年度に行ったシスプラチンの反応とは少し異なり、シスプラチンでは mitosis が起こりきる前にアポトーシスが生じた。

##### (3) 平成 27 年度

UVB 照射はほとんどの腫瘍細胞で S/G2/M 期の細胞周期停止をもたらすことが分かった。一部の細胞だけが S/G2/M 期での停止を逃れ mitosis に移行し、その結果 DNA 修復を行わずに apoptosis に陥った。また G0/G1 期の細胞は S/G2/M 期の細胞に比べて UVB に対する耐性を示すことを証明した。

最終的には in vivo での骨肉腫に対するシスプラチン・ドキソルビシンの併用治療について抗がん剤の投与時間・投与量などを変更したりしてより効果的な投与方法を模索するつもりであったが、in vivo の研究を行うまでに至らず、今後は in vitro での実験結果を参考に in vivo の実験へと進めていく予定である。

#### 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 3 件)

Cell-cycle fate-monitoring distinguishes individual chemosensitive and chemoresistant cancer cells in drug-treated heterogeneous populations demonstrated by real-time **FUCCI** imaging.

Miwa S, Yano S, Kimura H, Yamamoto M, Toneri M, Matsumoto Y, Uehara F, Hiroshima Y, Murakami T, Hayashi K, Yamamoto N, Bouvet M, Fujiwara T, Tsuchiya H, Hoffman RM. *Cell Cycle*. 2015;14(4):621-9. doi: 10.4161/15384101.2014.991604. (査読有)

Heterogeneous cell-cycle behavior in response to UVB irradiation by a population of single cancer cells visualized by time-lapse **FUCCI** imaging.

Miwa S, Yano S, Kimura H, Yamamoto M, Toneri M, Murakami T, Hayashi K, Yamamoto N, Fujiwara T, Tsuchiya H, Hoffman RM. *Cell Cycle*. 2015;14(12):1932-7. doi: 10.1080/15384101.2015.1033598. (査読有)

Dynamic color-coded fluorescence imaging of the cell-cycle phase, mitosis, and apoptosis demonstrates how caffeine modulates cisplatin efficacy.

Miwa S, Yano S, Tome Y, Sugimoto N, Hiroshima Y, Uehara F, Mii S, Kimura H, Hayashi K, Efimova EV, Fujiwara T, Tsuchiya H, Hoffman RM. *J Cell Biochem*. 2013 Nov;114(11):2454-60. doi: 10.1002/jcb.24593. (査読有)

[学会発表](計 0 件)

[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

木村 浩明 (KIMURA HIROAKI)  
名古屋市立大学・大学院医学系研究科・助  
教  
研究者番号：50608693

##### (2) 研究分担者

なし

##### (3) 連携研究者

なし