

微小環境下の放射線耐性細胞の幹細胞様転換メカニズムの解析

[1] 組織

代表者：濱 進 (京都薬科大学)
対応者：福本 学 (東北大学加齢医学研究所)
分担者：小暮 健太郎 (京都薬科大学)
板倉 祥子 (京都薬科大学)
中村 伊吹 (京都薬科大学)
福本 学 (東北大学加齢医学研究所)
桑原 義和 (東北大学加齢医学研究所)

研究費：物件費 9 万 8 千円，旅費 10 万 2 千円

[2] 研究経過 (以下 10.5 ポイント)

(2-1) 本研究の目的

放射線治療は癌の三大療法の一つであるが、放射線耐性癌細胞の出現はその治療効果を大きく減弱させる。この耐性癌細胞の増殖により形成される腫瘍は、非耐性細胞と同様に、腫瘍内の微小環境 (低酸素、低栄養、低 pH) 変化に対応した細胞特性を獲得するため、その特性解析情報をベースとした放射線耐性癌細胞の治療法を開発することが重要である。特に、腫瘍の成長に伴い形成される低酸素環境下の癌細胞は腫瘍成長および転移の支配要因となり得るだけでなく、多剤排出トランスポーターの発現増大を介した化学療法抵抗性および酸素効果の低下を介した放射線耐性を獲得することが知られていることから、予後不良の原因であると考えられている。そこで、本共同研究では、低酸素下の耐性癌細胞における癌幹細胞様転換に着目し、放射線耐性腫瘍の耐性機構を明らかにすることを目的とした。

(2-2) 本研究の概要

東北大学の福本先生らが作製した臨床的放射線耐性肝癌細胞 HepG2-8960-R および親株細胞 HepG2 を低酸素下で培養し、細胞周期および薬物排出能について検討した。その結果、HepG2-8960-R では、HepG2 に比べて、低酸素培養によって、癌幹細胞の特徴である G₀/G₁ 期の増大が認められた。さらに、HepG2-8960-R では、低酸素培養により、薬物排出能の高い細胞 (side population 細胞; SP 細胞) が増大した。この SP 細胞をヌードマウスへ皮下移植した結果、高い腫瘍形成が認められた。これらの結果より、HepG2-8960-R は低酸素培養によ

り、癌幹細胞様の特性を獲得しやすいことが示唆された。

(2-3) 研究活動状況の概要

H25 年 10 月 22 日-31 日：東北大学加齢医学研究所の福本研究室にて、分担者の中村伊吹が研究進捗状況の報告を行うとともに、桑原助教より、high-density survival assay の手法を御教授頂いた。さらに、東北大学医学部において電子顕微鏡観察を行った。

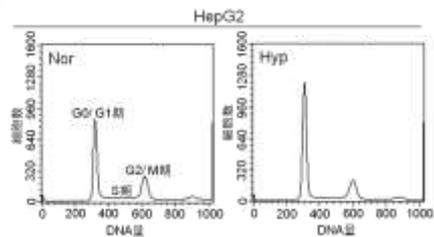
[3] 成果

(3-1) 研究成果

本年度は、以下に示す研究成果を得た。

まず第 1 に、HepG2-8960-R 細胞が低酸素培養により、癌幹細胞様の特性を獲得するののかについて検討するために、細胞周期変化 (G₀/G₁ 期の増大) を調べた。

(A)



(B)

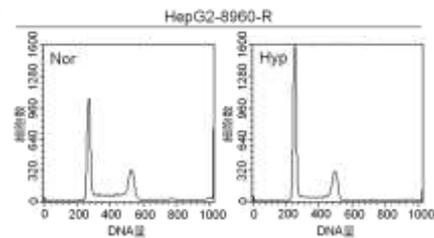


図 1. 低酸素下における細胞周期解析

HepG2 細胞(A)および HepG2-8960-R 細胞(B)を正常酸素下 (Nor)、低酸素下 (Hyp) で 24 時間培養し、PI 染色後にフローサイトメーターで解析した。

その結果、HepG2 細胞および HepG2-8960-R 細胞の両細胞において、低酸素培養により、G₀/G₁ 期の増大が観察されたが、この G₀/G₁ 期の増大は、HepG2 細胞に比べて、HepG2-8960-R 細胞の方が、 $4.4 \pm 2.4\%$ 高かった (図 1)。この結果より、HepG2-8960-R 細胞は低酸素環境下において癌幹

