

**科学研究費助成事業 研究成果報告書**

平成 28 年 5 月 30 日現在

機関番号：12602

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2014～2015

課題番号：26861569

研究課題名(和文)細胞周期イメージングから紐解く放射線治療における腫瘍内微小環境の役割

研究課題名(英文) Roles of tumor microenvironments in radiotherapy for solid tumors on the basis of cell cycle imaging

研究代表者

戒田 篤志 (KAIDA, Atsushi)

東京医科歯科大学・医歯(薬)学総合研究科・助教

研究者番号：40632097

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,900,000円

研究成果の概要(和文)：リアルタイム細胞周期動態イメージングを可能とするFluorescent ubiquitination-based cell cycle indicator (Fucci)を導入した腫瘍細胞を応用することにより、放射線照射後の固形腫瘍においてはG2アレストが顕著に生じ、更には単層培養系と比較して有意に長期間持続することが明らかにされた。コロニー形成法の結果から、G2アレストの持続時間に応じて細胞生存率が有意な上昇を示すことから、本研究課題では腫瘍内微小環境が放射線照射後の細胞周期動態を修飾することにより、治療抵抗性に寄与している可能性が示唆された。

研究成果の概要(英文)：In this study, we analyzed intratumoral cell cycle kinetics after X-irradiation of tumor xenografts expressing the fluorescent ubiquitination-based cell cycle indicator (Fucci), a novel system to visualize cell cycle kinetics in vivo. Cell cycle kinetics after X-irradiation was examined by using tumor sections and in vivo real-time imaging system in tumor xenografts. We found that G2 arrest was remarkably prolonged, up to 5 days after 10-Gy irradiation, in contrast to monolayer cultures where G2 arrest returned within 24 h. Cells isolated from tumors 5 days after irradiation exhibited a higher surviving fraction than those isolated immediately or one day after irradiation. In this study, we clearly demonstrated unusual post-irradiation cell cycle kinetics in tumor xenografts. Our findings imply that prolonged G2 arrest occurring in tumor microenvironments following irradiation may function as a radioresistance mechanism.

研究分野：放射線生物学

キーワード：放射線治療 固形腫瘍 細胞動態 Fucci 腫瘍内微小環境 G2アレスト

### 1. 研究開始当初の背景

以前より放射線治療を生物学的側面から考慮する上では、4つの”R“(修復: Repair, 再分布: Reassortment, 再酸素化: Reoxygenation, 再増殖: Repopulation)という概念が提唱されている。この概念のほとんどは、コロニー形成法に基づいた生存曲線により求められたにも関わらず、実際に放射線照射された固形腫瘍内で生じる現象を評している点は過去の大きな功績であった。しかしながら、過去に提唱されたこの概念は、あくまでも固形腫瘍を切除・細胞を単離し、培養皿上でコロニーを形成させるというような最終的には *in vitro* における手法から明らかにされたものであり、固形腫瘍内の環境が最終評価点までの一部始終にわたって腫瘍細胞に影響していたわけではない。すなわち、もし固形腫瘍内の環境、いわゆる腫瘍内微小環境を構造的に破壊せずに放射線照射後の腫瘍細胞への影響を追跡していった場合、これまでとは全く異なる知見が得られる可能性がある。そこで我々は、2008年に報告されたりアルタイム細胞周期イメージングシステムである Fluorescent Ubiquitination-based Cell Cycle Indicator (Fucci: 図1) に着目した。Fucci を細胞に導入すると、G1期には赤色蛍光、S/G2/M期には緑色蛍光を示し、またG1/S移行期では、赤色および緑色蛍光のいずれもが発現する橙色を呈す。すなわち、Fucci を細胞に導入することにより、細胞周期動態をリアルタイムに観察することが可能となる。

