

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

令和元年5月31日現在

機関番号：12301

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2016～2018

課題番号：16K10341

研究課題名(和文) がん幹細胞を標的とした重粒子線および温熱治療の基礎的研究

研究課題名(英文) Basic study of targeting cancer stem cells by heavy-ion beams and hyperthermia

研究代表者

高橋 昭久 (Takahashi, Akihisa)

群馬大学・重粒子線医学推進機構・教授

研究者番号：60275336

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,600,000円

研究成果の概要(和文)： がんの治療効果向上には、「がん幹細胞」を制御することが重要である。本研究では従来の細胞表面マーカーを指標とするのではなく、Lin28未分化誘導経路を遺伝子操作した細胞は、がん幹細胞の殺細胞効果向上のアッセイ系として利用できることを明らかにし、重粒子線はX線と比べて、がん幹細胞を殺しやすいことを明らかにした。

また、X線治療よりも重粒子線治療や温熱治療は放射線抵抗性の低酸素細胞に対して、効率的にDSBを生成することから、有効であることを裏付けた。

研究成果の学術的意義や社会的意義

従来、「がん幹細胞」は細胞表面マーカーを指標としていたが、それらは数多く存在し、さらに、細胞表面マーカーは一過性に増減するものの、細胞集団内での陽性頻度が一定に保たれていることが報告されており、がん幹細胞化に果たす役割は不明な点が多かった。その点、我々が利用したLin28未分化誘導経路を遺伝子操作したがん細胞を用いることは、本質的な「がん幹細胞」を捉えられる点が学術的な特色があったと言えるだろう。

また、従来のX線治療で抵抗性を示した低酸素分画において、重粒子線と温熱による効率的なDNA損傷生成を確認し、重粒子線と温熱治療のアドバンテージを示す結果を得た。

研究成果の概要(英文)： Targeting cancer stem cells (CSCs) might enable improvement of the cancer therapies. The overexpression of Lin28B reduced mature let-7 microRNA expression in melanoma cell lines, and enhanced the sphere-forming ability of melanoma cell lines, which is a characteristic of CSC populations. Interestingly, Lin28B-overexpressed melanoma cells were more resistant to X-ray irradiation than control cells, and Lin28B-induced radioresistance was abolished after carbon ion irradiation. Our results suggest that a carbon ion beam is more effective than an X-ray beam in terms of killing cancer cells, possibly due to elimination of CSC populations.

In addition, we demonstrated that C-ion and heat treatment can induce DNA damage via DSB formation reflected by H2AX foci formation under hypoxia. C-ion and hyperthermia therapy can be beneficial for the prognosis of cancer patients through increased DNA damage leading to tumor cell death.

研究分野：放射線生物

キーワード：放射線科学 重粒子線 ハイパーサーミア がん幹細胞 感受性

様式 C-19、F-19-1、Z-19、CK-19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

様々な臨床知見や実験結果から、腫瘍組織中に存在する「がん幹細胞」は、X線や抗がん剤治療に抵抗性となる要因を持ち備えており、再燃・再発・転移の原因となることが提唱されている(図1)。

