

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 5 月 18 日現在

機関番号：11301

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2014～2016

課題番号：26860974

研究課題名(和文) 低酸素/低栄養状態におけるmTOR活性に着目した癌幹細胞の放射線抵抗性の解明

研究課題名(英文) Elucidation of radioresistance mechanisms in cancer stem cells focusing on mTOR activation under hypoxic/nutrient starvation conditions

研究代表者

村田 泰彦 (Murata, Yasuhiko)

東北大学・医学系研究科・助教

研究者番号：40716172

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,600,000円

研究成果の概要(和文)：癌の放射線治療において放射線抵抗性細胞の存在は重要である。低酸素細胞は必ず低栄養状態にあることから低栄養状態も放射線抵抗性に関与していると考えられる。低酸素/低栄養状態での放射線抵抗性を選択的に解除する分子標的として細胞内栄養センサーmTORに着目した。通常、低栄養状態の細胞においてmTOR活性は抑制され放射線抵抗性を示すが、肝癌細胞においてmTORは活性化され放射線高感受性を示した。肝癌細胞のmTORの発現抑制によって放射線高感受性が抑制されmTORの放射線抵抗性への関与が示唆された。肝癌細胞においてmTORは低栄養状態での放射線抵抗性の選択的解除に関与する可能性が本研究によって示唆された。

研究成果の概要(英文)：The presence of radiation resistant cells in solid human tumors is one of the most important factors for radiotherapy. In solid human tumors, it is well known that hypoxia causes cellular radioresistance and that tumor hypoxia is consistently associated with nutrient starvation conditions. To identify molecular targets for selective regulation of radioresistance under hypoxic/nutrient starvation conditions, mTOR, known as nutrient sensor, was focused. Under nutrient starvation conditions, mTOR activity is thought to be inhibited and cells show radioresistance. Liver cancer cell lines, however, showed that mTOR activation and increased radiosensitivity under nutrient starvation conditions. Inhibition of mTOR expression by siRNA suppresses the increased radiosensitivity under nutrient starvation conditions. This study demonstrates for the first time that nutrient starvation conditions activate mTOR and increase radiosensitivity through mTOR activation in liver cancer cell lines.

研究分野：放射線生物学

キーワード：mTOR 低酸素状態 低栄養状態 放射線抵抗性 癌幹細胞 PLDR

1. 研究開始当初の背景

(1) 癌の放射線治療において放射線抵抗性細胞の存在は重要であり、近年では癌幹細胞の放射線抵抗性が話題となっている。一般に癌幹細胞は血流から遠い位置にあるため低酸素状態にあり、低栄養状態でもあることが知られている。低酸素状態が細胞の放射線抵抗性に関与することはよく知られているが、低栄養状態と細胞の放射線感受性との関係は不明な点が多い。(2) 古典的な放射線生物学では、培養細胞において培地を生理食塩水に置き換えるなど過酷な条件に細胞を置くと放射線抵抗性となることが知られており“潜在的致死損傷からの回復”(Potential Lethal Death Repair: PLDR)と呼ばれているが、その分子機構は明らかでない。(3) 癌幹細胞と PLDR という 2 つの放射線抵抗性の原因として、低酸素/低栄養状態が共に重要な要素と考えられる。

2. 研究の目的

免疫抑制剤/抗癌剤ラパマイシンの酵母における標的たんぱく質 TOR(target of rapamycin) の哺乳類のホモログである mTOR は複合体 1(mTORC1) および 2(mTORC2) を形成する。ラパマイシンは mTORC1 を特異的に抑制することが知られており、mTORC1 は低酸素・低栄養などのストレス状態において、細胞増殖を停止させ、オートファジーの活性化において中心的な役割を果たすことが報告されている。また、ラパマイシンによる放射線増感効果や上流に位置する AMPK の低栄養状態における放射線抵抗性の選択性も報告されており、mTOR の系の阻害によって放射線抵抗性の癌細胞を選択的に増感できる可能性が考えられる。しかし、低栄養状態が mTOR の活性および放射線感受性に与える影響に関して不明な点が多い。癌幹細胞や PLD/PLDR での放射線抵抗性に関与している可能性も考えられる。本研究の目的は、低栄養状態での放射線抵抗性に対する mTOR の関与を明らかにし、癌幹細胞等の低栄養状態での放射線抵抗性を選択的に解除する分子標的を探索することである。