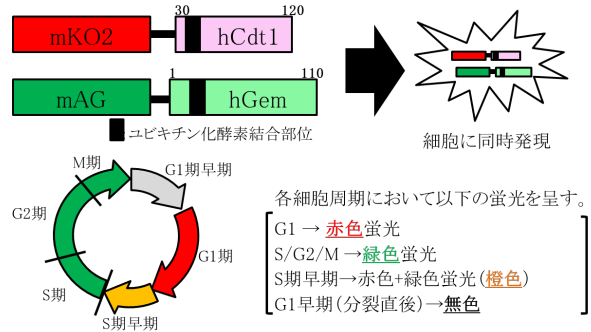
我々は、すでに Fucci を導入した腫瘍細胞よりマウス皮下移植腫瘍モデルを作成し、腫瘍に対して放射線照射を行い、照射後の蛍光動態を生体 *in vivo* イメージングまたは切片から追跡してきた。その結果、放射線照射後の固形腫瘍においては緑色蛍光優位な状態が長期にわたって持続することが判明し、その現象が放射線照射後の G2 アレスト遷延であることを見出した。すでに単層培養系および腫瘍疑似 3D モデルであるスフェロイドにおける放射線照射後の細胞周期動態は明らかにされており、各モデルにおける放射線照射後の G2 アレスト持続時間を比較すると、単層培養系 < スフェロイド 固形腫瘍の順で遷延することが分かっている。以上の結果より、腫瘍内微小環境が放射線照射後の G2 アレスト動態に影響を及ぼしている可能性が大いに考えられる。

### 2. 研究の目的

本研究では、細胞周期リアルタイムイメージング技術である Fluorescent Ubiquitination-based Cell Cycle Indicator (Fucci) を導入した腫瘍細胞を応用することで、*in vivo* イメージング技術を駆使して放射線照射後の細胞動態における腫瘍内微小環境の役割を明確にすることを目的としている。

### 3. 研究の方法

図1 Fucci の構成要素と細胞周期特異的な蛍光動態



本研究では、Fucci 導入腫瘍細胞よりマウス皮下移植腫瘍モデル、スフェロイド、単層培養系の3種類のモデルを使用した。

単層培養系およびスフェロイドにおける放射線照射後の蛍光動態または細胞周期動態解析にはタイムラプスイメージング、フローサイトメトリー解析を行った。マウス皮下移植腫瘍モデルにおける蛍光および細胞周期動態解析は、薄切片の作成、または生体イメージング機器を用いた蛍光検出により行った。腫瘍切片において G2 期の指標として Cyclin B1 の発現を免疫染色により検出した。放射線照射後の細胞周期動態と密接に関連した DNA 二重鎖切断(DSB)修復動態については、53BP1 を指標として免疫染色を行い、核内 foci 数をカウントすることによって定量的に解析した。細胞生存率の算出には、コロニー形成法を用いた。

### 4. 研究成果

(1)放射線照射後の固形腫瘍における G2 アレスト遷延現象の再現性確認。

各モデルにおいて放射線照射後の細胞周期動態について解析したところ、マウス皮下移植腫瘍モデルが、他のモデルに比較して著明に G2 アレストが長期持続していることが、生体イメージングおよび切片から確認された(図2、3)。

図2 単層培養系におけるX線10Gy照射後の蛍光動態および細胞周期動態

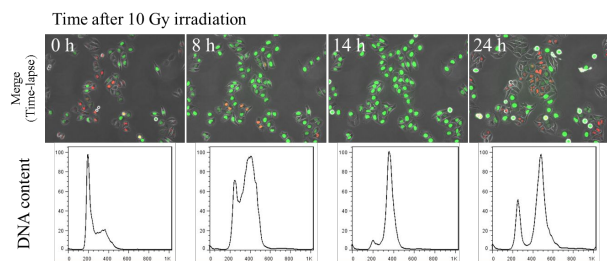
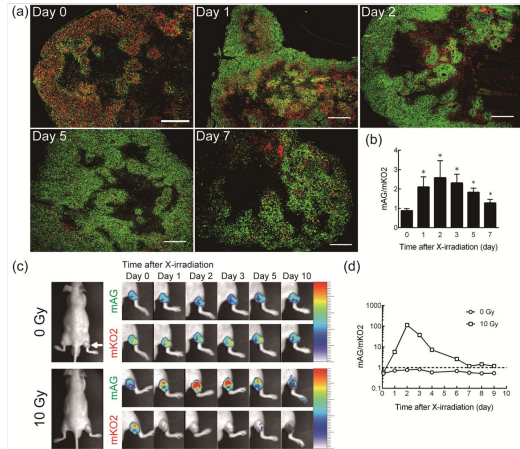