→がんの治療効果向上には、「がん幹細胞」を制御することが重要である。

20年間、がんの治療効果向上を目指し、重粒子線と温熱の生物影響の基礎的研究をすすめてきた。

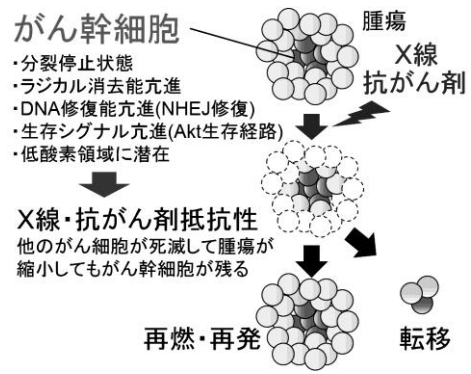


図1. 従来の治療では、がん幹細胞が残存して再燃・再発・転移の原因となる

<重粒子線の生物影響研究成果>

重粒子線は、(1)修復されにくい DNA 損傷を生じること[1]、(2)生物学的効果比が高いこと[2]、(3)重粒子線は Akt 生存経路を抑制 [3,4](図 2a)して、p53 非依存的にアポトーシスを誘導することで[1,5]、X 線に比べて高殺がん細胞効果をもたらしことを明らかにした。さらに、重粒子線の増感効果を高める標的候補として、HR 修復よりも NHEJ 修復であることを示した[6]。大腸がん・膵がんにつき、(4)重粒子線照射後がん幹細胞マーカー陽性の舌がん細胞頻度が減ることを報告した[3]。

<温熱の生物影響研究成果>

温熱は、(1)生体反応を介して DNA 二本鎖を切断すること[7]、(2)温熱は NHEJ 修復を抑制すること[7] (図 2b)、(3)舌がんのがん幹細胞マーカー陽性頻度が減ることを報告した。

重粒子線と温熱はがん幹細胞に効果があることを示唆。

新たなモチベーションとして

→ さらに効果を高めるためには？

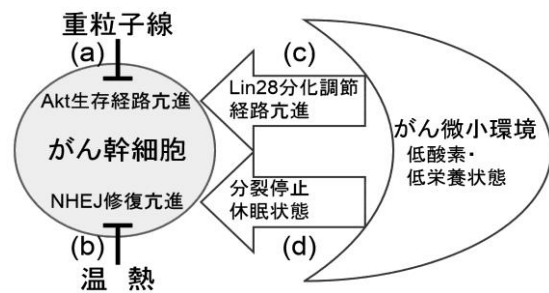


図2. 重粒子線と温熱のがん幹細胞への作用

着想に至った経緯

最近、Lin28 未分化誘導経路(図 2c)は胚性幹細胞で特異的に発現し、分化の際は発現減少することからヒト胚性幹細胞の未分化マーカーとして知られ、Akt 生存経路を亢進してがん幹細胞化に関与することが報告され(Shyh-Chang & Daley, Cell Stem Cell, 2013)、注目されていた。

また、がん微小環境(低酸素・低栄養状態)の細胞は分裂停止・休眠状態となり、DNA 二本鎖切断修復の内、S-G2 期のみではたらく HR 修復よりも、全細胞周期ではたらく NHEJ 修復が標的となることが報告されている(Nishikawa S, et al. Exp Ther Med, 2012) (図 2d)。

これらの報告は、我々が明らかにしてきた「X線と比べて、重粒子線と温熱処理はがん幹細胞マーカー陽性頻度が減る」ことを理論的に裏付けるものである。

また、重粒子線がん治療センターの建設を進める韓国東南圏原子力医学院がんセンター(DIRAMS)からのポスドク留学生 Park SJ は、がん幹細胞化にかかわる Lin28 未分化誘導経路の調節機構として、ヒストン mH2A の発現が減少することで、クロマチン構造が緩み、マスクされていた Lin28 の発現が亢進することにより、γ線抵抗性になることを明らかにしている(Park SJ, et al. Oncogene, 2015)(図 3)。従来の細胞表面マーカーを指標とするのではなく、Lin28 未分化誘導経路を遺伝子操作した細胞は、がん幹細胞の殺細胞効果向上のアッセイ系として利用できるのではないかという着想に至った。

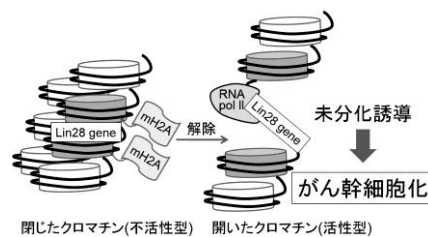


図3. Lin28 未分化誘導経路の調節機構

さらに、固形腫瘍内の低酸素領域は、放射線や抗がん剤に抵抗性で予後不良の原因となることが問題視されている。一方、重粒子線および温熱では低酸素による感受性の修飾が少ないことが知られている。その原因の一つとして、常酸素および低酸素環境下で、X線、重粒子線照射および温熱処理した時のDNA二本鎖切断の生成頻度が異なるのではないかという着想に至った。

