

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 6 月 19 日現在

機関番号：24601

研究種目：基盤研究(B)

研究期間：2011～2013

課題番号：23390304

研究課題名(和文) 神経系腫瘍幹細胞の放射線抵抗性と分化に対する重粒子線照射の影響

研究課題名(英文) Effect of heavy ion beam irradiation on radioresistance and differentiation of cancer stem cells in neuronal tumors

研究代表者

長谷川 正俊 (Hasegawa, Masatoshi)

奈良県立医科大学・医学部・教授

研究者番号：50251111

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 15,100,000円、(間接経費) 4,530,000円

研究成果の概要(和文)：神経系腫瘍幹細胞の放射線抵抗性と分化への重粒子線の影響を解明する目的で、p53野生型上衣芽腫、変異型膠芽腫をマウスに移植して、炭素線、X線の照射後、cDNAアレイ解析、免疫組織化学、増殖遅延の検討を行った。照射後、上衣腫ではp53、Bax、PI3K等に変動を認め、膠芽腫ではNF- κ B、I κ B α 、IAP等の変動が示唆された。上衣芽腫は大部分の細胞がNestin強陽性、CD44、CD133弱陽性だったが、増殖遅延が顕著となったX線、炭素線8Gy以上照射後では、Ki-67陽性率の低下、GFAP陽性率の上昇が認められ、さらにCD133陽性率の軽度上昇も示唆された。

研究成果の概要(英文)：The purpose is to investigate the radiobiological effect of heavy ion (CI) beams on radioresistance and differentiation of human tumor cells, especially cancer stem cells. Human ependymoblastoma with wild-type p53 and glioblastoma with mutant-type p53 were transplanted into nude mice and irradiated with CI beams or 150-kV X-rays. Tumors were excised for cDNA microarray analysis 6-48 hours or 6 weeks after 2-24 Gy irradiation. CD133, CD44, Nestin, p53, PTEN, Ki67, and GFAP expressions were evaluated immunohistochemically. In ependymoblastoma, p53 signaling and apoptosis-related pathways were suggested to be involved following irradiation. The tumors showed a significant decrease in growth fraction and a slight increase of the CD133-positive rate after high-dose irradiation. These results suggest that CD133-positive and Ki-67-negative cells may be resistant to both X-rays and CI beams.

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：癌幹細胞 神経幹細胞 放射線抵抗性 アポトーシス p53

1. 研究開始当初の背景

(1) 本研究の位置づけ

放射線抵抗性に関する幹細胞：放射線治療における治療可能比は、腫瘍と周囲正常組織の放射線感受性によって大きく左右されるが、放射線抵抗性に影響する因子のひとつとして幹細胞の存在が注目されている。特に腫瘍の幹細胞である癌幹細胞 (cancer stem cells: CSC) については、種々の腫瘍で広く基礎研究が行われ、日常臨床への応用が期待されている。放射線や抗癌剤による治療で大部分の癌細胞が死滅した後でも、残存したわずかな癌幹細胞が増殖して再発に至ると考えられ、この制御が重要と考えられている。

神経膠腫幹細胞の放射線抵抗性：特に難治性の神経膠腫については、放射線抵抗性が CD133 陽性の癌幹細胞 (glioma stem cells: GSC) における DNA 修復の活性化と密接に関係していることが報告され (Bao S, et al. Nature 444:756-60, 2006), さらにグリアへの分化、増殖と幹細胞との関連も示唆されているが (Beier D, et al. Cancer Res 67:4010-5, 2007), 幹細胞についての部分的な解明のみでは、放射線治療成績向上に実際に寄与できるかどうかはまだ不明である。

正常組織の幹細胞と階層モデル：幹細胞が自己複製を繰り返して、その一部が分化していくという階層モデルが以前から提唱されている。正常組織では、精巣、造血細胞、粘膜等の他、脳でも、側脳室、海馬に神経幹細胞が存在している。増殖している段階の幹細胞由来の細胞 (その後分化していく) はむしろ感受性が高く、アポトーシスが誘発されやすいが、本来の幹細胞は相対的にやや抵抗性である。例えば精原細胞の大部分は数 Gy で高率にアポトーシスに陥るが (Hasegawa M, et al. Radiat Res 147:457-467, 1997), 相対的にやや抵抗性の幹細胞が生残する。