3. 研究の方法

SV40 でトランスフォームしたヒト繊維芽細胞 LM217、ヒト肝癌細胞 HepG2 および HuH6 を用いた。各細胞株を通常培地および低栄養培地(グルコースおよび血清なし)でそれぞれ一定時間培養し、immunoblot によるタンパク質のリン酸化解析およびコロニーフォーメーションアッセイによる放射線感受性解析を行った。mTOR 活性化の抑制には rapamycin および mTOR siRNA を用いた。FACS 解析を行い、低栄養状態による細胞周期への影響を解析した。

4. 研究成果

ヒト肝癌細胞株 HepG2 および HuH6 を低栄養処理したところ、低栄養状態にもかかわらず mTOR の活性化が認められ、コントロールのヒト繊維芽細胞株 LM217 においては活性化が抑制されていた。また、mTORC1 によって活性化される p70S6K も HepG2 および HuH6 細胞においては活性化され、LM217 細胞においては抑制されていた。低栄養状態の HepG2 および HuH6 細胞において mTORC1 が活性化されることが示唆された。

低栄養状態の放射線感受性への影響について各細胞株の生存率を解析したところ、LM217 は通常培養時に比べ放射線抵抗性を示したが、HepG2 および HuH6 細胞は放射線高感受性を示した。mTORC1 の活性化の変化と放射線感受性の間に相関がある可能性が示唆された。

次に mTOR の活性化に関連する上流の作用因子として mTOR 活性を抑制する AMPK および mTOR 活性を亢進する Akt の活性化を解析したところ、どちらもコントロール細胞を含む全ての細胞株において活性化されていた。また、mTOR 活性化に関連する別の作用因子として報告のある ATM および HIF1 の活性化も解析したが、mTOR 活性化との関係は認められなかった。低栄養状態における mTOR の活性化には Akt の活性化が関与しており、細胞によって異なる作用をしている可能性が考えられる。

mTORC1 の放射線感受性への関与を明らかにするため、HepG2 細胞に対して低栄養状態

におけるラパマイシンまたは mTOR siRNA による mTOR 特異的な抑制を行い、放射線感受性解析を行った。結果、ラパマイシンおよび mTOR siRNA の両方で低栄養状態における HepG2 細胞の放射線感受性の低下が認められた。mTORC1 が HepG2 細胞の低栄養状態における放射線高感受性に関与する可能性が示唆された。

細胞周期解析も行ったところ、LM217 細胞において低栄養状態において放射線抵抗性に関わる S 期の細胞の割合は減少していたが、HepG2 および HuH6 細胞においては低栄養状態において S 期の細胞の割合は増加していた。低栄養状態による細胞周期への影響が各細胞株の示した放射線感受性の変化に関与している可能性は考えにくい。以上の結果より、低栄養状態の肝癌細胞において mTORC1 は活性化され、放射線高感受性の誘導に関与する可能性が示唆された。

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5件)

Uehara Y, Murata Y, Hosoi Y: NSAIDs diclofenac, indomethacin, and meloxicam highly upregulate expression of ICAM-1 and COX-2 induced by X-irradiation in human endothelial cells. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 479: 847-852, 2016. (査読有)
<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0006291X1631587X>

Murata Y, Uehara Y, Hosoi Y: Activation of mTORC1 under nutrient starvation conditions increases cellular radiosensitivity in human liver cancer cell lines, HepG2 and HuH6. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 468: 684-690, 2015. (査読有)
<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0006291X1530886X>