### 従来業績

- 1) **Takahashi A\***, et al. (6名中1番目): Apoptosis induced by high-LET radiations is not affected by cellular *p53* gene status. *Int J Radiat Biol.* 81: 581-6, 2005.
- 2) Ma H, **Takahashi A\***, et al. (10名中2番目): Targeting of carbon ion-induced G2 checkpoint activation in lung cancer cells using Wee-1 inhibitor MK-1775. *Radiat Res.* 184: 660-9, 2015.
- 3) **Takahashi A\***, et al. (9名中1番目): Carbon-ion beams efficiently induce cell killing in X-ray resistant human squamous tongue cancer cells. *Int J Med Phys Clin Eng Radiat Oncol.* 3: 133-42, 2014.
- 4) Nakagawa Y, **Takahashi A**, et al. (12名中2番目): Depression of p53-independent Akt survival signals in human oral cancer cells bearing mutated *p53* gene after exposure to high-LET radiation. *Biochem Biophys Res Commun.* 423: 654-60, 2012.
- 5) **Takahashi A**, et al. (9名中1番目): High-LET radiation enhanced apoptosis but not necrosis regardless of *p53* status. *Int J Radiat Oncol Biol Phys.* 60: 591-7, 2004.
- 6) **Takahashi A\***, et al. (12名中1番目): Nonhomologous end-joining repair plays a more important role than homologous recombination repair in defining radiosensitivity after exposure to high-LET radiation *Radiat Res.* 182: 338-44, 2014.
- 7) **Takahashi A\***, et al. (12名中1番目): Evidence for the involvement of double-strand breaks in heat-induced cell killing. *Cancer Res.* 64: 8839-45, 2004.

### 2. 研究の目的

#### がんの根治を妨げる“がん幹細胞”に挑む！

がんの治療効果向上には、「がん幹細胞」を制御することが重要である。がん幹細胞は普段分裂を停止しており、DNA修復能(NHEJ修復)と生存シグナル(Akt生存経路)が亢進しているため、通常の治療が効きにくく、再燃・再発・転移の原因になることが報告されてきた。

これまでに我々は、温熱ではNHEJ修復を、重粒子線ではAkt生存経路を抑制することを見出してきた。そこで、積み重ねてきた知見をもとに、がん幹細胞を標的とした重粒子線と温熱治療の基礎的研究を行うことを目的とした。

ここでは、この3年間の成果として

- 1) Lin28 強発現悪性黒色腫細胞におけるがん幹細胞形質と炭素線の感受性
- 2) 低酸素環境下における重粒子線および温熱誘導 DNA 二本鎖切断の生成について明らかにしたことを報告する。

### 3. 研究の方法

#### 1) Lin28 強発現悪性黒色腫細胞によるX線と重粒子線の感受性試験

ATCCより悪性黒色腫培養細胞(A2058, A375, A375s2, G361, Hs294T, SK-MEL-5, SK-MEL-28)を入手した(表1)。MultiRad225によるX線(200 kVp, 14.6 mA, 1.13 Gy/min)もしくは群馬大学重粒子線医学研究センターにて炭素線(290 MeV/u, 60 mm SOBP 中心、平均 LET ~50 keV/μm)を照射し、コロニー形成法によって、放射線感受性を調べた(図4)。

表 1. ヒト悪性黒色腫細胞株

Cell line	Tissue	Age	Gender	Ethnicity	ATCC No.
A375	Skin	54	♀		CRL-1619
A375s2	Skin	54	♀		CRL-1872
A2058	Skin→lymph node	43	♂	Caucasian	CRL-11147
G361	Skin	31	♂	Caucasian	CRL-1424
Hs294T	Skin→lymph node	56	♂	Caucasian	HTB-140
MeWo	Skin→lymph node	78	♂	Caucasian	HTB-85
SK-MEL-5	Skin→axillary node	24	♀	Caucasian	HTB-70
SK-MEL-28	Skin	51	♂		HTB-72