本研究の代表者等の関連分野での研究：本研究以前に、1) p53依存性、p53非依存性アポトーシスの解明、2) p53遺伝子型の異なるヒトおよびマウス腫瘍系の樹立、3) 高LET放射線 (重イオン線、重イオンマイクロビーム等) の放射線生物学的研究等を行い、放射線抵抗性腫瘍、放射線感受性の腫瘍、正常組織において、アポトーシス誘発を指標とした生物効果比RBEは、放射線抵抗性腫瘍では3-5と大きく、感受性腫瘍では3-4、感受性正常組織では1-2程度と相対的に小さいことを報告して、炭素イオン線が治療可能比の点から放射線抵抗性腫瘍に有用なことを示唆してきた。

2. 研究の目的

(1) 腫瘍内の放射線感受性の不均一性と幹細胞の関係の解析：非照射時の幹細胞と非幹細胞の相違について、分化、増殖能、細胞周期、低酸素等の放射線感受性に影響する因子との関係を明らかにする。幹細胞と種々の分化傾向を示す細胞では放射線感受性が異なる可能性が高く、本研究の上衣芽腫では、未熟な細胞が上衣細胞口ゼットへの分化を示す細胞ではアポトーシスが高率であるが、グリアへの分化を示す細胞では低率になるので、非照射時の上衣芽腫、膠芽腫等における形態学的特徴とGlial fibrillary acidic protein (GFAP)等の蛋白発現からみた分化、感受性とCD133等を発現している幹細胞の分布との相関を明らかにする。

(2) X線照射後の細胞死と残存腫瘍細胞における幹細胞の割合と特徴の解明：異なる線量のX線を照射して増殖遅延を検索し、再増大が可能な限界の線量を求め、この近辺の線量を照射後の組織におけるCD133、CD44等を発現する細胞の割合と分布、照射線量による変化、遺伝子発現の網羅的解析、特にPTEN、Nestin発現の状態を明らかにする。

(3) 放射線抵抗性幹細胞に対する重粒子線の効果の解明：X線でのデータを解析後、放射線抵抗性幹細胞に対する炭素イオン線の効果を同様に検討して生物効果比を算出し、その有効性を明らかにする。さらにその相違に関する遺伝子発現を明らかにする。

3. 研究の方法

p53 野生型の上衣芽腫、p53 変異型の膠芽腫(GB)をヌードマウス皮下に移植して、炭素イオン線 (290MeV/u, 6 cm-SOBP, NIRS), X線(150kV: 20mA), 1Gy, 2Gy, 4Gy, 8Gy, 16Gy, 24Gy の1回照射後をおこない、6, 24, 48時間、6週間後に腫瘍を摘出して、(1) RNA安定液に浸透後、RNAを抽出して、cDNAアレイ解析、階層型クラスタリング、Gene Ontology解析、Pathway解析、(2) 他の組織でホルマリン固定、パラフィン包埋切片を作成して、CD133, CD44, Nestin, PTEN, p53, Ki-67, GFAP等の免疫組織化学とTUNEL染色、H.E.染色 (CSC, アポトーシス誘発、増殖分画、グリアへの分化の検索)、さらに(3)照射後の増殖遅延、再増大の有無検討目的での腫瘍径計測を行った。

4. 研究成果

(1) cDNAアレイ解析等：p53野生型腫瘍では、

p53, Bax, Fas, TRAIL, PI3K 等に変動を認めしたが(図1), p53 変異型腫瘍ではこれらに有意な変化を認めず, p53R2, p70S6K, TRAIL-R, NF-kB, IκBa, IAP, STAT, HSP, VEGF 等アポトーシス抑制, 他に関与する経路等の変動を認めた.

(2) CD133, CD44, Nestin 等の免疫組織化学(図2-5, 6): p53 野生型の上衣芽腫では, 大部分の細胞が, Nestin 強陽性, CD44 弱陽性で, 照射前後で有意な変化を認めなかったが, CD133 は一部の細胞が弱陽性で, 照射後に陽性率の軽度上昇が示唆された. Ki-67 labeling index (LI)照射後に低下したが, 再増大の有無によって大きく異なった. p53 変異型の膠芽腫では, 大部分の細胞が CD44 強陽性, 多くの細胞が Nestin 陽性で, 照射前後で有意な変化を認めなかったが, CD133 は一部の細胞が弱陽性で, 照射後に陽性率の軽度上昇が示唆された.