Murata Y, Yasuda T, Watanabe-Asaka T, Oda S, Mantoku A, Takeyama K, Chatani M, Kudo A, Uchida S, Suzuki H, Tanigaki F, Shirakawa M, Fujisawa K, Hamamoto Y,

Terai S, Mitani H: Histological and Transcriptomic Analysis of Adult Japanese Medaka Sampled Onboard the International Space Station. *PLoS One* 10(10): e0138799, 2015. (査読有)
<http://journals.plos.org/plosone/article?id=10.1371/journal.pone.0138799>

Shiratsuki S, Terai S, Murata Y, Takami T, Yamamoto N, Fujisawa K, Burganova G, Quintanilha LF, Sakaida I: Enhanced survival of mice infused with bone marrow-derived as compared with adipose-derived mesenchymal stem cells. *Hepatology Research* 45(13): 1353-1359, 2015. (査読有)
<http://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1111/hepr.12507/abstract;jsessionid=31136770419C43AADEB12E4A052F546.f04t03>

Quintanilha LF, Takami T, Hirose Y, Fujisawa K, Murata Y, Yamamoto N, Goldenberg RC, Terai S, Sakaida I: Canine mesenchymal stem cells show antioxidant properties against thioacetamide-induced liver injury in vitro and in vivo. *Hepatology Research* 44(10): 206-217, 2014. (査読有)
<http://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1111/hepr.12204/full>

[学会発表](計8件)

村田 泰彦、上原 芳彦、志賀 壮一郎、細井 義夫. ヒト肝癌細胞における低栄養状態による mTORC1 の活性化は放射線感受性を増加させる. 日本放射線影響学会第 59 回大会、広島、2016 年 10 月 26-28 日、広島 (JMS アステールプラザ).
村田 泰彦、上原 芳彦、細井 義夫. 低栄養状態のヒト肝癌細胞における mTORC1 の活性化による放射線感受性の増加. 第 45 回制癌シンポジウム第 54 回生物部会学術大会、2016 年 7 月 15-16 日、大阪 (I-site なんば).

Yasuhiko Murata, Yoshihiko Uehara, Yoshio Hosoi. Effects of nutrient starvation condition on radiosensitivity of cultured cells. 15th International Congress of Radiation Research, May 25-29th 2015,

Kyoto (Kyoto International Conference Center).

Yoshihiko Uehara, Yasuhiko Murata, Yoshio Hosoi: Synergistic effects of nonsteroidal anti-inflammatory drugs (NSAIDs) and ionizing radiation on ICMA-1 expression in HUVECs. 15th International Congress of Radiation Research, May 25-29th 2015, Kyoto (Kyoto International Conference Center).

村田 泰彦、上原 芳彦、細井 義夫. 低栄養状態が培養細胞の放射線感受性に及ぼす影響. 第 17 回癌治療増感研究シンポジウム. 2015 年 2 月 6-7 日、奈良 (奈良県文化会館).

村田 泰彦、上原 芳彦、細井 義夫. 低栄養状態が培養細胞の放射線感受性に及ぼす影響. 日本放射線影響学会第 57 回大会. 2014 年 10 月 1-3 日、鹿児島 (かごしま県民交流センター).

上原 芳彦、村田 泰彦、細井 義夫. 非ステロイド抗炎症性薬は放射線と相乗的に作用してヒト血管内皮細胞における ICAM-1 の発現を亢進させる. 日本放射線影響学会第 57 回大会. 2014 年 10 月 1-3 日、鹿児島 (かごしま県民交流センター).

村田 泰彦、上原 芳彦、細井 義夫. 低栄養が放射線感受性に及ぼす影響. 第 43 回制癌シンポジウム第 52 回生物部会学術大会. 2014 年 7 月 11-12 日、京都 (メルパルク京都).

〔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

<http://www.radbio.med.tohoku.ac.jp/index.html/>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

村田 泰彦 (MURATA YASUHIKO)
東北大学・医学系研究科・助教
研究者番号：40716172

(2) 研究分担者

()

研究者番号：

(3) 連携研究者

()

研究者番号：

(4) 研究協力者

()