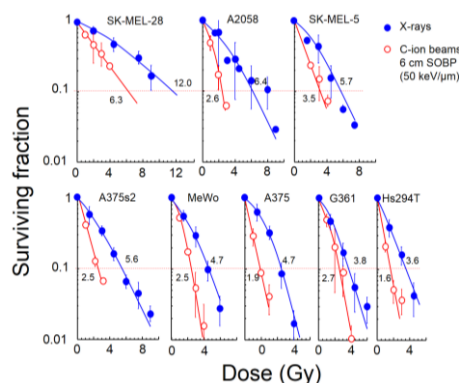


図 4. 悪性黒色腫細胞株の放射線感受性

Lin28B 抗体 (Abcam, Cambridge, MA) および Actin 抗体 (Santa Cruz, CA) を用いて Western blot 法により、内在性 Lin28B の発現量を調べた。その内の発現量の少ない細胞を選び、Lin28 を組み込んだ pCMV6-AC-GFP ベクター (Origene, Rockville, MD) を、リポフェクタミン (Invitrogen, Carlsbad, CA) で導入して、G418 でセレクションして、過剰発現細胞を作製した。がん幹細胞形質はスフェア形成能で確認した。また、200-kVp の X 線 (MultiRad225, Faxitron Bioptics, LLC, Tucson, AZ) および炭素線 (6 cm SOBP, 50 keV/ $\mu$ m, GHMC) を照射して、感受性をコロニー形成法で解析し、それぞれの親株と比較した。DSB の指標として用いられる  $\gamma$ H2AX を蛍光免疫染色した。

## 2) 低酸素環境下における重粒子線および温熱誘導 DNA 二本鎖切断の生成

HeLa 細胞 (ヒト子宮頸がん細胞株) を 4 穴プレートに播種し、37°C、5%CO<sub>2</sub> インキュベーターで 24 時間前培養した後、常酸素及びアナロパック・ケンキ 5% または INVIVO2 500 による低酸素の条件で培養した (図 5)。

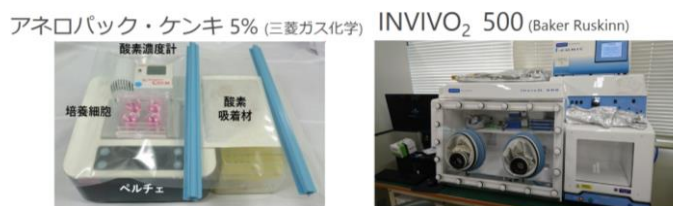


図 5. 低酸素処理

MultiRad225 による X 線 (200 kVp, 14.6 mA, 1.13 Gy/min) もしくは群馬大学重粒子線医学研究センターにて炭素線 (290 MeV/u, 60 mm SOBP 中心、平均 LET ~50 keV/ $\mu$ m) を 3 Gy 照射した。また、2 台のペルチェに 4 穴プレートを挟み 45°C で温熱処理した。それぞれ処理 30 分後に細胞を 3.7%ホルムアルデヒド溶液で固定し、 $\gamma$ H2AX を蛍光免疫染色し、核を DAPI でカウンター染色した。1 ポイント当たり 100 細胞以上の核内  $\gamma$ H2AX 蛍光強度を MetaMorph 画像解析ソフトで評価した。

## 4. 研究成果

### 1) Lin28 強発現悪性黒色腫細胞におけるがん幹細胞形質と炭素線の感受性

内在性 Lin28B の発現量を調べた結果、A2058 や A375 と比べて、SK-MEL-5、A375s2、G361 の発現量が少ないことを明らかにし (図 6A)、これらに Lin28 強発現遺伝子を導入することで発現量が増すことを確認した (図 6B)。