細胞様の細胞へ転換されやすい可能性が示唆された。次に、癌幹細胞の特徴の1つであるP糖タンパク質を介した薬物排出の促進について、モデル基質 Rhodamine123 を用いて検討した。その結果、HepG2 細胞では、培養条件の違いによる薬物排出能の差は認められなかった (図 2)。一方、HepG2-8960-R 細胞では低酸素下において蛍光強度の低い細胞集団、すなわち薬物排出能の高い SP 細胞が観察された (図 2)。この SP 細胞の出現は P 糖タンパク質阻害剤 verapamil 処理によって著しく抑制されたことから (図 2)、HepG2-8960-R 細胞は低酸素培養により、癌幹細胞の特徴の1つである P 糖タンパク質を介した高い薬物排出能を有する細胞へ転換しやすいことが示唆された。

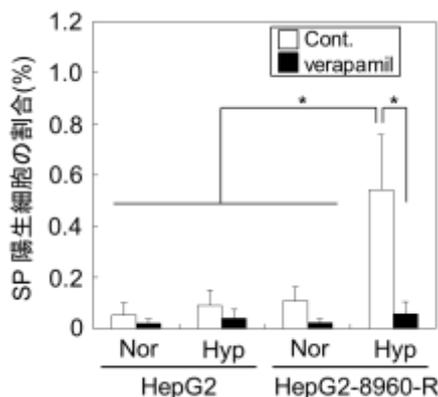


図 2. 低酸素培養による薬物排出促進
HepG2 細胞および HepG2-8960-R 細胞を正常酸素下 (Nor)、低酸素下 (Hyp) で培養し、Rhodamine123 の細胞外排出をフローサイトメーターで解析し、SP 細胞の割合 (□) および verapamil 処理時の SP 細胞の割合 (■) を示した。n=3, *p<0.05

次に、SP 細胞が癌幹細胞の特徴である高い腫瘍形成能を示すのかを検討するために、ソーティングした SP 細胞をヌードマウスへ移植し、腫瘍形成能を評価した。

移植した細胞の種類	移植した細胞数 (cells/ mouse)	腫瘍が形成されたマウス(匹)
HepG2 unsorted	1×10^7	3/4
	1×10^6	1/3
	1×10^5	0/4
HepG2-8960-R unsorted	1×10^7	4/4
	1×10^6	1/3
	1×10^5	1/4
	1×10^4	4/4
HepG2-8960-R SP +	1×10^4	1/3
	1×10^3	1/3

表 1. 腫瘍形成能の比較

その結果、ソーティングを行っていない HepG2 細胞を 1×10^5 cells/mouse で移植した場合、全く腫

瘍形成は観察されず、また同数のソーティングを行っていない HepG2-8960-R 細胞を移植した場合においても 4 匹中 1 匹しか腫瘍形成が観察されなかった。一方、低酸素下の HepG2-8960-R 細胞由来の同数の SP 細胞を移植した場合では、4 匹中全てのマウスに腫瘍形成が認められ、さらに移植細胞数を 1×10^4 cells/mouse、 1×10^3 cells/mouse に減少した場合でも 3 匹中 1 匹のマウスにおいて腫瘍形成が認められた。この結果より、低酸素環境下の HepG2-8960-R 細胞において出現する SP 細胞は高い腫瘍形成能を有することが示唆された。

以上の結果より、放射線治療に抵抗性を示す癌細胞は低酸素環境下において癌幹細胞様の特性を獲得する可能性が高いことが示唆された。

(3-2) 波及効果と発展性など

本共同研究は、学外研究者との交流が飛躍的に活性化した。また本共同研究では、低酸素下の放射線耐性細胞が癌幹細胞様の特性を獲得することを明らかにした。本成果は、放射線抵抗性を獲得した癌細胞は、微小環境変化に対して、非抵抗性細胞とは異なる応答性を示すことを示唆するものである。今後、低酸素下の放射線耐性細胞の癌幹細胞様転換メカニズムが明らかにされることで、効率的な癌治療法の開発へ繋がることが期待される。

[4] 成果資料 (以下 10.5 ポイント)

当研究成果は、現在国際誌へ投稿準備中である。