

平成 26 年 5 月 1 日現在

機関番号：12301

研究種目：基盤研究(B)

研究期間：2011～2013

課題番号：23390303

研究課題名(和文) 温熱によるがん幹細胞活性化抑制機構の解明

研究課題名(英文) Elucidation of the suppression mechanism to activation of cancer stem cells by hyperthermia

研究代表者

高橋 昭久 (TAKAHASHI, AKIHISA)

群馬大学・先端科学研究指導者育成ユニット・准教授

研究者番号：60275336

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 14,000,000円、(間接経費) 4,200,000円

研究成果の概要(和文)：X線抵抗性がん細胞は親株細胞と比べて、X線照射後DNA損傷が早期に消失するが、温熱処理後に差は少なく、温熱感受性に差がないことを示した。また、いずれの細胞でもがん幹細胞マーカー陽性の集団がX線照射後に増加するのにも、等生存率の温熱処理後では増加量が少なかった。温熱はがん幹細胞にも殺細胞効果があることが示唆された。

放射線に増感効果が認められるNHEJ阻害剤の濃度においても、温熱では増感効果が認められなかった。一方、HR阻害剤では温熱の増感効果が高まることを明らかにした。温熱でDNA二本鎖切断が生じ、NHEJ修復が阻害されることが、温熱によるがん幹細胞活性化抑制機構の一要因であることが示唆された。

研究成果の概要(英文)： This study examined to clarify the heat sensitivity in X-ray resistant cells from human tongue cancer cells. Our results show that heat sensitivity was not significant difference between X-ray resistant cells and parental cells. The data of flow cytometry showed that cancer stem-like cells were significantly decreased after heating as compared with exposure to X-rays at iso-survival doses in both cells.

In addition, we examined the effect of the inhibitor of HR repair or NHEJ repair for DSBs on heat sensitivity. Heat sensitivity was not affected by NHEJ inhibitor. On the other hand, HR inhibitor was able to enhance heat sensitivity. These results suggest that the heat sensitivity may be enhanced by the suppression of HR repair. In addition, these findings provide support for the concept that heat may lead to the induction of DSBs.

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：内科系臨床医学・放射線科学

キーワード：放射線治療 温熱治療 感受性 がん幹細胞 DNA二本鎖切断

## 1. 研究開始当初の背景

近年、がんの三大治療法(外科手術・放射線治療・化学治療)が画期的に発展を遂げてきたにもかかわらず、今なお、がんは日本人の死因の一位である。そこで四番目の選択肢として温熱治療が注目されている。温熱治療は腫瘍の局所を 42~43 以上に 30~60 分加温する治療法で、厚生省では電磁波温熱療法というかたちで、1985 年に新しく出来た高度先進医療制度にとり入れられ、さらに 1990 年から放射線併用電磁波温熱療法が健康保険の適用になり、現在では温熱単独治療でも保険が適用されるようになってきている。

しかしながら、温熱による分子損傷については不明な点や再考の余地が多く残されている。従来の定説によると温熱による細胞死の主因はタンパク質の変性のみと考えられてきた。一方、我々は温熱で DNA 二本鎖切断(DSB)が生成すること(右図)を中性コメットアッセイ法および免疫蛍光染色法によるリン酸化ヒストン H2AX ( $\gamma$ H2AX)フォーカス形成の測定で明らかにし、温熱誘導 DSB 形成率と温熱感受性との間に高い相関性があることを示した(Takahashi A, *et al.* Cancer Res. 64: 8839-45, 2004)。少なくとも温熱による H2AX リン酸化については我々を含む国内外の数グループが報告しており、動物種(マウス、チャイニーズハムスター、ウシ、トリ、ヒト)や正常細胞、がん細胞を問わず、普遍的な現象であることに間違いはない(Takahashi A, *et al.* Mutat Res. 656: 88-92, 2008)。さらに、温熱感受性の決定因子がタンパク質変性ではなく、DSB であることを提唱しているのは我々のみである。

一方、白血病に端を発し、乳癌、脳腫瘍、頭頸部癌などの多くの腫瘍において、次々にがん幹細胞が同定されてきた(Prince ME, *et al.* PNAS. 104: 973-8, 2007)。がん幹細胞は全てのがんに存在するのか、未解明な部分も多いが、正常幹細胞と同様に自己複製能と多分化能を有し、がん幹細胞集団を維持しつつ、がん組織を構成する多様な分化段階にあるすべ

てのがん細胞を生みだすと考えられている。さらに、これまでの抗がん剤や放射線療法には非がん幹細胞は死滅するものの、がん幹細胞は普段ほとんど休眠しているので効きにくく、抗がん剤などの薬剤を排出するポンプ機能もあり、抵抗性で生存し続け、そのがん幹細胞を基点として再びがん細胞集団を形成し、再発を起こしてしまうことが報告されてきた。