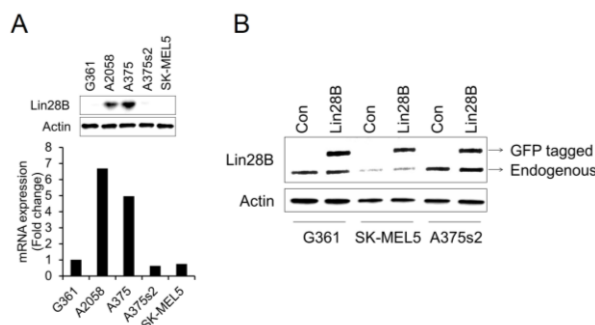


図 6. 悪性黒色腫細胞における Lin28B の発現量

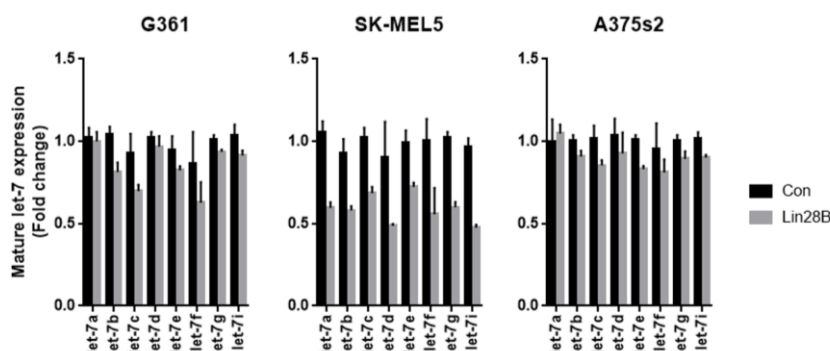


図 7. 悪性黒色腫細胞における Lin28B 強発現による Let-7miRNA の発現抑制

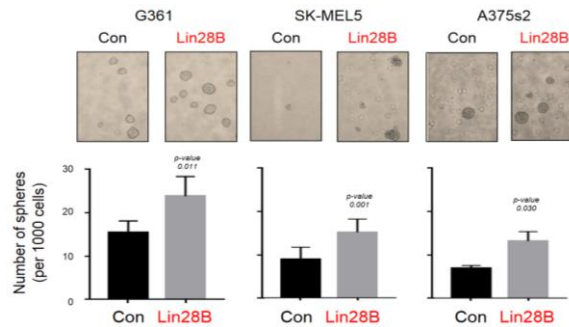


図 8. 悪性黒色腫細胞における Lin28B 強発現によるスフェア形成能

これらの Lin28 強発現細胞は、対照細胞と比べて Let-7miRNA の発現を抑制し(図 7)、スフェア形成能が高く(図 8)、X 線に抵抗性であるものの、炭素線の感受性に大きな違いは認められなかった(図 9)。これらの結果から、Lin28 未分化誘導経路を遺伝子操作した細胞は、がん幹細胞の殺細胞効果向上のアッセイ系として利用することができ、X 線と比べて重粒子線はがん幹細胞にも高い殺細胞効果をもたらすことを示すことができた。

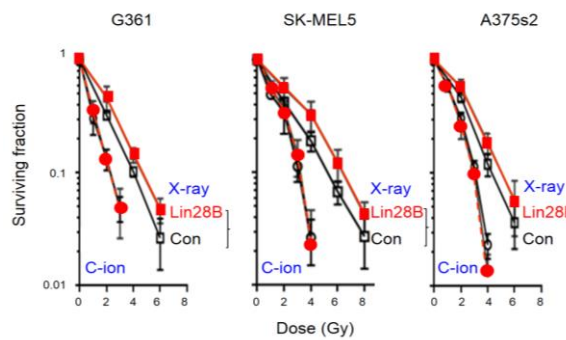


図 9. 悪性黒色腫細胞における Lin28B 強発現による放射線感受性

## 2) 低酸素環境下における重粒子線および温熱誘導 DNA 二本鎖切断の生成

子宮頸がん細胞 HeLa において、低酸素下、X 線に抵抗性を示したのに対して、炭素線および温熱では常酸素下と感受性に大きな違いは認められなかった。また、 $\gamma$ H2AX 蛍光強度は、低酸素において X 線では顕著に減少したのに対して、炭素線および温熱では減少が顕著に抑えられた(図 10)。これらの結果から、炭素線治療および温熱治療は、放射線抵抗性の低酸素細胞に対しても有効であることを裏付けることができた