図3 マウス皮下移植腫瘍におけるX線10Gy照射後の蛍光分布



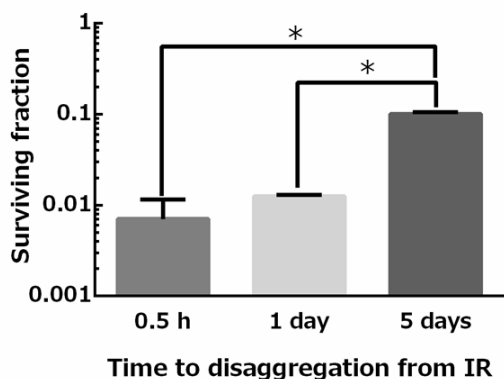
(2)放射線照射後のDSB修復動態

DSB修復動態については、53BP1 fociをカウントすることにより定量的に解析した。その結果、単層培養系においては、照射後24時間もすると照射前のfoci数まで回復していたが、スフェロイドまたはマウス皮下移植腫瘍モデルにおいてはDSB修復動態が遅延していることが示された。

(3)放射線照射後のG2アレスト動態が細胞生存に与える影響解析

我々は、以前にスフェロイドを培養皿に接着させると、放射線照射後に生じるG2アレストが単層培養系同様に早期に解除されることを見出している。この方法をマウス皮下移植腫瘍モデルに応用し、照射各時間後に単離された腫瘍細胞を用い、コロニー形成法を行った。その結果、照射後腫瘍の状態である時間が長いほど、細胞生存率が有意に高い傾向が見出された(図4)。

図4 放射線照射後におけるG2アレスト遷延が細胞生存に及ぼす影響



以上 ~ の結果より、固形腫瘍においては放射線照射後のG2アレストが遷延することが見出され、さらにその一因としてDSB修復動態が遅延していることが関与してい

る可能性が示された。また、放射線照射後のG2アレスト遷延現象が細胞生存に対してどのような意義を持つかに関しては、少なくとも本研究においては細胞生存を促す方向に寄与している可能性が示唆された。この結果は、腫瘍内微小環境が治療抵抗性に寄与している数多くの報告とも一致しており、本研究結果からは腫瘍内微小環境が細胞周期動態に影響することにより再増殖するタイミングを図ることで抵抗性メカニズムを担っていることが考えられる。本研究期間中では、このようなG2アレスト動態を直接的に規定している環境因子について特定することはできなかったが、今後そうした規定因子を解明することにより新たな放射線増感戦略を構築することが可能になるかもしれない。

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)

1. Goto T, Kaida A, Miura M: Visualizing cell-cycle kinetics after hypoxia/reoxygenation in HeLa cells expressing fluorescent ubiquitination-based cell cycle indicator (Fucci). *Exp Cell Res*, 339:389-96, 2015, 査読有  
doi: 10.1016/j.yexcr.2015.10.019

2. Kaida A, Miura M: Unusual prolongation of radiation-induced G2 arrest in tumor xenografts derived from HeLa cells. *Cancer Sci*, 106:1370-6, 2015, 査読有  
doi: 10.1111/cas

3. Tsuchida E, Kaida A, Pratama E, Ikeda MA, 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*, 10: e0128090, 2015, 査読有  
doi: 10.1371/journal.pone.0128090

[学会発表](計 4 件)

1. 戒田篤志, 三浦雅彦. 放射線照射後の細胞周期動態における細胞接着環境の影響. 日本放射線影響学会 第1回放射線ワークショップ 2015.10.16 富山大学黒田講堂(富山県富山市)

2. Atsushi Kaida, Masahiko Miura. Visualizing the effects of tumor microenvironments on cell cycle kinetics in HeLa cells following X-irradiation. 15th International Congress of Radiation Research 2015.05.28 Kyoto International Conference Center (Kyoto)

3. 戒田篤志, 三浦雅彦. 放射線照射後の G2 アレスト遷延現象に起因する新たな放射線抵抗性メカニズムの検討. 第 17 回癌治療増感シンポジウム 2015.02.07 奈良県文化会館 (奈良県奈良市)

4. 戒田篤志, 土田絵梨, 小湊広美, 三浦雅彦. 異なる細胞周期相で照射された細胞の G2 アレスト動態とその放射線感受性への影響. 日本放射線影響学会 第 57 回大会 2014.10.01 かごしま県民交流センター (鹿児島県鹿児島市)

〔その他〕

ホームページ等

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

6 . 研究組織

(1)研究代表者

戒田 篤志 (KAIDA, Atsushi)

東京医科歯科大学、医歯学総合研究科、助教  
研究者番号：40632097

(2)連携研究者

三浦 雅彦 (MIURA, Masahiko)

東京医科歯科大学、医歯学総合研究科、教授  
研究者番号：10272600