(3) p53 野生型の上衣芽腫では, X線照射後および炭素イオン線のいずれでも1~4Gy照射後のマウスでは再増大を認めたが, 8G以上照射後のマウスでは増殖遅延が目立ち, 一部のマウスでは6週間まで再増大を認めなかった. これらの腫瘍組織学所見では線維性結合織が主体で, その中に腫瘍細胞の小胞巣が散見された. 腫瘍細胞は類円形であるが, 対照群に比してやや大きく, 核分裂像が乏しくて, Ki-67 LIも著しく低下していた(図3-5, 6)が, CD133, CD44, Nestin, GFAP は多くの細胞が陽性だった.

図1. 上衣芽腫 Carbon 照射後:p53 signaling pathway (上), apoptosis-related pathway (下)

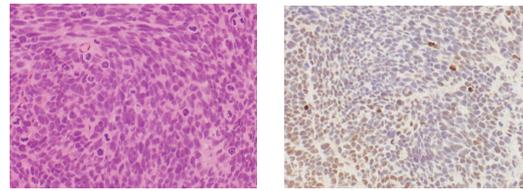


図2. 上衣芽腫:非照射; H.E. (左), CD133 (右)

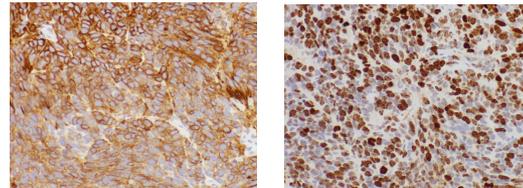


図3. 上衣芽腫:非照射; Nestin(左),Ki-67 (右)

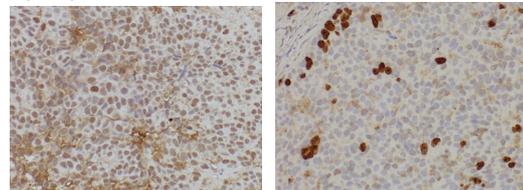


図4. 上衣芽腫: Carbon 16Gy 照射後(48h); CD133 (左), Ki-67 (右)

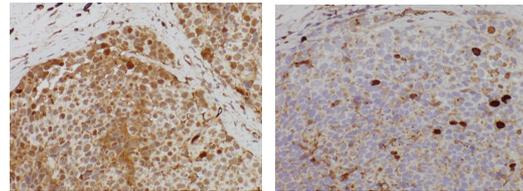


図5. 上衣芽腫: X-ray 16Gy 照射後(6weeks); CD133 (左), Ki-67 (右)

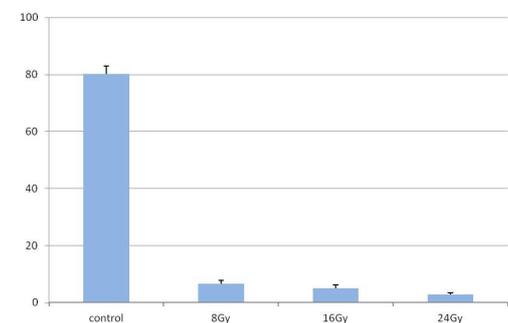
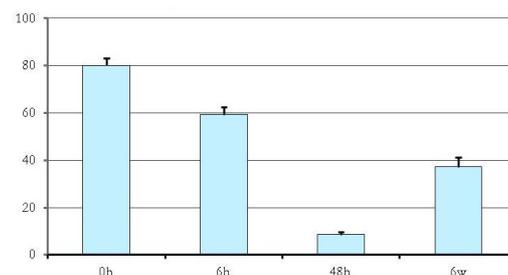
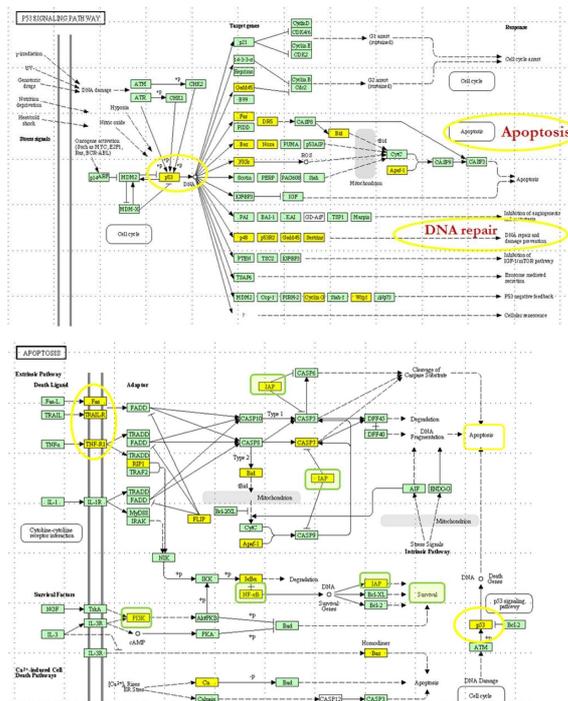