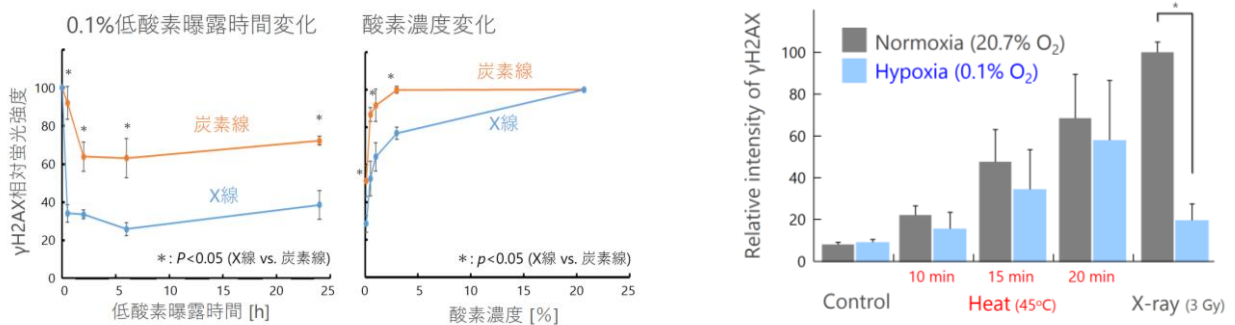


図 10. 子宮頸がん細胞における低酸素下での放射線誘導および温熱誘導 DNA 損傷量

## 5. 主な発表論文等

[雑誌論文] (計 4 件)

1. **Takahashi A**\*, Mori E, Nakagawa Y, Kajihara A, Kirita T, Pittman DL, Hasegawa M, Ohnishi T. Homologous recombination preferentially repairs heat-induced DNA double-strand breaks in mammalian cells. *Int J Hyperthermia*. 33: 1-7, 2016. 査読有
2. Park SJ, Heo K, Choi C, Yang K, Adachi A, Okada H, Yoshida Y, Ohno T, Nakano T, **Takahashi A**\*. Carbon ion irradiation abrogates Lin28B-induced X-ray resistance in melanoma cells. *J Radiat Res*. 58: 765-71, 2017. 査読有
3. Nakagawa Y, Kajihara A, **Takahashi A**, Murata AS, Matsubayashi M, Ito SS, Ota I, Nakagawa T, Hasegawa M,

- Kirita T, Ohnishi T, Mori E. BRCA2 protects mammalian cells from heat shock. *Int J Hyperthermia*. 34: 795-801, 2017. 査読有
4. Yoshida Y, Tominaga S, Ma L, **Takahashi A\***. Heat induces histone  $\gamma$ H2AX gormation under hypoxia. *Thermal Med*. 34: 45-51, 2018. 査読有

[学会発表] (計 13 件)