最近、放射線に抵抗性ながん幹細胞様集団が、温熱に感受性であることを示唆する注目すべき報告がなされた。

## 2. 研究の目的

### (1) X 線抵抗性がん細胞における温熱感受性

がん幹細胞様細胞は X 線抵抗性なのに対して、温熱感受性であるのかどうかを確かめることを目的とした。X 線抵抗性細胞と感受性細胞とで X 線照射後と比較して、温熱処理後のがん幹細胞様集団の頻度を明らかにする。また、我々は温熱の感受性は DSB に起因していることを報告しており、X 線抵抗性細胞と感受性細胞とで温熱誘導 DSB 生成量と、DSB 修復能を明らかにすることを目的とした。

### (2) 相同組換え(HR)修復および非相同組換え(NHEJ)修復阻害剤による温熱増感効果

休眠期では HR がはたらかず、NHEJ 修復のみはたらくことから、もし X 線に対して NHEJ 修復が亢進しており、温熱では NHEJ 修復が阻害されているとしたら、がん幹細胞が X 線に抵抗性となり、温熱に感受性となることを説明できると考えた。そこで、HR 修復および NHEJ 修復阻害剤による温熱増感効果を明らかにすることを目的とした。

## 3. 研究の方法

### (1) X 線抵抗性がん細胞における温熱感受性

細胞: X 線 1 日 2 Gy (総線量 2,278 Gy) の

分割照射を続けても生存・増殖し続けたヒト舌扁平上皮がん SAS-R 細胞とその親株 SAS 細胞を用いた。

処理：温熱処理(44 )および対照に X 線照射した。

感受性試験：High density survival assay で調べた。

DNA の二本鎖切断量：ヒストン H2AX を指標としてフローサイトメーター (FACS Calibur, BD)を用いて調べた。

がん幹細胞様集団頻度の測定：がん幹細胞特異的マーカー CD44 および CD326 による蛍光染色後、フローサイトメーター (FACS Calibur, BD)を用いて調べた。

#### (2) HR 修復および NHEJ 修復阻害剤による温熱増感効果

細胞：がん抑制遺伝子 *p53* 欠損ヒト非小細胞肺癌 H1299 細胞を用いた。

阻害剤：異なる濃度の HR 修復関連 Rad51 阻害剤(B02, Calbiochem)または NHEJ 修復関連 DNA-PK 阻害剤(NU7026, Calbiochem)を培地に添加した。

温熱および放射線処理：阻害剤添加 6 時間後、温熱処理(44 )および対照に X 線照射した。

感受性試験：温熱または放射線照射 18 時間後、培地を交換し、コロニー形成法で感受性を調べた。

#### 4 . 研究成果

##### (1)X 線抵抗性がん細胞における温熱感受性感受性

X 線の 20%生存率線量は SAS 細胞で 7.5 Gy、SAS-R 細胞で 12 Gy、温熱の 20%生存率処理時間は SAS 細胞で 30 分、SAS-R 細胞で 35 分を示した。

##### DNA 修復能

SAS-R 細胞は SAS 細胞と比べて  $\gamma$ H2AX は X 線照射後早期に消失するが、温熱処理後に

差は少ないこと、また、等生存率あたり放射線と比べて温熱による DSB 生成量は少ないが、DNA 修復量も少ないことを確認した。

##### がん幹細胞様集団頻度

SAS 細胞と比べて SAS-R 細胞はがん幹細胞マーカー陽性の集団が多かった。また、いずれの細胞でも線量依存的に X 線照射 48 時間後のがん幹細胞マーカー陽性の集団が増えていくのに対して、等生存率の温熱処理 48 時間後ではがん幹細胞マーカー陽性集団の増加は抑制されていた。温熱はがん幹細胞様細胞にも殺効果があり、X 線抵抗性ながん細胞に対しても有効であることが示唆された。

##### (2) HR 修復および NHEJ 修復阻害剤による温熱増感効果

放射線に対して増感効果の認められる NU7026 の濃度においても、温熱の増感効果は認められなかった。一方、B02 単独では細胞致死に影響のない濃度で、温熱の増感効果が高まることを明らかにした。温熱で DNA 二本鎖切断が生じ、がん細胞に対して HR 修復の阻害剤は温熱感受性を高める増感剤候補になることが示唆された。