図6. 上衣芽腫 Ki-67 LI: Carbon 2Gy 照射後6時間~6週間(上), X線8-24Gy照射後6週間(下).

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 10 件)

Tanaka N, Asakawa I, Katayama E, Hirayama A, Hasegawa M, Konishi N, Fujimoto K. The biochemical recurrence-free rate in patients who underwent prostate low-dose-rate brachytherapy, using two different definitions. *Radiat Oncol* 査読有. 2014; 9(1):107. doi: 10.1186/1748-717X-9-107.

Tanaka N, Asakawa I, Anai S, Hirayama A, Hasegawa M, Konishi N, Fujimoto K. Periodical assessment of genitourinary and gastrointestinal toxicity in patients who underwent prostate low-dose-rate brachytherapy. *Radiat Oncol* 査読有. 2013; 8:25. doi: 10.1186/1748-717X-8-25.

Kajitani C, Asakawa I, Uto F, Katayama E, Inoue K, Tamamoto T, Shirone N, Okamoto H, Kirita T, Hasegawa M. Efficacy of FDG-PET for defining gross tumor volume of head and neck cancer. *J Radiat Res* 査読有. 2013; 54(4):671-8. doi: 10.1093/jrr/rrs131.

Tanaka N, Asakawa I, Fujimoto K, Anai S, Hirayama A, Hasegawa M, Konishi N, Hirao Y. Minimal percentage of dose received by 90% of the urethra (%UD90) is the most significant predictor of PSA bounce in patients who underwent low-dose-rate brachytherapy (LDR-brachytherapy) for prostate cancer. *BMC Urol* 査読有. 2012; 12:28. doi: 10.1186/1471-2490-12-28.

Sho M, Akahori T, Tanaka T, Kinoshita S, Tamamoto T, Nomi T, Yamato I, Hokuto D, Yasuda S, Kawaguchi C, Nishiofuku H, Marugami N, Enomoto Y, Kasai T, Hasegawa M, Kichikawa K, Nakajima Y. Pathological and clinical impact of neoadjuvant chemoradiotherapy using full-dose gemcitabine and concurrent radiation for resectable pancreatic cancer. *J Hepatobiliary Pancreat Sci* 査読有. 2013 ; 20(2):197-205. doi: 10.1007/s00534-012-0532-8.

Kirita T, Yamanaka Y, Imai Y, Yamakawa N, Aoki K, Nakagawa Y, Yagyuu T, Hasegawa M. Preoperative concurrent

chemoradiotherapy for stages II-IV oral squamous cell carcinoma: a retrospective analysis and the future possibility of this treatment strategy. *Int J Oral Maxillofac Surg* 査読有. 2012; 41(4):421-8. doi: 10.1016/j.ijom.2011.12.003.

Shirone N, Shinkai T, Yamane T, Uto F, Yoshimura H, Tamai H, Imai T, Inoue M, Kitano S, Kichikawa K, Hasegawa M. Axillary lymph node accumulation on FDG-PET/CT after influenza vaccination. *Ann Nucl Med* 査読有. 2012; 26(3):248-52. doi: 10.1007/s12149-011-0568-x.

Tanaka T, Nishiofuku H, Tamamoto T, Sho M, Anai H, Sueyoshi S, Sakaguchi H, Hasegawa M, Nakajima Y, Kichikawa K. Intra-arterial chemoinfusion prior to chemoradiotherapy with full-dose systemic gemcitabine for management of locally advanced pancreatic cancer. *Anticancer Res* 査読有. 2011; 31(11):3909-12.