1. **Takahashi A\***, Mori E, Kajihara A, Nakagawa Y, Ohnishi T. Enhancement of heat sensitivity of human cancer cells by inhibitor of HR but not NHEJ. ICHO2016, 2016 年 4 月 11-15 日 (New Orleans, LA)
2. Park SJ, **Takahashi A\***. The role of Lin28/let7 axis as a target for radiosensitization of melanoma cancer cells. 第 22 回癌治療増感研究会, 2016 年 7 月 2 日 (沖縄県市町村自治会館, 那覇)
3. **高橋昭久\***, 森英一朗, 仲川洋介, 梶原淳久, 桐田忠昭, 大西武雄. 温熱による DNA 二本鎖切断は相同組換えで修復される. 日本ハイパーサーミア学会第 33 回大会, 2016 年 9 月 2-3 日(つくば国際会議場, 筑波)
4. **高橋昭久\***, 吉田由香里, 金井達明, 大野達也, 馬洪玉, 中川彰子, 中野隆史, 舟山知夫, 小林泰彦. HR 修復および NHEJ 修復阻害剤による炭素線増感効果の検討. 第 1 回 QST 高崎研シンポジウム 2017 年 1 月 25-26 日 (量研機構高崎研, 高崎)
5. **高橋昭久\***. 炭素線によるがん治療効果向上のための基礎研究成果~ DNA 修復と細胞周期調節の阻害剤による炭素線の増感効果~. 第 19 回癌治療増感研究シンポジウム. 2017 年 2 月 3-4 日 (奈良県文化会館, 奈良)
6. Tominaga S, Okada H, Ikeda H, Yoshida Y, **Takahashi A\***. Effects of oxygen concentration and radiation quality on radiation-induced DNA damage. 第 7 回国際放射線神経生物科学会, 2017 年 2 月 9-10 日 (ホテル双葉, 越後湯沢)
7. **高橋昭久\***, 瀬下幸彦, 安達彰子, 吉田由香里. マウス移植腫瘍における温熱誘導 DNA 二本鎖切断. 第 21 回関東ハイパーサーミア研究会・全身ハイパーサーミア研究会合同学術研究会, 2017 年 3 月 4 日 (東海大学校友会館, 東京)
8. Park SJ, Heo K, Choi C, Yang K, Adachi A, Okada H, Yoshida Y, Ohno T, Nakano T, Takahashi A\*. Carbon ion irradiation abrogates Lin28B-induced X-ray resistance in melanoma cells. PTCOG56, 2017 年 5 月 11-13 日 (横浜パシフィコ, 横浜)
9. **Takahashi A\***, Tominaga S, Yoshida Y. Heat induces DNA double strand breaks under hypoxia. The 7th Asian Congress of Hyperthermic Oncology. 2018 年 5 月 25 日 (The Catholic University of Korea, Korea)
10. **高橋昭久\***, Park SJ, 安達彰子, 吉田由香里, 大野達也, 中野隆史. Lin28 強発現悪性黒色腫細胞におけるがん幹細胞形質と炭素線の感受性. 第 55 回日本放射線腫瘍学会生物部会学術大会, 2017 年 6 月 16 日 (NUCB 名古屋商科大学ビジネススクール, 名古屋)
11. **高橋昭久\***, 瀬下幸彦, 富永信太郎, 安達彰子, 原田浩, 吉田由香里. 腫瘍内微小環境における温熱誘導 DNA 二本鎖切断. 日本ハイパーサーミア学会第 34 回大会, 2017 年 9 月 15-16 日 (京都テルサ, 京都)
12. 富永信太郎, 吉田由香里, **高橋昭久\***. X 線と重粒子線による DNA 二本鎖切断生成の酸素濃度依存性. 第 55 回群馬放射線腫瘍研究会, 2018 年 2 月 17 日 (群馬大学医学部保健学科ミレニアムホール, 前橋)
13. 吉田由香里, 富永信太郎, **高橋昭久\***. 低酸素環境下における重粒子線および温熱誘導 DNA 二本鎖切断の生成. 第 24 回癌治療増感研究会, 2018 年 3 月 24 日 (富士ソフトアキバプラザ, 東京)

[図書] (計 2 件)

1. **Takahashi A\***. Chapter 3: Molecular damage: Hyperthermia alone. Eds. Kokura S, Yoshikawa T, Ohnishi T. "Hyperthermic Oncology from Bench to Bedside", Springer, pp.19-32, 2016.
2. **Takahashi A\***. Chapter 9: Inhibition of DNA repair system activity. Eds. Kokura S, Yoshikawa T, Ohnishi T. "Hyperthermic Oncology from Bench to Bedside", Springer, pp.91-108, 2016.

[産業財産権]

- 出願状況 (計 0 件)
- 取得状況 (計 0 件)

[その他]

ホームページ等

## 6. 研究組織

- (1) 研究分担者: なし
- (2) 研究協力者

研究協力者氏名: Seong-Joon Park

ローマ字氏名: Seong-Joon Park

※科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属されます。