#### 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 4 件 )

Watanabe K, Miyagawa R, Tomikawa C, Mizuno R, Takahashi A, Hori H, Ijiri K.: Degradation of initiator tRNA<sup>Met</sup> by Xrn1/2 via its accumulation in the nucleus of heat-treated HeLa cells. *Nucleic Acids Res.* **41**: 4671-4685, **2013**. DOI: 10.1093/nar/gkt153 査読有  
Shimura T, Noma N, Oikawa T, Ochiai Y, Kakuda S, Kuwahara Y, Takai Y, Takahashi A, Fukumoto M.: Activation of the AKT/cyclin D1/Cdk4 survival signaling pathway in radioresistant cancer stem cells. *Oncogenesis.* **1**: e12, **2012**. DOI: 10.1038/oncsis.2012.12 査読有  
Furusawa Y, Fujiwara Y, Campbell P, Zhao Q-L, Ogawa R, Hassan MA, Tabuchi Y,

Takasaki I, Takahashi A, Kondo T.: DNA double-strand breaks induced by cavitation mechanical effects of ultrasound in cancer cell lines. *PLoS ONE*. 7: e29012, 2012. DOI: 10.1371/journal.pone.0029012 査読有  
Okamoto N, Takahashi A, Ota I, Ohnishi K, Mori E, Kondo N, Noda T, Nakagawa Y, Uemura H, Yane K, Hosoi H, Ohnishi T.: siRNA targeted for nbs1 enhances heat sensitivity in human anaplastic thyroid carcinoma cells. *Int J Hyperthermia*. 27: 297-304, 2011. DOI: 10.3109/02656736.2010.545365 査読有

〔学会発表〕(計 15 件)

高橋昭久, 馬洪玉, 久保誠, 中川彰子, 小町麻由美, 磯野真由, 吉田由香里: 相同組換え修復関連 Rad51 阻害剤 B02 による温熱増感効果. 第 18 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, 2013.2.1, ホテルニューイタヤ (栃木県)

高橋昭久, 馬洪玉, 久保誠, 中川彰子, 吉田由香里, 桑原義和, 福本学: 放射線抵抗性がん幹細胞様細胞における温熱感受性. 日本ハイパーサーミア学会第 30 回大会, 2013.8.31, 横浜シンポジア (神奈川県)

高橋昭久, 馬洪玉, 久保誠, 中川彰子, 吉田由香里, 桑原義和, 福本学: 放射線抵抗性がん幹細胞様細胞に対する温熱感受性. 第 17 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, 2013.3.2, 東京厚生年金病院 (東京都)

Takahashi A, Mori E, Chen DJ, Ohnishi T.: ATM is the predominant kinase involved in the phosphorylation of histone H2AX after heating. 11th International Congress of Hyperthermic Oncology, 2012.8.29, ハイアットリージェンシー京都 (京都府)

Takahashi A, Ohnishi T.: A priming heat treatment can induce the development of heat- and radio-resistance *via* HSPs, regardless of *p53*-gene status. 11th International Congress of Hyperthermic Oncology, 2012.8.29, ハイアットリージェンシー京都 (京都府)

高橋昭久, 馬洪玉, 久保誠, 中川彰子, 吉田由香里, 桑原義和, 福本学: 放射線抵抗性細胞における温熱感受性についての

検討. 第 18 回癌治療増感研究シンポジウム, 2012.6.9, 大阪大学 (大阪府)

高橋昭久: 温熱感受性を決定する分子機構. 第 16 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, 2012.3.24, 埼玉医科大学かわごえクリニック (埼玉県)

Takahashi A: Target genes deciding heat sensitivity. 第 70 回日本癌学会学術総会, 2011.10.4, 名古屋国際会議場(愛知県)

高橋昭久: 温熱感受性に対する DNA 二本鎖切断修復の役割について. 日本ハイパーサーミア学会第 28 回大会, 2011.9.10, ウィンクあいち (愛知県)

高橋昭久, 森英一朗, 近藤夏子, 野田太一, 梶原淳久, 長谷川正俊, 大西武雄: DNA 修復を標的とした温熱増感研究. 第 17 回癌治療増感研究シンポジウム, 2011.6.8, 赤門鍼灸柔整専門学校 (宮城県)

〔図書〕(計 1 件)

Takahashi A, Eiichiro Mori, Takeo Ohnishi Nova Science Publishers, Inc. "Heat-induced DNA damage" In: Cellular Response to Physical Stress and Therapeutic Application, 2013, 204 (p.135-147).

〔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

[http://asrldu.dept.med.gunma-u.ac.jp/atahashi/akihisa\\_takahashi.html](http://asrldu.dept.med.gunma-u.ac.jp/atahashi/akihisa_takahashi.html)

6 . 研究組織

(1)研究代表者

高橋 昭久 (TAKAHASHI AKIHISA)

群馬大学・先端科学研究指導者育成ユニット・准教授

研究者番号 : 60275336