Tanaka N, Fujimoto K, Shinkai T, Nakai Y, Kuwada M, Anai S, Miyake M, Hirayama A, Hasegawa M, Hirao Y. Bone scan can be spared in asymptomatic prostate cancer patients with PSA of ≤ 20 ng/ml and Gleason score of ≤ 6 at the initial stage of diagnosis. *Jpn J Clin Oncol* 査読有. 2011; 41(10):1209-13. doi: 10.1093/jjco/hyr118.

Matsumoto S, Takayama T, Tamamoto T, Wakatsuki K, Enomoto K, Tanaka T, Migita K, Asakawa I, Hasegawa M, Nakajima Y. A comparison of surgery and radiation therapy for cT1 esophageal squamous cell carcinoma. *Dis Esophagus* 査読有. 2011; 24(6):411-7. doi: 10.1111/j.1442-2050.2010.01163.x.

[学会発表](計 8 件)

Hasegawa M, et al. IAP and NF-kappaB activation induced by carbon ion beams in human radioresistant glioblastoma cells with mutant-type p53 in vivo. 第53回アメリカ放射線腫瘍学会(ASTRO). 2011年10月3日. アメリカ合衆国マイアミ.

長谷川正俊, 他. 放射線治療とアポトーシス. 日本放射線影響学会第 54 回大会. 2011年 11 月 17 日. 神戸.

長谷川正俊, 他. 放射線抵抗性の p53 変異型膠芽腫における炭素線照射による遺伝子発現の検討. 第 71 回日本医学放射線学会

総会 . 2012 年 4 月 15 日 . 横浜 .

長谷川正俊, 他 . Gene expression profiles induced by carbon ion beams in glioblastoma: close relation to anti-apoptosis and survival. 第 71 回日本癌学会学術総会 . 2012 年 9 月 20 日 . 札幌 .

Hasegawa M, et al. Gene Expression Profiles Induced by Carbon Ion Beams and X-rays in Human Brain Tumors. 第 54 回アメリカ放射線腫瘍学会 (ASTRO). 2012 年 10 月 29 日 . アメリカ合衆国ボストン .

Hasegawa M, et al. Cancer Stem Cell Markers and Gene Expression Profiles in Human Brain Tumors Following Carbon Ion Beam Irradiation.

第 55 回アメリカ放射線腫瘍学会 (ASTRO) 2013 年 9 月 23 日 . アメリカ合衆国アトランタ .

Hasegawa M, et al. Changes of Gene Expression Profiles and Cancer Stem Cell Markers in Brain Tumors Following Carbon Ion Beam Irradiation.

第 72 回日本癌学会学術総会 . 2013 年 10 月 4 日 . 横浜 .

長谷川正俊, 他 . 粒子線治療の放射線生物学 . 日本放射線腫瘍学会第 26 回学術大会 . 2013 年 10 月 19 日 . 青森 .

6 . 研究組織

(1) 研究代表者

長谷川 正俊 (HASEGAWA, Masatoshi)
奈良県立医科大学・医学部・教授
研究者番号 : 5 0 2 5 1 1 1 1

(2) 研究分担者

大野 達也 (OHNO, Tatsuya)
群馬大学・重粒子線医学研究センター・
教授
研究者番号 : 1 0 3 4 4 6 0 1

加藤 真吾 (KATO, Shingo)
埼玉医科大学・国際医療センター・教授
研究者番号 : 0 0 3 7 0 8 7 5

井上 和也 (INOUE, Kazuya)
奈良県立医科大学・医学部・研究員
研究者番号 : 2 0 5 9 6 9 5 2

片山 絵美子 (KATAYAMA, Emiko)
奈良県立医科大学・医学部・助教
研究者番号 : 0 0 5 9 6 9 5 0

(3) 連携研究者

無し ()
研究者番号 :

(4) 研究協力者

若月 優, 村上 健
(放射線医学総合研究所)

吉田由香里, 中野隆史
(群馬大学大学院医学系研究科)

石内勝吾
(琉球大学医学部)

武田麻衣子, 藤谷信将, 藤村浩子,
川島真紀, 榎本喜久子, 内田雅代,
浅川勇雄, 玉本哲郎, 大林千穂,
大西武雄
(奈良県立医科大学医学部)